

UNIVERSITÉ MOHAMMED V - AGDAL  
FACULTÉ DES SCIENCES  
RABAT



N° d'ordre : 2691

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

**Nisrin BENAYAD**

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie Organique

**Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des  
plantes aromatiques et médicinales Marocaines.**

**Extraction de métabolites secondaires des champignons  
endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité  
anticancéreuse.**

*Soutenue le : 21-12-2013, devant le jury :*

**Président :**

**Mr Abdelhak HAKIKI**

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

**Examineurs:**

**Mr El Mokhtar ESSASSI**

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

**Mr Mohammed BENCHIDMI**

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

**Mme Mahjoubia MOSADDAK**

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

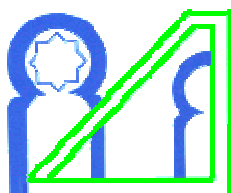
**Mr Abdelmalek DAHCHOUR**

Professeur Directeur de l'APESA, IAV Hassan II de Rabat

**Invité:**

**Mr Zakaria MENNANE**

Docteur à l'Institut National d'Hygiène de Rabat



UNIVERSITÉ MOHAMMED V - AGDAL  
FACULTÉ DES SCIENCES  
RABAT



N° d'ordre : 2691

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

**Nisrin BENAYAD**

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie Organique

**Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des  
plantes aromatiques et médicinales Marocaines.**

**Extraction de métabolites secondaires des champignons  
endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité  
anticancéreuse.**

*Soutenue le : 21-12-2013, devant le jury :*

**Président :**

**Mr Abdelhak HAKIKI**

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

**Examineurs:**

**Mr El Mokhtar ESSASSI**

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

**Mr Mohammed BENCHIDMI**

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

**Mme Mahjoubia MOSADDAK**

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

**Mr Abdelmalek DAHCHOUR**

Professeur Directeur de l'APESA, IAV Hassan II de Rabat

**Invité:**

**Mr Zakaria MENNANE**

Docteur à l'Institut National d'Hygiène de Rabat

**A la mémoire de mon père,  
A ma mère,  
A mes sœurs,  
A mes frères,  
A mes nièces et mes neveux,  
A mes beaux frères,  
A toute ma famille :**

**Je vous dédie mon travail en temoignage de votre affection et vos  
encouragements.**

**Nisrin..**

## **AVANT-PROPOS**

Les travaux de recherches de cette thèse ont été réalisés au Laboratoire de Substances Naturelles et Thermolyse-Eclair au département de Chimie de la Faculté des Sciences de Rabat, sous la direction du Professeur Mahjouba MOSADDAK. Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour lui exprimer ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ces années de recherches. Son expérience, sa patience et sa disponibilité m'ont été bénéfiques. Ses précieux conseils et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche. Qu'elle trouvera ici toute mon affection et mes remerciements pour sa présence permanente.

Ma plus profonde gratitude va au Professeur Abdelhak HAKIKI Directeur du Laboratoire des Substances Naturelles et Thermolyse-Eclair pour m'avoir honoré en acceptant de présider le Jury, c'était pour moi un avantage d'appartenir à son équipe de recherche.

J'exprime mes remerciements au Professeur El Mokhtar ESSASSI responsable de l'UFR Pharmacochimie pour m'avoir donné l'occasion de suivre mes études supérieures au sein de l'UFR ainsi d'avoir accepté de juger mon travail.

Je suis profondément reconnaissante au Professeur Mohammed BENCHIDMI pour sa contribution durant ma formation en DESA et qui a aimablement accepté de faire partie du jury.

Je tiens à remercier le Professeur Abdelmalek DAHCHOUR pour avoir bien voulu examiner et juger mon travail ainsi pour la qualité de son cours en DESA.

Mes vifs remerciements vont au Docteur Zakaria MENNANE qui a veillé sur le bon déroulement des tests antibactériens, sa disponibilité et sa manière de faciliter les tâches restent pour moi un exemple qui donne vie à la vie de la recherche scientifique ainsi d'avoir accepté de juger cette thèse.

J'adresse aussi mes sincères remerciements au Professeur Nour-Eddine ES-SAFI pour sa contribution à ma thèse comme rapporteur.

Je tiens à remercier également le Docteur Reda CHAROUF pour m'avoir accepté au sein du laboratoire de Bactériologie médicale de l'Institut National d'Hygiène de Rabat dans le cadre d'une convention de recherche entre notre laboratoire et l'INH.

Mes remerciements vont tout droit au Professeur Peter PROKSCH qui m'a accueilli chaleureusement dans son laboratoire à l'Institut Pharmaceutique de Biologie et de Biotechnologie à Dusseldorf en Allemagne, sa sympathie et ses précieuses discussions dans le domaine des produits naturels m'ont donné d'importantes idées durant mon séjour scientifique en Allemagne.

Je remercie profondément le Docteur Abdessamad DEBBAB pour le suivi qu'il a accordé à mon travail pendant mon stage au laboratoire pharmaceutique en Allemagne, le Docteur Amal ALY pour le suivi de l'étude de l'activité antioxydante, le Docteur Weam IBRAHIM pour son aide ainsi que tous les membres de laboratoire de l'institut pharmaceutique à Dusseldorf pour leurs soutient et leur esprit d'équipe très ouvert.

Egalement je remercie le Professeur Mohamed FENNANE, Botaniste à l'Institut Scientifique qui m'a aidé pour l'identification des plantes étudiées et le Professeur Ghita CHLIYEH pour son aide pour la réalisation des tests insecticides.

J'adresse un mot de reconnaissance à tous mes professeurs de DESA pour leur bonne formation à notre égard ainsi que pour la qualité de leurs cours.

J'ai une pensée à la mémoire de mon collègue Caleb Ahoya, ses encouragements, ses conseils resteront gravés pour toujours dans mon esprit.

Durant l'achèvement de mon travail, j'ai eu la chance de côtoyer des collègues qui m'ont aidé par leur présence à tout moment, à savoir : Dr Hanane Benzeid, Dr Rachid Bouhfid, Dr Pamphyle Abedi, Nezha Bouhaddou et toute ma promotion de DESA ainsi que mes ami(e)s, qu'ils trouveront ici l'expression de mes sincères gratitude.

Je remercie aussi messieurs El Mansouri et Mustapha pour leur aide au laboratoire ainsi que toute personne qui a attribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

## TABLE DES MATIERES

<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>I</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>11</b>
<b>PRESENTATION GENERALE.....</b>	<b>14</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>19</b>
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE CHIMIQUE ET VALORISATION DE L'ACTIVITE INSECTICIDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE TROIS ESPECES DE MENTHES QUI POUSSENT AU MAROC .....</b>	<b>20</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>21</b>
<b>I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>23</b>
I. 1. Plantes aromatiques et médicinales .....	23
I. 2. Evolution du secteur des plantes aromatiques et médicinales .....	23
I. 3. Description botanique des espèces étudiées .....	26
I. 3.1. <i>Mentha pulegium</i> L.: Menthe Pouliot ( <i>flio</i> ) .....	29
I. 3.2. <i>Mentha suaveolens</i> L. : Menthe à feuilles rondes ( <i>Timija</i> ou <i>merceta</i> ).....	30
I. 3.3. <i>Mentha piperita</i> L. : Menthe poivrée ( <i>naâna abdi</i> ) .....	31
I. 4. Les Huiles Essentielles, produits d'extraction des PAM .....	33
I. 4.1. Définition .....	33
I. 4.2. Répartition systématique et caractères chimiques .....	33
I. 4.2.1. Localisation des HE dans les tissus .....	34
I. 4.2.2. Caractères chimiques des HE.....	34
I. 4.3. Méthodes d'extraction des HE.....	36
I. 4.3.1. Entraînement à la vapeur .....	36
I. 4.3.2. Hydrodistillation simple.....	36
I. 4.3.3. Distillation à la vapeur saturée.....	36
I. 4.3.4. Hydrodiffusion .....	36
I. 4.3.5. Extraction par CO <sub>2</sub> super critique .....	37
I. 4.3.6. Extraction assistée par micro-onde .....	37
I. 4.4. Propriétés et utilisation des HE.....	37
I. 4.4.1. Antibactérienne .....	38
I. 4.4.2. Antivirale .....	38

I. 4.4.3. Antifongique .....	38
I. 4.4.4. Antiparasitaire.....	38
I. 4.4.5. Antiseptique .....	38
I. 4.4.6. Antioxydant.....	39
I. 5. Effet insecticide des HE.....	39
I. 5.1. Description de deux principaux <i>Coléoptères</i> des stocks.....	40
I. 5.1.1. <i>Sitophilus oryzae</i> : ( <i>S. oryzae</i> ) .....	40
I. 5.1.2. <i>Rhizopertha dominica</i> : ( <i>R. dominica</i> ).....	42
I. 5.2. Méthodes de lutte contre les insectes des denrées stockées.....	45
I. 5.2.1. Lutte chimique .....	45
I. 5.2.2. Lutte physique et mécanique .....	46
I. 5.2.3. Lutte biologique .....	47
<b>II. ETUDE CHIMIQUE DE L’HUILE ESSENTIELLE EXTRAITE DES TROIS MENTHES .....</b>	<b>49</b>
II. 1. Protocole d’extraction.....	49
II. 1.1. Extraction de l’huile essentielle par la méthode d’hydrodistillation .....	49
II. 1.2. Rendement obtenu .....	50
II. 2. Analyse chimique des HE étudiées .....	51
II. 2.1. Caractérisation par chromatographie en phase gazeuse .....	51
II. 2.1.2. Résultats et discussion de l’analyse par CPG .....	51
II. 2.2. Caractérisation par CPG-MS .....	53
II. 2.2.1. Résultats et discussion de l’analyse par CPG-MS.....	54
<b>III. EVALUATION DE L’ACTIVITE INSECTICIDE DES HUILES ESSENTIELLES DES TROIS MENTHES .....</b>	<b>57</b>
III. 1. Matériels et méthodes.....	57
III. 2. Résultats du test insecticide.....	59
III. 3. Discussion .....	62
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>65</b>
<b>DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DE L’ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ET ANTIOXYDANTE DE <i>CISTUS LADANIFERUS</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>71</b>
<b>I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>71</b>
I. 1. Aperçu sur <i>Cistus ladaniferus</i> .....	73
I. 2. Les microorganismes .....	77
I. 3. Techniques de détermination de l’activité antibactérienne.....	78
I. 3.1. Technique en milieu liquide.....	78
I. 3.2. Technique en milieu solide .....	79

I. 4. Pouvoir antioxydant .....	80
I. 4.1. Les radicaux libres .....	80
I. 4.2. Le stress oxydatif .....	83
I. 4.3. Revue sur l'activité antioxydante de <i>Cistus ladaniferus</i> .....	84
<b>II. PARTIE EXPERIMENTALE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE .....</b>	<b>87</b>
II. 1. Matériels et méthodes .....	87
II. 1.1. Matériels .....	87
II. 1.1.1. Les produits à tester .....	87
II. 1.1.2. Les souches bactériennes .....	90
II. 1.1.3. Les milieux de culture .....	91
II. 1.2. Méthodes .....	91
II. 1.2.1. Dilution des essais .....	91
II. 1.2.2. Test d'écouvillonnage.....	91
II. 1.2.3. La lecture des résultats .....	92
II. 1.2.4. Détermination de la CMI.....	93
II. 2. Résultats et discussion .....	94
II. 2.1. Diamètres d'inhibition .....	94
II. 2.2. La CMI de l'HE .....	96
II. 3. Discussion.....	97
<b>III. PARTIE EXPERIMENTALE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE .....</b>	<b>100</b>
III. 1. Matériels et méthodes.....	100
III. 1.1. Matériels.....	100
III. 1.2. La préparation de la solution .....	100
III. 2. Résultats .....	101
III. 3. Discussion .....	103
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>104</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>106</b>
<b>TROISIEME PARTIE : EXTRACTION ET ELUCIDATION DES STRUCTURES</b>	
<b>CHIMIQUES DE METABOLITES SECONDAIRES ISOLEES DES CHAMPIGNONS</b>	
<b>ENDOPHYTIQUES DE PLANTES MAROCAINES .....</b>	<b>111</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>112</b>
<b>I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>113</b>
<b>II. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>117</b>
II. 1. Matériels .....	117
II. 1.1. Matériel biologique.....	117
II. 1.2. Les solvants .....	117
II. 2. Méthodes .....	117

II. 2.1. Développement du champignon .....	117
II. 2.2. Extraction liquide-liquide .....	120
II. 2.3. Isolement et purification des métabolites secondaires .....	121
II. 2.4. Les méthodes chromatographiques de séparation .....	123
II. 2.4.1. La Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	123
II. 2.4.3. Chromatographie sur colonne.....	124
II. 2.4.4. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) .....	125
II. 2.4.4.1. HPLC préparative .....	125
II. 2.4.4.2. HPLC semi-préparative .....	126
II. 2.4.4.3. HPLC analytique (Dionex) .....	126
II. 2.5. Détermination de la masse moléculaire.....	127
II. 2.5.1. Spectrométrie de masse .....	127
II. 2.5.1.1. Spectrométrie de masse en mode d'ionisation par électrospray (ESI/MS) .....	127
II. 2.5.1.2. Chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse (LC/ESI- MS).....	128
II. 2.5.1.3. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) .....	128
II. 2.5.1.4. Spectrométrie de masse par la technique de bombardement d'atome rapide (FAB/SM).....	129
II. 2.6. Elucidation des structures .....	129
II.2.6.1. Résonance magnétique nucléaire RMN .....	129
II. 2.6.1.1. RMN à une dimension (1D).....	130
II. 2.6.1.1.1. La RMN du proton <sup>1</sup> H .....	130
II. 2.6.1.1.2. La RMN du carbone <sup>13</sup> C .....	130
II. 2.6.1.1.3. La technique NOE (Nuclear Overhauser Effect).....	130
II. 2.6.1.1.4. La technique DEPT (Distortionales Enhancement by Polarisation Transfer) .....	131
II. 2.6.1.2. RMN à deux dimensions (2D).....	131
II. 2.6.1.2.1. La technique <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY (Correlation Spectroscopy) .....	131
II. 2.6.1.2.2. La technique HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)...	131
II. 2.6.1.2.3. La technique HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) .....	132
II. 2.6.1.2.4. La technique ROESY (Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy) et la technique NOESY (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy) .....	132
II. 2.7. Activité biologique : Cytotoxicité .....	132
<b>III. RESULTATS .....</b>	<b>133</b>
III. 1. Identification du champignon.....	133
III. 2. Les composés isolés du champignon <i>Fusarium begoniae</i> .....	133
III. 2.1. Le Beauvericine (BN1) .....	134

III. 2.2. Le Z-Fusapyrone (BN2) .....	145
III. 2.3. L'Indole-3-acétate de méthyle (BN3) .....	152
III. 2.4. Indole-3-acide carboxylique (BN4) .....	160
III. 2.3. L'Acide 1, 2-Hydroxy-13-(hydroxyméthyl)-3,5,7-triméthyl-2,4- tétradécadiène-1,14-dioïque (BN5) .....	163
III. 3. Etude de la cytotoxicité .....	174
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>174</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>176</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>178</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>185</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>186</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC :	American Type Culture Collection
AcOEt :	Acétate d'éthyle
C. :	<i>Cistus</i>
BHI :	Breat Heart Infusion
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
CDCl <sub>3</sub> :	Chloroforme deutérié
CD <sub>3</sub> OD :	Méthanol deutérié
CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> :	Acétone deutérié
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
Cn :	Concentration (dose)
Conc :	Concentration
COSY :	Correlation spectroscopy H-H
d :	doublet
DCM :	Dichlorométhane
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DMSO-d <sub>6</sub> :	Diméthylsulfoxyde deutérié
dd :	doublet dédoublé
DEPT :	Distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EtOAc :	Acétate d'éthyle
ESI :	Electron spray ionisation
Ext :	Extrait
FAO :	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

FAB :	Fast atomic bombardement
<i>F.</i> :	<i>Fusarium</i>
Gram+ :	Gramme positive
Gram- :	Gramme négative
HR :	Humidité relative
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	Acide sulfurique
HE :	Huile essentielle
Hex :	Hexane
HMBC :	Heteronuclear multiple bond connectivity
HMQC :	Heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance
Hz :	Hertz
IE :	Impact électronique
IR :	Infrarouge
<i>J</i> :	Constante de couplage
LC :	Chromatographie liquide
LC/MS :	Chromatographie liquid couplée à la spectrométrie de masse
L.R.C :	Long range correlation
<i>M.</i> :	<i>Mentha</i>
m :	multiplet
MeOH :	Méthanol
MHA :	Milieu Hilton Agar
MTT :	Bromure de [3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium]
MS :	Spectrométrie de masse
m/z :	Masse par charge
NANOPur :	Ultra pur

OMS :	Organisation mondiale de la santé
PAM :	Plantes aromatiques et médicinales
Phe :	Phényle
ppm :	Parties par million
q :	quadruplet
<i>R.</i> :	<i>Rhizopertha</i>
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
ROESY :	Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
<i>S.</i> :	<i>Sitophilus</i>
s :	singulet
SM :	Spectre de masse
t :	triplet
TFA :	Acide trifluoroacétique
TR :	Temps de rétention
TMS :	Tetraméthylsilane
UFC :	Unité Mac Farland
UV :	Ultra Violet
VLC :	Chromatographie liquide sous vide
$\delta_C$ :	Déplacement chimique du carbone
$\delta_H$ :	Déplacement chimique d'hydrogène

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Les exportations marocaines de l'huile essentielle de menthe pouliot .....	25
<b>Tableau 2</b> : Rendement des HE .....	50
<b>Tableau 3</b> : Principaux composés chimiques de l'HE de <i>M. pulegium</i> (CPG) .....	52
<b>Tableau 4</b> : Principaux composés chimiques de l'HE de <i>M. suaveolens</i> (CPG).....	52
<b>Tableau 5</b> : Principaux composés chimiques de l'HE de <i>M. pulegium</i> (CPG-MS) .....	54
<b>Tableau 6</b> : Principaux composés chimiques de l'HE de <i>M. suaveolens</i> (CPG-MS) .....	55
<b>Tableau 7</b> : Principaux composés chimiques de l'HE de <i>M. piperita</i> (CPG-MS) .....	56
<b>Tableau 8</b> : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte <i>S. oryzae</i> après traitement par HE de <i>M. pulegium</i> .....	59
<b>Tableau 9</b> : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte <i>R. dominica</i> après traitement par HE de <i>M. pulegium</i> .....	59
<b>Tableau 10</b> : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte <i>S. oryzae</i> après traitement par HE de <i>M. suaveolens</i> .....	60
<b>Tableau 11</b> : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte <i>R. dominica</i> après traitement par HE de <i>M. suaveolens</i> .....	60
<b>Tableau 12</b> : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte <i>S. oryzae</i> après traitement par HE de <i>M. piperita</i> .....	61
<b>Tableau 13</b> : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte <i>R. dominica</i> après traitement par HE de <i>M. piperita</i> .....	61
<b>Tableau 14</b> : Les souches bactériennes utilisées .....	90
<b>Tableau 15</b> : Activité des différents extraits de <i>Cistus ladaniferus</i> (diamètre de la zone d'inhibition des cultures microbiennes en mm) .....	94
<b>Tableau 16</b> : La CMI de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i> .....	96
<b>Tableau 17</b> : Les déplacements chimiques et les corrélations de Beauvericine.....	136
<b>Tableau 18</b> : Les déplacements chimiques et les corrélations de Z-Fusapyrone .....	147
<b>Tableau 19</b> : Les déplacements chimiques et les corrélations COSY et HMBC de L'Indole-3-acétate de méthyle .....	154
<b>Tableau 20</b> : Les déplacements chimiques de la RMN <sup>1</sup> H de l'Indole-3-acide carboxylique	161

**Tableau 21** : Les déplacements chimiques de la RMN<sup>1</sup>H et la RMN<sup>13</sup>C du composé BN5. 165

**Tableau 22** : Pourcentage de la croissance des cellules cancéreuses ..... 174

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : <i>Mentha pulegium</i> .....	29
<b>Figure 2</b> : <i>Mentha suaveolens</i> .....	30
<b>Figure 3</b> : <i>Mentha piperita</i> .....	31
<b>Figure 4</b> : Structure chimique de quelques monoterpènes des huiles essentielles .....	35
<b>Figure 5</b> : <i>Sitophilus oryzae</i> .....	40
<b>Figure 6</b> : <i>Rhizopertha dominica</i> .....	42
<b>Figure 7</b> : Morphologie des Coléoptères .....	43
<b>Figure 8</b> : Appareillage de l'hydrodistillation .....	50
<b>Figure 9</b> : Test de l'activité insecticide des HE.....	58
<b>Figure 10</b> : Boîtes de pétri, contenant le blé infecté par <i>S. oryzae</i> .....	58
<b>Figure 11</b> : <i>Cistus ladaniferus</i> .....	76
<b>Figure 12</b> : Détermination directe de la CMI en milieu liquide .....	78
<b>Figure 13</b> : Antibiogramme de quelques antibiotiques .....	79
<b>Figure 14</b> : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie .....	82
<b>Figure 15</b> : Balance oxydative.....	83
<b>Figure 16</b> : Les structures chimiques de quelques flavonoïdes .....	85
<b>Figure 17</b> : Structure chimique du radical libre DPPH• .....	86
<b>Figure 18</b> : Extracteur Soxhlet.....	88
<b>Figure 19</b> : Schéma du protocole.....	89
<b>Figure 20</b> : Schéma représentant une zone d'inhibition .....	92
<b>Figure 21</b> : Des plaques pour la microtitration.....	93
<b>Figure 22</b> : Photos montrant des zones d'inhibition de la croissance bactérienne .....	95
<b>Figure 23</b> : Microplaque montrant la présence des souches bactérienne .....	96
<b>Figure 24</b> : Transformation de coloration de la solution DPPH.....	101

<b>Figure 25</b> : Activité antioxydante des extraits de <i>Cistus ladaniferus</i> .....	102
<b>Figure 26</b> : Structures chimiques de quelques produits médicinaux d'origine naturelle .....	114
<b>Figure 27</b> : Isolement et purification des champignons .....	118
<b>Figure 28</b> : Développement du champignon dans le riz.....	119
<b>Figure 29</b> : Extraction des métabolites secondaires .....	120
<b>Figure 30</b> : Protocoles d'isolement des métabolites secondaires BN1 et BN3 .....	121
<b>Figure 31</b> : Protocoles d'isolement des métabolites secondaires BN2, BN4 et BN5.....	122
<b>Figure 32</b> : Le spectre RMN du proton de Beauvericine BN1 .....	137
<b>Figure 33</b> : Le spectre RMN du carbone 13 du Beauvericine BN1 .....	138
<b>Figure 34</b> : Les corrélations COSY dans une subunité de Beauvericine BN1.....	139
<b>Figure 35</b> : Le spectre COSY déterminant les systèmes de spin de Beauvericine BN1 .....	140
<b>Figure 36</b> : Extension d'une partie de spectre COSY de Beauvericine BN1 .....	141
<b>Figure 37</b> : Le spectre HMBC de Beauvericine BN1.....	142
<b>Figure 38</b> : Les corrélations HMBC dans une subunité de Beauvericine BN1.....	143
<b>Figure 39</b> : Les principales corrélations H-C obtenues pour BN1 .....	144
<b>Figure 40</b> : Les corrélations COSY de Z-Fusapyrone BN2 .....	147
<b>Figure 41</b> : Le spectre COSY déterminant les corrélations H-H pour BN2.....	148
<b>Figure 42</b> : Les corrélations HMBC de Z-Fusapyrone BN2 .....	149
<b>Figure 43</b> : Spectre HMBC montrant les corrélations H-C pour BN2 .....	150
<b>Figure 44</b> : Spectre ROSEY de Z-Fuzapyrone BN2 .....	151
<b>Figure 45</b> : Spectre ROSEY: corrélation CH <sub>3</sub> -11/H-8 pour BN2 .....	151
<b>Figure 46</b> : Le spectre RMN du proton de l'Indole-3-acétate de méthyle BN3.....	155
<b>Figure 47</b> : Le spectre RMN du carbone de l'Indole-3-acétate de méthyle BN3.....	155
<b>Figure 48</b> : Le spectre de la RMN 2D : COSY pour BN3.....	156
<b>Figure 49</b> : Les corrélations COSY de L'Indole-3-acétate de méthyle BN3 .....	156

<b>Figure 50</b> : Le spectre de la RMN 2D : HMBC pour BN3 .....	157
<b>Figure 51</b> : Les différentes corrélations HMBC pour BN3 .....	158
<b>Figure 52</b> : Extension d'une partie du spectre HMBC pour BN3 .....	159
<b>Figure 53</b> : Les corrélations COSY pour BN4 .....	162
<b>Figure 54</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H pour BN5 .....	166
<b>Figure 55</b> : Spectre de la RMN du carbone pour BN5 .....	167
<b>Figure 56</b> : Le spectre RMN 2D : DEPT pour BN5 .....	168
<b>Figure 57</b> : Les corrélations H-H : COSY pour BN5 .....	168
<b>Figure 58</b> : Le spectre RMN 2D : COSY pour BN5 .....	169
<b>Figure 59</b> : Le spectre RMN 2D : HMBC pour BN5 .....	170
<b>Figure 60</b> : Le spectre RMN 2D : HMQC pour BN5 .....	171
<b>Figure 61</b> : Principaux corrélations observés en HMBC pour BN5 .....	171
<b>Figure 62</b> : Extension du spectre HMQC pour BN5 (principales corrélations) .....	172
<b>Figure 63</b> : Le spectre RMN 2D : ROESY pour BN5 .....	173

## **PRESENTATION GENERALE**

Dès son apparition, il y a trois millions d'années seulement, l'homme a utilisé les plantes à d'autres fins que pour se nourrir. Que la plante soit comestible ou toxique, qu'elle serve à tuer le gibier et l'ennemi ou à soigner, l'homme a découvert par une suite d'échecs et de réussites, l'utilisation des plantes pour son mieux-être. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux et le développement des sciences.

L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade. De nos jours entre 20.000 et 25.000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale [1].

Les extractions de différents produits se font sous différentes formes dont les plus importantes sont : les tisanes, la gélule de la plante, les suspensions intégrales de plantes fraîches, les teintures mères, les macérats glycélinés, et les huiles essentielles qui trouvent une forte utilisation dans le domaine environnementale à titre d'exemple les biopesticides, la sonnette d'alarme que lance les organismes qui s'intéressent à l'environnement va vers la suppression des insecticides chimiques synthétiques que leur utilisation a montré des inconvénients graves sur la santé des êtres vivants et sur la biosphère.

Les plantes aromatiques et médicinales ont des propriétés importantes, plusieurs médicaments pharmaceutiques ont été dérivés de plantes, ces derniers passent dans l'esprit de la population pour efficacité et tolérance du fait de son origine naturel faisant partie de la médecine douce [2].

Ces plantes naturelles ont joué un rôle très significatif dans la découverte des médicaments [3]. Il est reporté qu'au minimum 119 composés dérivés de 90 espèces de plantes peuvent être considérés comme des médicaments importants [4].

La reconnaissance de la valeur clinique, pharmaceutique et économique des médicaments à base de plantes, continue de croître, bien que celle-ci varie fortement selon les

pays. Chaque pays définit de différentes manières les plantes médicinales simples ainsi que les produits qui en sont tirés.

La croissance de l'industrie pharmaceutique et le développement incessant de nouveaux produits médicaux synthétiques et biologiques plus efficaces n'ont pas réduit l'importance de l'utilisation des plantes médicinales. Au contraire, la croissance démographique dans le monde en développement et l'intérêt croissant manifesté au niveau des nations industrialisées ont considérablement augmenté la demande spécifique aux plantes aromatiques et médicinales et à leurs produits dérivés.

Depuis leur découverte au début du XXème siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et ont contribué à l'essor de la médecine moderne [5]. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, la montée des résistances dues à la prescription immodérée et souvent inappropriée des antibiotiques ainsi que la résistance croissante des germes infectieux aux antibiotiques ont minimisé leur spectre d'inhibition vis-à-vis de quelques microorganismes [6],

La première manifestation de tensions antibiotiques résistantes pathogènes illustre notre besoin urgent de chercher des nouvelles sources alternatives de traitement, un nouveau discours du monde médical (universités, laboratoires de recherches et compagnies pharmaceutiques) se propage afin de réduire l'utilisation de ces produits synthétiques d'où, beaucoup de tentatives ont été faites dans ce contexte pour répertorier quelques plantes médicinales et leurs extraits [7], car à coté des antibiotiques connus, différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la synthèse de molécules odorantes contenues dans ce qu'on appelle les huiles essentielles ou essences connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique [8] et leur activité thérapeutique dans la médecine populaire [9].

La recherche des nouveaux agents thérapeutiques se lance fort, et l'objectif reste toujours de découvrir des armes thérapeutiques efficaces. Les produits naturels donc donnent une grande chance pour découvrir une médication effective contre les maladies qui n'ont pas été traitées, par l'effet thérapeutique directe, après une modification semi-synthétique ou bien par une nouvelle synthèse d'un modèle moléculaire à partir des produits naturels [10]. La

plupart des substances naturelles extraites des plantes aromatiques se présentent sous forme de mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines de composés en proportions variables et pouvant présenter des structures et des fonctions chimiques très variées.

L'analyse des constituants d'un mélange complexe naturel est réalisée de différentes manières en fonction du résultat recherché (analyse de routine ou étude approfondie), de la complexité du mélange ou de la nature des constituants qui le composent (volatils ou non). Pour cela, de nombreuses techniques analytiques sont aujourd'hui disponibles, la démarche adoptée pour l'analyse des constituants d'un mélange complexe naturel est différente, suivant qu'il s'agit d'identifier des composés connus et dont les caractéristiques spectrales sont disponibles ou lorsque l'objectif est l'élucidation d'une structure non décrite dans la littérature. Il est souvent nécessaire de combiner les techniques d'analyses si l'on veut garantir un résultat exact. En revanche, si le mélange contient soit des molécules nouvelles soit des composés dont les données spectrales n'ont été que partiellement décrites dans la littérature, une autre approche est souvent envisagée. Elle nécessite le fractionnement jusqu'à la purification des composés par les différentes techniques chromatographiques, en vue de les identifier par les méthodes spectroscopiques traditionnelles employées pour les études structurales (spectrométrie de masse, spectroscopie infra-rouge, ultra-violet et Résonance Magnétique Nucléaire du proton et du carbone-13...).

Cette démarche est sans aucun doute plus longue à mettre en œuvre mais aussi plus fiable, en partie grâce à la RMN du carbone-13 qui apporte des informations extrêmement précieuses sur le squelette carboné de la molécule.

Parallèlement, l'utilisation de la RMN du carbone-13 comme outil analytique a connu ces dernières années un essor important dans plusieurs domaines. Ainsi, une nouvelle méthode d'identification des constituants des mélanges complexes naturels, par RMN du carbone-13, a été mise au point sans séparation préalable [11] dont le principe repose sur la comparaison, assistée par un logiciel d'aide à l'identification, des raies de résonance du spectre du mélange avec celles de composés purs contenus dans une bibliothèque de spectres de référence. Elle est particulièrement intéressante car elle permet de prendre en compte des informations intrinsèques du squelette carboné des molécules (déplacement chimique des carbones). Cette technique permet l'analyse de molécules quels que soient leur squelette et leur fonctionnalisation, incluant les molécules thermosensibles et les stéréoisomères difficilement différenciables par les techniques conventionnelles. Elle a été appliquée avec

succès à diverses familles de produits naturels comme les huiles essentielles, les extraits végétaux ou bien encore les huiles végétales [12].

L'intérêt que présentent toujours les plantes aromatiques et médicinales et qui trouvent application dans divers domaines à savoir industriel, médical, pharmaceutique et agricole nous a poussé à continuer des recherches initiées depuis longtemps par l'équipe de notre laboratoire afin de contribuer aux demandes incessantes de nouveaux découverts dans le domaine de la science, de mettre en évidence de nouveaux produits naturels sans conséquence sur l'homme et sur son environnement. C'est dans ce contexte que l'objectif de notre travail de thèse se fait sur quelques plantes médicinales marocaines très utilisées par la population dans les pratiques quotidiennes.

La première partie de ce travail consiste à tester l'effet insecticide de l'huile essentielle extraite de trois espèces de menthes afin de trouver une bonne alternative pour l'utilisation des insecticides chimiques. Les travaux ont été consacré à l'extraction des huiles essentielles de trois menthes marocaine : *Mentha pulegium*, *Mentha suaveolens* et *Mentha piperita*, à leur étude par CPG et par la CPG-MS et ensuite à l'évaluation de leur activité insecticide sur deux espèces de coléoptères ravageurs des denrées alimentaires stockées : *Sitophilus oryzae* et *Rhizopertha dominica*.

L'objectif de la deuxième partie de notre travail est d'explorer l'activité antibactérienne et antioxydante de *Cistus ladaniferus*, plante médicinale qui pousse spontanément dans la région d'Oulmes au Maroc et qui est très utilisée par la population locale pour traiter divers malaises et plus précisément les maux de l'estomac. Pour se faire, nous avons préparé l'huile essentielle et les extraits de cette plante par différents solvants, puis nous avons testé son pouvoir à inhiber la croissance de 14 souches bactériennes pathogènes et ceci en mesurant le diamètre des zones d'inhibition obtenus. Nous avons ensuite évalué l'activité antioxydante de quelques extraits de *Cistus ladaniferus*, et nous avons testé leur capacité à piéger les radicaux libres par estimation au moyen de DPPH.

Dans la dernière partie du travail, nous avons consacré nos recherches à l'isolement, à la purification et à l'élucidation des structures des métabolites secondaires produits lors de culture des champignons endophytiques extraits de la plante médicinale marocaine *Aristolochia paucinervis* par les différentes techniques chromatographiques ainsi que par les différentes méthodes spectroscopiques modernes de la RMN à une et à deux dimension et par

la spectroscopie de masse. Nous avons enfin testé les produits purs obtenus et identifiés sur des cellules cancéreuses du lymphome des souris pour déterminer leur activité anticancéreuse.

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Dossevi L. M. et Essou J. P., (2011). Utilisation de quelques plantes médicinales en alimentation humaine et/ou animale au Sud Benin. *Journal de la Recherche Scientifique de l'Université de Lome*, 13 (1).
- [2]. Hami H., Soulaymani A., Skalli S., Mokhtari A., Sefiani H. et Soulaymani R., (2011). Poisoning by *Atractylis gummifera* L. Morocco poison control center data, *Bultin de la société de Pathologie Exotique*, 104 (1) : 53-57.
- [3]. Newman D. J. and Cragg G. M., (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *J Nat Prod*, 70 (3) : 461-77.
- [4]. Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. and Guo Z., (1985). Medicinal plants in therapy, *Bull World Health Organ*, 63 (6) : 965-81.
- [5]. Bovet D., (1989). Une chimie qui guérit : Histoire de la découverte des sulfamides, Payot, coll. « Médecine et sociétés » p 322.
- [6]. Antoniadou A., (2007). Impact of an antibiotic restriction policy on the antibiotic resistance patterns of Gram-negative microorganisms in an Intensive Care Unit in Greece, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30 (4) : 360–365.
- [7]. Rakholiya K., (2013). Medicinal Plants as Alternative Sources of Therapeutics against Multidrug-Resistant Pathogenic Microorganisms Based on Their Antimicrobial Potential and Synergistic Properties, Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components, 165–179.
- [8]. Saltan Çitoglu G. and Altanlar N., (2003). Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine, *J. Fac. Pharm, Ankara*, 32 : (3) 159-163.
- [9]. Fabricant D. S. and Farnsworth N. R., (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*, 109 (Suppl 1) : 69–75.
- [10]. Cragg G. M., Newman D. J. and Snader K. M., (1997). Natural products in drug discovery and development, *J Nat Prod*, 60 (1) : 52-60.
- [11]. Paolini J. et al., (2008). Detailed analysis of the essential oil from *Cistus albidus* L. by combination of GC/RI, GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy, *Natural Product Research*, 22 (14) : 1270-1278.
- [12]. Khadri A. et al., (2008). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC–mass spectrometry and <sup>13</sup>C NMR, *Food Chemistry*, 109, (3) : 630–637.

---

**PREMIERE PARTIE : ETUDE CHIMIQUE ET VALORISATION  
DE L'ACTIVITE INSECTICIDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE  
TROIS ESPECES DE MENTHES QUI POUSSENT AU  
MAROC**

## INTRODUCTION

Avec la révolution dans le domaine agro-alimentaire, l'espèce humaine doit maximiser sa production alimentaire afin d'assurer une alimentation adéquate de la population mondiale. Pour ce faire, elle doit réduire l'abondance des espèces animales qui sont en compétition alimentaire avec elle. Parmi ces animaux, les invertébrés dont les insectes représentent le groupe le plus diversifié et le plus riche en nombre d'espèces.

Les insectes ravageurs des denrées alimentaires stockées peuvent causer des pertes importantes en réduisant la qualité et/ou la quantité des produits stockés. D'après l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture (FAO), les pertes dues aux insectes nuisibles correspondent à 35% de la production agricole mondiale [1]. Il est plus utile et plus rentable d'assurer une bonne conservation des récoltes que de compenser les pertes par une augmentation de la production.

En raison de son efficacité et de son application facile et pratique, l'utilisation d'insecticides chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les insectes nuisibles. Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces insecticides a provoqué une contamination de la biosphère et de la chaîne alimentaire, une éradication des espèces non cibles telle que la faune auxiliaire ainsi que l'apparition d'insectes résistants. Ces dangers ont conduit l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à interdire l'usage de certains insecticides chimiques, d'autres vont être prohibés dans un futur proche [2, 3].

D'après une enquête agrochimique sur l'utilisation de pesticides dans le périmètre Loukkos, il a été montré que la lutte chimique en agriculture est assurée par environ 80 matières actives appartenant à 10 familles chimiques avec une répartition de 64% de fongicides, 19% d'insecticides, 14% d'herbicides et 3% d'acaricides. L'enquête a rassemblé des informations sur la dégradation de l'environnement suite à l'utilisation massive de ces pesticides [4].

Il est donc nécessaire de poursuivre la recherche de molécules nouvelles en prenant en considération d'autres critères que l'efficacité. Cette recherche s'est orientée vers la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles actives, non polluantes et s'utilisant dans une lutte moins nocive et plus raisonnée. La lutte biologique prend diverses formes, mais celle

qui retient l'attention des chercheurs à l'heure actuelle est la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles d'origines végétales.

Les plantes sont indispensables tant pour l'alimentation (blé, maïs, pomme de terre), les soins de santé (thym, citron, menthes, lavande), les vêtements (coton, chanvre), la construction (bambou, hévéa) que pour la purification de l'air et de l'eau [5]. L'ensemble des «services» rendus par la biodiversité végétale, notamment dans la régénération des écosystèmes en font un élément essentiel pour l'humanité. Cela est particulièrement vrai pour les plantes médicinales qui, en tant que part importante de cette biodiversité, sont largement utilisées par les humains en plus de constituer une richesse culturelle et naturelle propre à chacune des communautés et aux territoires qu'elles occupent.

Les plantes se défendent par divers moyens physiques et chimiques en synthétisant des métabolites secondaires extraordinairement diversifiés. De nombreuses molécules, qui présentent une action défensive du végétal contre les ravageurs, ont été identifiées. Ainsi plus de 2000 espèces végétales dotées de propriétés insecticides ont été répertoriées [6].

Les molécules du métabolisme secondaire des plantes appartiennent à des familles chimiques très diverses telles que les alcaloïdes, les phénols, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes. Les Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) constituent une véritable banque de ces molécules chimiques.

Etant donné l'importance aux menthes dans le monde et l'intérêt porté par la population marocaine à leur utilisation, nous nous sommes intéressés à l'étude chimique et à la valorisation du potentiel insecticide de trois menthes marocaines : *Mentha puligium*, *Mentha suaveolens* et *Mentha piperita* sur deux insectes ravageurs des denrées alimentaires stockées *Sitophilus oryzae* et *Rhizopertha dominica* qui sont considérés comme des principaux insectes ravageurs des denrées alimentaires stockées causant des dégâts importants au Maroc comme dans d'autres pays du monde, cette étude pourra servir pour la mise au point d'insecticides d'origine végétale : des Bioinsecticides.

Cette partie est consacrée à l'extraction de l'HE des trois menthes et à leur étude qualitative et quantitative par CPG-SM. Ce travail est complété par l'étude de l'activité insecticide des menthes étudiées sur deux insectes ravageurs.

## **I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **I. 1. Plantes aromatiques et médicinales**

Une plante médicinale est une plante que l'on cultive ou que l'on cueille dans son milieu naturel pour ses propriétés médicinales. L'être humain utilise des plantes depuis des milliers d'années pour traiter divers maux, le monde végétale est à l'origine d'un grand nombre de médicaments. Récemment, des chercheurs ont estimé qu'il existe environ 400 000 espèces de plantes dans le monde, dont environ le quart ou le tiers ont été utilisées par les sociétés à des fins médicinales [7, 8].

Dans plusieurs pays en voie de développement, une grande partie de la population fait confiance à des médecins traditionnels et à leurs collections de plantes médicinales pour se soigner. Les PAM ont eu une infinie diversité d'emplois, à signaler le domaine thérapeutique, alimentaire, cosmétique, industriel, etc.

Situé à l'angle Nord-ouest du continent Africain entre 21° et 36° de latitude de Nord et entre le 1er et le 17ème degré de longitude Ouest, le Maroc jouit d'une position privilégiée avec une façade maritime de 3446 Km de long s'ouvrant sur la méditerranée et l'océan atlantique. Cette position géographique particulière confère au Maroc une gamme exceptionnelle de bioclimat très varié allant de l'humide et de sub-humide au saharien et désertique en passant par l'aride, le semi-aride et le climat de haute montagne dans le Riff, le moyen et le haut atlas où les altitudes dépassent respectivement 2500, 3000 et 4000 m [9].

Tous ces facteurs accordent au Maroc une large bande de végétation très variée notamment les PAM dont plusieurs dizaines d'espèces existant à l'état spontané (Armoise, Romarin, Menthe Pouliot, Thym, Origan, etc.) ou en culture (Rosier, Verveine, Jasmin, Lavande, Menthe Verte, etc.) [10].

### **I. 2. Evolution du secteur des plantes aromatiques et médicinales**

Au Maroc, les PAM occupent une place très importante dans la médecine traditionnelle, qui elle-même est largement employée dans divers problèmes de santé. Les remèdes utilisant les PAM sont considérés comme : moins chères, sans effets indésirables et

ont tendance à être plus employés dans les maladies chroniques telles que le diabète, les rhumatismes, les cancers, etc.

Plus de la moitié de la production mondiale des PAM est assurée par les pays en développement. Cette situation s'explique par le déplacement de la production d'un nombre important d'espèces des pays industrialisés vers les pays à faible coût de main d'œuvre. Cependant, les pays développés continuent à dominer les productions reposant sur les technologies avancées pour compenser l'avantage comparatif lié au coût de main d'œuvre.

On distingue globalement trois types de pays producteurs de PAM et de leurs produits dérivés:

1. Les pays soutenus par un important marché intérieur (Chine, Inde, Indonésie,...) et qui profitent généralement d'une main d'œuvre bon marché et d'une activité de recherche-développement dynamique. Profitant des grands espaces, de main d'œuvre peu coûteuse, et d'un potentiel de consommation de marché intérieur important, l'Inde et la Chine ont le statut de leaders mondiaux pour certaines espèces. Grâce à l'activité recherche-développement, ils sont devenus des concurrents redoutables sur des produits typiquement méditerranéens comme l'origan, le basilic, ... ;

2. Les pays tournés essentiellement vers le marché international et disposant à leur tour, de main d'œuvre à faible coût et de biomasse abondante à l'état spontané. Le Maroc qui fait partie de cette catégorie exporte l'intégralité de sa production alors que les besoins pour sa consommation intérieure sont importés. Ces pays puisent dans une végétation spontanée et souvent abondante et subissent les aléas du marché international. Ils sont confrontés à de sérieux handicaps tant au niveau technologique et scientifique, dû aussi bien au faible niveau de recherche-développement, qu'à celui de l'organisation de leur système de production ;

3. Les pays industrialisés qui produisent à grande échelle arrivent à assurer le tiers de la production mondiale des Huiles Essentielles. Ils occupent une place de choix sur la scène internationale des PAM et disposent d'avantages comparatifs certains liés à la maîtrise de la technologie. Ils tirent profit d'une agriculture intensive soutenue par une forte activité recherche-développement. Les pouvoirs publics et les organisations professionnelles encouragent et apportent leur appui à ce secteur [11].

Par ailleurs, l'exploitation et le commerce des PAM au Maroc représentent, pour plusieurs familles dans la campagne et en ville, une source de revenu non négligeable, pour s'en apercevoir, il suffit de constater l'épanouissement du marché des PAM et la multiplication des vendeurs des PAM et/ou des produits cosmétiques à bases de plantes. Vu le développement rapide de la population, les besoins en produits aromatiques d'origine végétale, que ce soit simplement un matériel végétal ou les produits de transformation, ont augmenté d'une façon considérable.

Si on prend par exemple la menthe pouliot, c'est une plante très connue au Maroc, sa distillation a commencé au Maroc sous le protectorat [12], les exportations de l'huile essentielle de la menthe pouliot a connu une forte chute entre 1980 et 2000, le tableau qui suit représente les chiffres de ces exportations [13].

**Tableau 1** : Les exportations marocaines de l'huile essentielle de menthe pouliot

<b>Année</b>	<b>Exportations</b>	<b>Prix</b>
1960	100 Tonnes/an	
1977 - 1979	2 à 3 T/an (chute très importante)	30 DH/Kg
1984 -1995		1500 DH/Kg
1996	2 à 30 T/an (la production a été fortement tributaire des conditions climatiques)	460 DH/Kg

Cette situation appelle des remarques importantes :

- La chute de la demande au cours des années 70 est structurelle : une partie importante de la production d'HE de menthe pouliot était destinée à la transformation de la pulégone en menthol. Avec le développement de grandes cultures de menthe à menthol surtout la menthe japonaise ou *Mentha arvensis* a détruit cette industrie et donc réduit fortement la demande sur la menthe pouliot. Par conséquent, même un produit ancien et classique peut s'éliminer du marché si ses utilisateurs sont centrés sur un ou même deux produits. On ne peut pas établir un projet sur un produit de ce type même si le marché était, à un moment donné, prometteur.

- L'amélioration de la demande, à partir de 1984, s'explique par l'introduction de l'HE de la menthe pouliot dans certaines préparations pharmaceutiques probablement comme aromatisant. Le choix de cette essence s'expliquant au départ, entre autre, par le prix du

produit. Mais, le passage en 10 ans, de 30 DH environ à plus de 1500 DH détruit tout l'avantage du produit. Il est hors question que les choses puissent durer plus longtemps. L'utilisateur supportera les frais jusqu'au jour où il trouve le moyen de délaisser le produit, et s'il le fait c'est pour toujours : l'histoire montre qu'un produit qui sort d'une formule n'y revient jamais.

- Les professionnels marocains sont malheureusement encore trop souvent plus spéculateurs que les industriels. A 100 DH/Kg l'HE est très largement rentable. A ce prix on peut très bien cultiver la menthe pouliot pour répondre régulièrement à la demande du marché. En maîtrisant les prix dans des limites raisonnables on aurait pu élargir le champ d'utilisation de l'essence de menthe pouliot. Cette production, modeste par rapport aux grands marchés agricoles, serait bien acceptée puisque l'on cultive une plante alimentaire, certes, mais qui fait un grand détour par l'industrie du parfum et de la chimie fine.

Les menthes étaient utilisées à des fins thérapeutiques au 16<sup>ème</sup> et 17<sup>ème</sup> siècle [14], actuellement elles sont employées dans plusieurs domaines. En thérapeutique, la menthe s'utilise contre la fièvre, la faiblesse, la toux, les nausées, les maux de l'estomac, la mélancolie, les maladies de poitrines, l'hystérie, les troubles de la vue [15, 16], elle présente aussi des propriétés médicales, on cite à titre d'exemple : stimulante du système nerveux, tonique, stomachique, antiseptique, analgésique, vermifuge [17, 18]. On l'utilise aussi contre les parasites, les tiges et les fleurs de la menthe sont brûlés pour chasser les puces des matelas et des animaux domestiques, on peut aussi placer les sachets de menthe auprès des sacs de grains et de fromage pour chasser les rongeurs.

Dans le domaine alimentaire, on peut citer les besoins d'arômes, les crèmes, les chocolats, les bonbons, les pâtes à mâcher, les desserts, etc. [19].

### **I. 3. Description botanique des espèces étudiées**

Certains produits, pour être utilisés dans l'industrie notamment l'industrie aromatique, doivent être optiquement purs. Les produits de synthèse sont souvent des racémiques, la technologie de leur préparation est compliquée et le coût est élevé. Par contre les produits naturels sont souvent optiquement purs ou au moins avec un excès énantiomérique important Ils sont recherchés entre autres pour cette qualité [20].

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, font partie de ce grand cortège de substances, ce sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des *Lamiaceae* [21].

Les Menthes conservent depuis l'antiquité une infinie diversité d'emplois et occupent une large place dans la thérapeutique. Elles fortifient tout le système des nerfs, donnant la vigueur aux uns pour mouvoir l'acuité, aux autres pour sentir, mais non pour souffrir. Stimulant diffusible et aussi un sédatif diffusible, la Menthe rend d'éminents services contre la nervosité et les différentes manifestations nerveuses.

Sur le plan des principes chimiques, la plupart des espèces de Menthe doivent leur odeur et activité à leurs huiles essentielles ou Essences de Menthe [22]. Ces essences très odoriférantes ont un intérêt industriel important. Elles sont souvent extraites des plantes de la race cultivée avec de bons rendements.

Au Maroc, la Menthe se rencontre dans presque toutes les régions soit à l'état spontané ou cultivé. Autant les Menthes sont faciles à reconnaître à leur odeur tout à fait caractéristique, autant elles sont difficiles à distinguer les unes des autres, en raison des formes intermédiaires, d'origine hybride, qui les relie. Différents documents sur les plantes du Maroc rapportent la présence de 10 espèces de menthe dont trois sont cultivées : 1) *M. spicata* L. = *M. viridis* L., 2) *M. piperita*, (L.) Hude et 3) *M. pulegium* L., et sept espèces spontanées : 1) *Mentha aquatica* L., 2) *M. cervina* L., 3) *M. gattefossei* Maire, 4) *M. longifolia* (L.) Huds. = *M. sylvestris* L., 5) *M. niliaca* Jacq, 6) *M. suaveolens* Ehrh.

Ce sont toutes des plantes vivaces herbacées de la famille des Labiées. Elles sont en général des plantes alimentaires, aromatiques et médicinales : rafraîchissantes, toniques, anesthésiques, anti-septiques, anti-spasmodiques, antalgiques, fébrifuges, bactéricides, etc... De même, elles éloignent les pucerons, et sont donc utiles pour protéger d'autres cultures. En usage externe, les feuilles de menthe soulagent des piqûres d'insectes : frotter quelques feuilles de menthe fraîche sur la piqûre de guêpe par exemple.

De toutes ces espèces, quatre sont assez utilisées au Maroc :

1) la menthe verte (*Mentha viridis* L. = *M. spicata* L.), appelée localement « *Naanaa* ». Elle est également appelée menthe marocaine, menthe douce, menthe crépue, menthe crispée, menthe baume ou menthe romaine. Elle est cultivée au Maroc sur plus de

3000 ha. Elle est glabre, d'une odeur agréable, pouvant atteindre un mètre de hauteur. Elle est pourvue de rhizomes et de stolons qui assurent sa multiplication végétative. Le feuillage est habituellement vert profond mais les jeunes feuilles sont généralement plus claires. Les feuilles sont gaufrées, subsessiles, lancéolées, dentées, vertes sur les 2 faces. Les fleurs généralement blanches sont groupées en épis terminaux.

Au Maroc, le thé à la menthe est une boisson très populaire, car il est servi chaud et donc étonnamment rafraîchissant durant toute l'année et particulièrement en été. A noter que la culture de la menthe est localisée dans les ceintures vertes des villes qui donnent aux cultivars leur nom vernaculaire : « Menthe Brouj », « Menthe Tamaris », « Menthe Ziani », « Menthe Abdi », « Menthe Meknassi », « Menthe Tiznit », etc.

Les analyses chimiques au Maroc ont révélé la présence de carvone (50 à 70% d'huiles essentielles), limonène (11 à 21%), etc. [23]. Ces huiles sont employées dans l'industrie pharmaceutique et dans la composition de confiseries et de liqueurs. Elles sont utilisées dans l'aromatization des crèmes dentifrices, des chewing gums, des boissons rafraîchissantes, etc. Des unités de production d'huiles essentielles à partir de la menthe (tiges et feuilles) et d'autres plantes aromatiques et médicinales existent au Maroc. D'ailleurs, une nouvelle unité a ouvert ses portes en 2008 à Guisser dans la province de Settat.

2) La menthe pouliot (*Mentha pulegium L.*), appelée localement « Fliou », est également appelée pouliot, pouliot royal, herbe aux puces, chasse puce, herbe de Saint Laurent ou frétillet. Elle pousse dans les lieux humides des plaines et des montagnes jusqu'à 2200 mètres d'altitude. Elle produit la pulégone (80 à 88% des huiles essentielles), limonène, etc. [23].

3) La menthe poivrée (*Mentha piperita*), nom local : « Naanaa labdi », est appelée aussi la menthe anglaise. C'est un hybride stérile, issu du croisement entre *Mentha aquatica* et *Mentha viridis*. Les études au Maroc ont montré que la menthe poivrée est riche en linalol (53% des huiles essentielles), acétate de linalyle (15%), etc. [23].

4) La menthe à feuilles rondes (*Mentha suaveolens*), nom local : « Timijja ». Elle n'est pas cultivée au Maroc, mais pousse spontanément dans les lieux humides aussi bien dans les plaines que dans les montagnes. La sous espèce *timija* est endémique dans le Haut Atlas

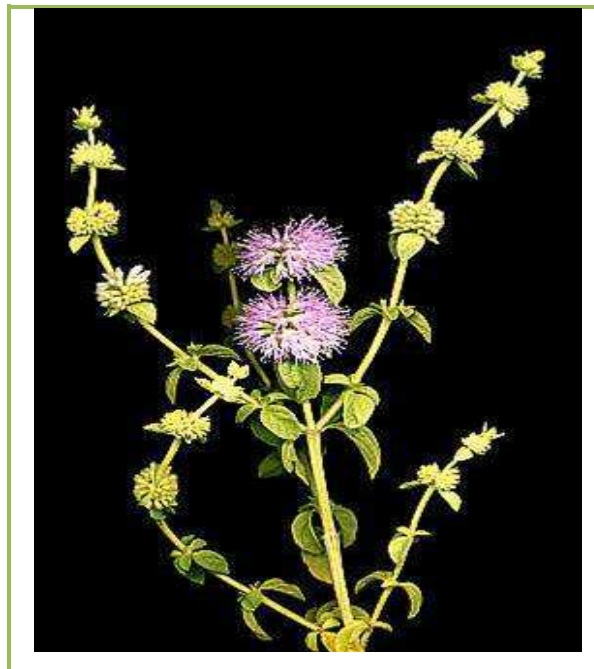
jusqu'à 2600 mètres d'altitude, alors que la sous espèce *eu-rotundifolia* se trouve dans plusieurs régions du pays [24].

Parmi tous les labiées, les Menthes se reconnaissent, en plus par leur odeur spéciale, par leurs fleurs très petites, leurs corolles presque régulières à quatre lobes presque égaux et leurs quatre étamines également presque égales. Les principales caractéristiques de ces espèces sont :

- une tige quadrangulaire.
- des feuilles simples et opposées.
- l'odeur caractéristique qui se dégage par simple touché.
- forte contenance en huile essentielle.
- la facilité pour utilisation.

Les plantes sur lesquelles nous avons travaillé sont : *Mentha pulegium*, *Mentha suaveolens* et *Mentha piperita*, toutes sont d'origine de la région de Zaâr, la récolte a été faite manuellement et les menthes ont été acheminés vers notre laboratoire à Rabat.

### **I. 3.1. *Mentha pulegium* L.: Menthe Pouliot (*flio*)**



**Figure 1 :** *Mentha pulegium*

La plante entière, s'utilise en inhalation, en infusion ou en décoction dans du lait ou du thé, est conseillé en cas de refroidissements, de rhume, de grippe, de bronchite, de toux et de

douleurs abdominales [25]. Elle est très répandue au Maroc particulièrement entre les régions de Marrakech et Azrou, c'est une plante fertile dont la descendance semble assez homogène, se distingue des autres menthes par son port étiré, ses tiges en partie couchées sur le sol, ses fleurs rosées disposées au long de la tige et des rameaux, le calice est obturé par les poils convient. La plante peut atteindre entre 10 et 50 cm de hauteur.

**I. 3.2. *Mentha suaveolens* L. : Menthe à feuilles rondes (*Timija* ou *merceta*)**



**Figure 2 :** *Mentha suaveolens*

*Mentha suaveolens* ou la menthe à feuilles rondes est une plante vivace que l'on trouve fréquemment au bord des chemins, dans les fossés ou autres lieux humides. Elle appartient à la famille des *Labiées*. La décoction des feuilles est très appréciée dans le traitement des douleurs gastriques, des diarrhées, des refroidissements et des affections respiratoires, en cataplasme ou en inhalation, les feuilles sont recommandées en cas de fièvre [25].

Elle ne pose pas de problème de détermination en raison de la forme de ses feuilles rondes, épaisses et ridées. La tige, typique des *Labiées*, est à section carrée. L'ensemble de la plante est couvert de poils denses et blanchâtres qui la rendent douce; comme toutes les menthes, elle dégage une forte odeur caractéristique qui chez cette plante rappelle la pomme. Les petites fleurs sont rassemblées en épis terminant les rameaux. La hauteur de la plante est de 25 à 80 cm, la fleur fait 5 mm de long.

**I. 3.3. *Mentha piperita* L. : Menthe poivrée (*naâna abdi*)**



**Figure 3 :** *Mentha piperita*

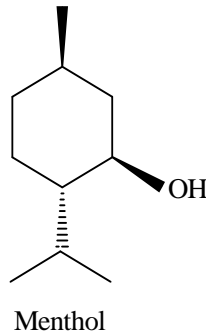
C'est une plante vivace qui fait partie de la famille des *Labiées*, et du groupe systématique dicotylédones. La menthe poivrée (*Mentha piperita*) est une plante communément cultivée en Europe et en Amérique du Nord. L'huile et les feuilles séchées sont employées à des fins médicinales. La menthe poivrée sert au traitement de la nausée, de la diarrhée et du syndrome du côlon irritable. Elle est souvent combinée à d'autres substances végétales employées pour le traitement des problèmes digestifs.

Les cultivars rattachés à *M. piperita* L. forment des chémotypes type menthol et linalool du fait de la composition chimique de leurs huiles essentielles. La CPG montre qu'à côté de plusieurs constituant mineurs, la *M. piperita* L. à menthol contient le (-) menthol (36,7%) et (-)-menthone (24% comme constituants majoritaires).

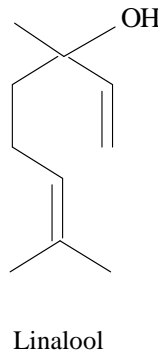
Ces deux constituants se trouvent à l'état de trace dans l'HE de *M. piperita* L. à linalool, ce dernier (62.72%) constitue avec son acétate (20.79%) les composés majoritaires.

B. Mosaddak [23] a montré qu'au Maroc, la menthe poivrée existe sous forme de deux chémotypes:

- Celui dont l'HE est constituée principalement de monoterpènes caractéristiques de la menthe poivrée type menthol et ces dérivés et qui est identifiée comme étant *M.piperita* L.



• Quant à l'autre, elle est caractérisée par son odeur de citron grâce à sa haute teneur en linalool et son acétate.



On peut généralement se procurer de l'huile de la menthe poivrée. Le produit se présente parfois sous forme de pilules appelées Colpermin, qui ont un revêtement gastro-résistant protégeant l'estomac. La menthe poivrée peut irriter l'estomac, notamment si elle est prise en fortes doses ou lorsque l'estomac est vide [26].

Les exigences de la culture de cette plante sont : Température : la menthe craint les basses températures, elle entre en repos végétatif pendant l'hiver. Il est possible qu'elle ait besoin du froid, mais si le sol gelé profondément et longtemps, il peut y avoir une destruction mécanique des racines. Sol : elle peut être cultivée dans tous les sols sauf dans les terres trop argileuses, humides et froides en hiver. Altitude : la menthe poivrée peut être cultivée en climat montagnard, tempéré, humide jusqu'au 900-1000 m d'altitude et en climat montagnard méditerranéen, à condition d'arroser pendant la sécheresse d'été [27].

## **I. 4. Les Huiles Essentielles, produits d'extraction des PAM**

### **I. 4.1. Définition**

Ce sont des extraits volatils et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et donnent naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'Aromathérapie.

Au point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes. Les Huiles essentielles (HE) sont constituées de différents composants terpènes, esters, cétones, phénols, et d'autres éléments.

Les HE doivent leur nom à ce qu'elles sont très réfringentes, hydrophobes et lipophiles. Elles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille. Par contre, elles sont solubles dans les solvants des lipides (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) et dans l'alcool.

A ces caractères de solubilité se limite la ressemblance avec les huiles grasses. Si les HE forment une tache transparente sur le papier, celle-ci disparaît rapidement car les essences végétales sont très volatiles (contrairement aux résines qui, habituellement dissoutes dans les essences, laissent un résidu visqueux ou solide après évaporation des essences). Grâce à cette propriété, les essences végétales diffusent rapidement au travers des épidermes, même au travers des cuticules épaisses et se répandent dans l'atmosphère. Ce caractère, associé à la propriété qu'ont la plupart des essences végétales de posséder une odeur très prononcée, et souvent agréable, les rend responsables de l'odeur caractéristique de nombreux végétaux odoriférants [28].

### **I. 4.2. Répartition systématique et caractères chimiques**

Les HE n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles groupent et en particulier les *Labiées* (Thym, Menthe, Lavande, Origan,

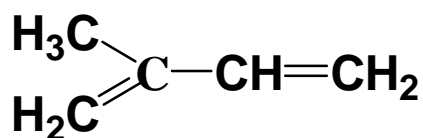
Sauge, etc.), les *Ombellifères* (Anis, Fenouil, Angélique, Cumin, Coriandre, Persil, etc.), les *Myrtacées* (Myrthe, Eucalyptus), les *Lauracées* (Camphrier, Laurier-sauce, Cannelle) [28].

#### **I. 4.2.1. Localisation des HE dans les tissus**

Les HE peuvent s'accumuler dans des cellules isolées qui se distinguent des cellules banales par leur teinte plus jaune et leurs parois épaisses, légèrement subérifiées. C'est le cas chez les *Lauracées*. Elles peuvent former de fines gouttelettes parsemant le protoplasme de cellules épidermiques (épiderme supérieur des pétales de Rose). Mais généralement les épidermes des pétales de fleurs odorantes ne contiennent pas de grosses réserves d'essences. Les essences sont vaporisées de façon continue au cours de leur formation [28].

#### **I. 4.2.2. Caractères chimiques des HE**

Les HE sont avant tout des composés terpéniques. Du strict point de vue chimique, les terpènes apparaissent comme des polymères d'un carbure d'hydrogène diéthylénique, l'isoprène.

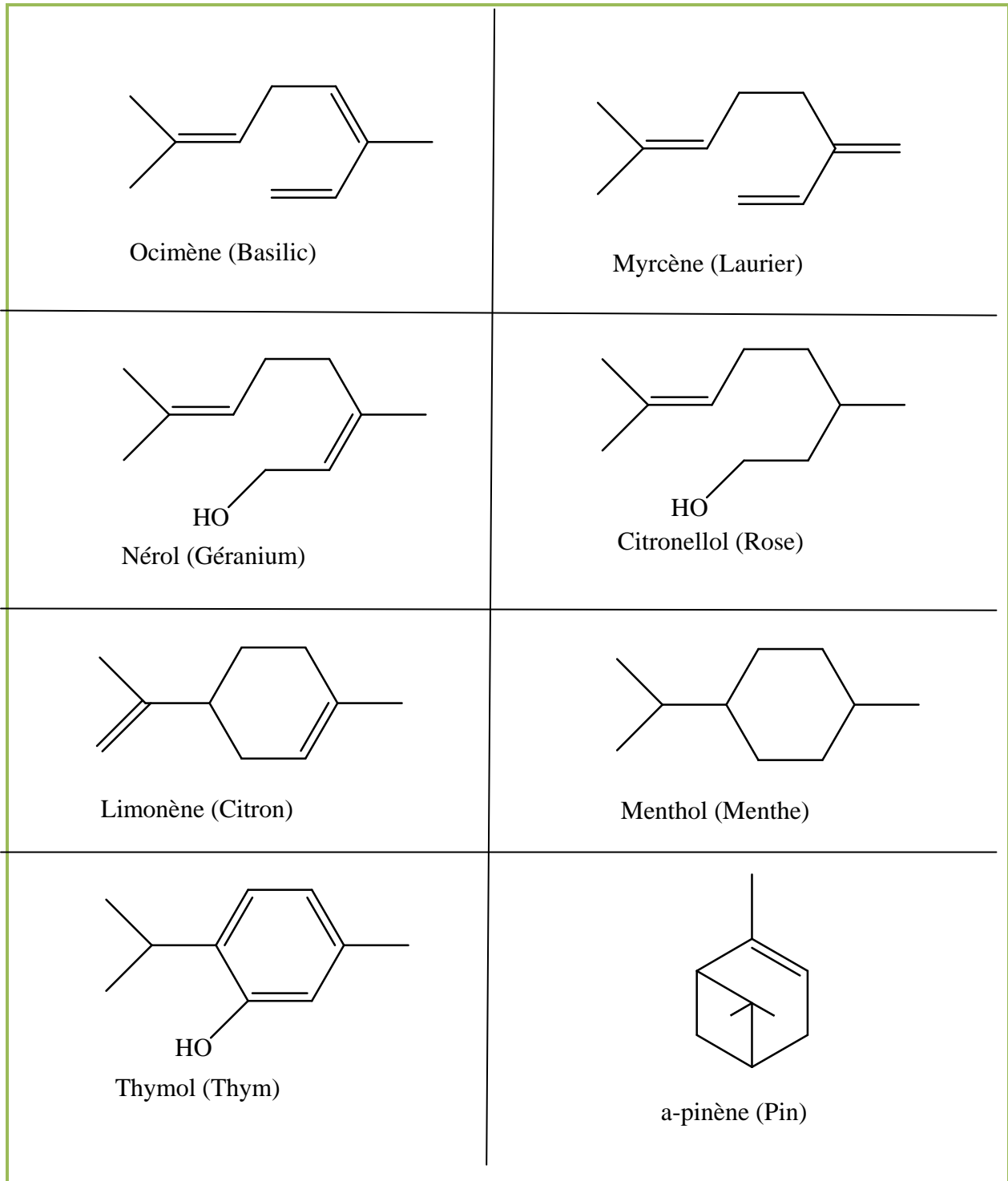


Selon le nombre de résidus isoprènes que groupent les composés terpéniques, on distingue :

- les terpènes simples, formés de deux isoprènes,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$  ;
- les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes,  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$  ;
- les diterpènes, formés de quatre isoprènes,  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ .

Ces trois premiers groupes sont à l'origine de très nombreuses essences ;

- les triterpènes (six isoprènes) qui, par oxydation, conduisent à de nombreuses résines ;
- les tétraterpènes (huit isoprènes) qui conduisent aux caroténoïdes ;
- les polyterpènes (n isoprènes) qui comprennent, en particulier, le caoutchouc et la gutta-percha.



**Figure 4** : Structure chimique de quelques monoterpènes des huiles essentielles

### **I. 4.3. Méthodes d'extraction des HE**

#### **I. 4.3.1. Entraînement à la vapeur**

Le but de cette méthode est d'entraîner avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile essentielle surnageante.

#### **I. 4.3.2. Hydrodistillation simple**

La plante est mise en contact avec de l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les HE se séparent de l'eau par différence de densité, les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées et, en raison de sa plus faible densité, l'huile essentielle se place au dessus de la phase aqueuse. La phase aqueuse contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat). C'est la méthode que nous utilisons dans notre laboratoire en se servant d'un appareil de type Clevenger.

#### **I. 4.3.3. Distillation à la vapeur saturée**

Le matériel végétal n'est pas en contact avec de l'eau, il est placé sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. Les composés volatils entraînés par la vapeur d'eau vont pouvoir être séparés par décantation du distillat refroidi.

#### **I. 4.3.4. Hydrodiffusion**

L'hydrodiffusion consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale. La composition des produits obtenus est sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes.

L'industrie des parfums a utilisé jadis l'enfleurage, pour les organes fragiles comme les fleurs, c'est-à-dire le contact avec un corps gras qui se sature d'essence. Le corps gras est épuisé par l'alcool absolu et ce solvant est évaporé sous vide à 0°C.

#### **I. 4.3.5. Extraction par CO<sub>2</sub> super critique**

La technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO<sub>2</sub> et de son état physique. Grâce à cette propriété, il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux.

Le CO<sub>2</sub> est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant.

#### **I. 4.3.6. Extraction assistée par micro-onde**

La technique d'extraction par micro-onde a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé d'extraction est basé sur l'absorption de l'énergie de micro-onde par les composantes du matériel végétal et qui sont mesurées par une constante diélectrique, cette absorption dépend aussi de la fréquence de l'onde et de la température du matériel végétal.

#### **I. 4.4. Propriétés et utilisation des HE**

Les HE contenues dans les herbes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Elles sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie, l'industrie alimentaire (les arômes) et aussi de l'aromathérapie. Cette dernière se veut une technique thérapeutique par le massage, les inhalations ou les bains tout en utilisant les HE.

Respirer l'odeur agréable d'une HE procure une sensation de bien être doublée d'un effet sur la santé. En effet, toutes les HE ont une ou plusieurs vertu(s) particulière(s). Des mélanges des HE destinés à être diffusés sont conçus par exemple pour créer une synergie entre les huiles et exercer un effet sur l'organisme et le cerveau. Lorsqu'on sait que les odeurs que l'on perçoit sont recueillies dans le cerveau par l'hémisphère relié aux émotions, on comprend mieux l'impact que peuvent avoir ces huiles.

Ces HE agissent selon leur tropisme, ce terme signifie que chaque huile exerce ses pouvoirs curatifs sur un organe ou une zone en particulier, ces substances volatiles pénètrent les tissus et l'organisme. Par exemple, l'huile essentielle de basilic est particulièrement active

au niveau de la digestion. Celle de cyprès améliore la circulation. Il est donc très important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des HE car leur usage peut comporter des inconvénients. Par exemple, une HE de menthe des champs est indiquée pour stimuler les personnes fatiguées, elle soulage les douleurs névralgiques mais ne doit jamais être utilisée dans un bain, sous peine d'irritation sérieuse de la peau. Outre ces propriétés principales, elles ont toutes une vertu [29, 30] :

#### **I. 4.4.1. Antibactérienne**

Les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géranial), etc.

#### **I. 4.4.2. Antivirale**

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles aujourd'hui, les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques.

#### **I. 4.4.3. Antifongique**

Les HE ou leurs composés actifs peuvent être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. L'activité antifongique est estimée à la grande complexité de la composition des HE, les phénols sont plus antifongiques que les aldéhydes et elle décroît selon le type de la fonction chimique :

Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Esters > Hydrocarbures

#### **I. 4.4.4. Antiparasitaire**

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites.

#### **I. 4.4.5. Antiseptique**

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes.

#### **I. 4.4.6. Antioxydant**

Le pouvoir antioxydant des HE est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de cette activité.

#### **I. 5. Effet insecticide des HE**

Depuis que les grains sont stockés par l'homme, le problème de leur conservation est posé. Il consiste à mettre hors d'atteinte des intempéries, des déprédateurs et des parasites, des masses de grains plus ou moins importantes pour des durées variables.

Le stock de céréales constitue une entité formée d'une part de la céréale à stocker et d'autre part de l'environnement dans lequel il évolue et où il subit diverses agressions.

Ces agressions se répartissent en quatre groupes principaux :

\* Les agressions d'origine mécanique sont dues à des chocs entraînant des fissures ou des brisures.

\* Les agressions d'origine biochimique et chimique sont très variées : réaction de Maillard, dénaturation des protéines, dégradation et destruction des amidons.

\* Les agressions d'origine enzymatique sont dues à des hydrolases qui dégradent les réserves biochimiques du grain.

\* Les agressions d'origines biologiques sont dues à des êtres vivants (rongeurs, oiseaux, insectes, acariens et microorganismes). Ce sont les insectes et les acariens en particulier, qui causent le plus de dégâts aux denrées stockées.

Au Maroc, les principales espèces ravageuses des denrées stockées appartiennent aux *Coléoptères* et aux *Lépidoptères*. En effet, des enquêtes ont été réalisées ont révélé que les principaux ravageurs *Lépidoptères* des céréales sont : *Sitotroga cerealella* (Oliv.), *Ephestia kuehniella* (Zell.) et *Plodia interpunctella* (Hüb.).

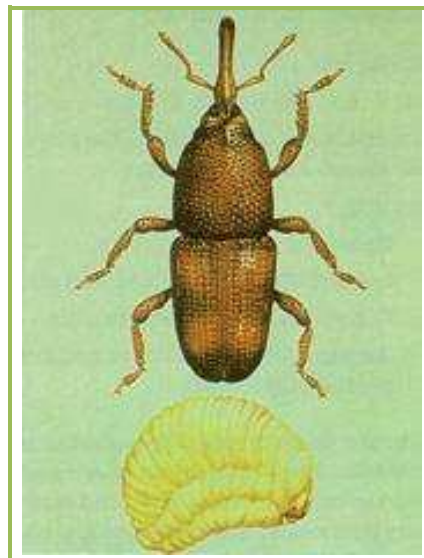
Pour les *Coléoptères*, les principaux ravageurs sont : *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha dominica* (Fab.), *Trogoderma granarium* (Everts) et *Tribolium castaneum* (Hbst.).

Les insectes présentent comme effet direct sur le grain entreposé une perte de poids, de la valeur nutritive et du pouvoir germinatif. De plus, l'humidité issue du métabolisme de leurs pullulations et les produits d'excrétion azotée favorise l'apparition de moisissures dans les lieux de stockage.

Avant de présenter les méthodes de lutte appliquées contre les insectes des denrées stockées, nous passons en revue quelques données relatives à leur bioécologie.

### **I. 5.1. Description de deux principaux Coléoptères des stocks**

#### **I. 5.1.1. *Sitophilus oryzae* : (*S. oryzae*)**



**Figure 5 :** *Sitophilus oryzae*

**Classification :**

Règne : *Animalia*

Embranchement : *Arthropoda*

Classe : *Insecta*

Ordre : *Coleoptera*

Famille : *Dryophthoridae*

Appartenant à la famille des *Dryophthoridae*, *S. oryzae* a une taille moyenne de 3 mm, le prothorax est pourvu de ponctuations arrondies le long de son bord antérieur. Les stries des élytres sont grossièrement ponctuées avec les interstries finement ponctuées. Cette espèce

dont le dessus mat et foncé porte deux taches ocre sur chaque élytre qui permet de la distinguer facilement.

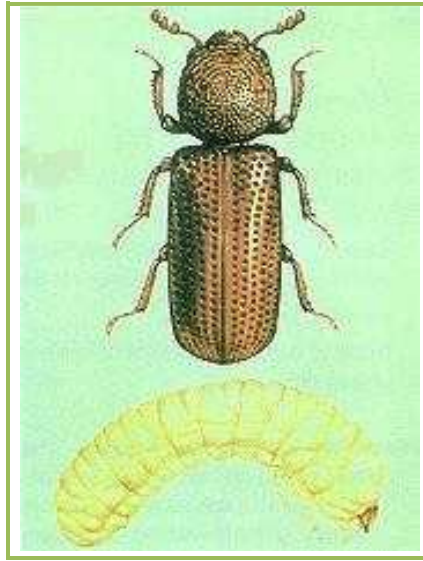
*S. oryzae* est munie d'ailes bien développées et peut de ce fait voler, donc de se disséminer dans les champs, les œufs sont piriformes de couleur blanche brillant, mesurant 0,5 à 0,8 mm de longueur et 0,2 à 0,3 mm de largeur.

Selon Brich [31] et Thomson [32] *S. oryzae* a besoin de température relativement modérée. Le seuil de l'activité des adultes de cette espèce est de 10°C. L'espèce connaît un optimum entre 26 et 30°C avec une teneur en eau des grains de l'ordre de 11 à 12%. Une baisse de l'humidité relative entraîne une diminution de la longévité des adultes. Le seuil thermique pour l'obtention des accouplements est de 13°C, mais la ponte ne peut pas s'effectuer à cette température ainsi qu'au-delà de 32-35°C et à des teneurs en eau des grains inférieures à 10%.

La durée de développement varie en fonction de la température et de la teneur en eau. Les chercheurs ont observé que les conditions optimales de développement pour *S. oryzae* sont 30°C et 70% d'humidité relative.

Les charançons des grains s'alimentent et se multiplient aux dépens de nombreuses céréales : seigle, avoine, orge, blé, riz, maïs, etc. Les dégâts de *S. oryzae* sont surtout causés par les larves. Durant leur vie, elles consomment la moitié ou le tiers de l'endosperme d'un grain de blé [33]. *S. oryzae* s'alimente régulièrement et consomme par semaine un poids de blé égal à son propre poids [34].

**I. 5.1.2. *Rhizopertha dominica* : (*R. dominica*)**



**Figure 6 :** *Rhizopertha dominica*

**Classification :**

Règne : *Animalia*

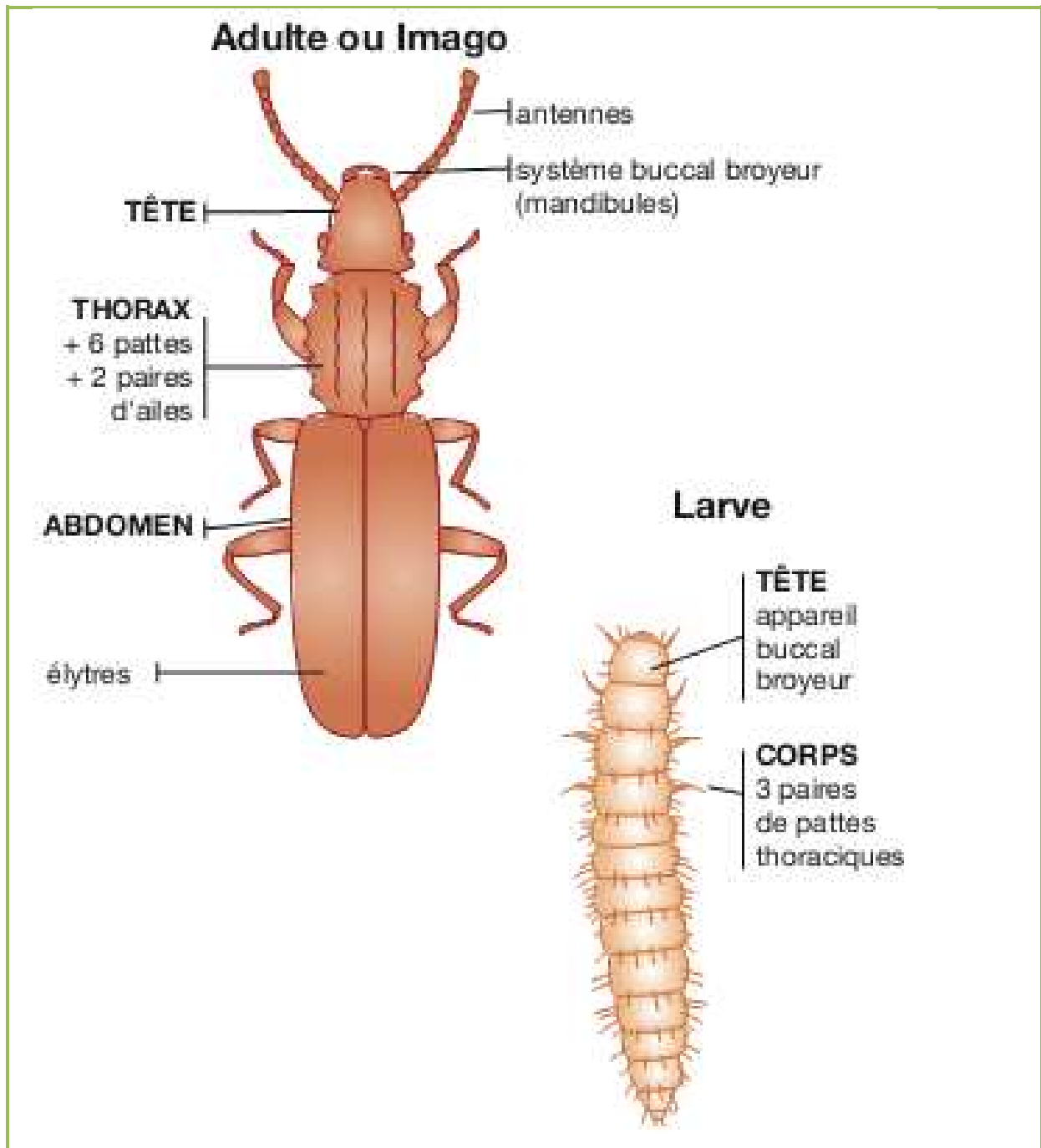
Embranchement : *Arthropoda*

Classe : *Insecta*

Ordre : *Coleoptera*

Famille : *Bostrichidae*

L'adulte est de couleur brune, de forme cylindrique avec des côtés nettement parallèles, caractéristiques des *Bostrichidae*. C'est un insecte de petite taille de 2,2 à 3 mm de longueur avec un prothorax qui couvre entièrement la tête d'où le nom du « capucin des grains ». Cet insecte présente des antennes en massues de 3 articles. Vu de la face dorsale, le pronotum se termine par une rangée de dents régulières (12 à 14). Les élytres sont bien développés et ponctués longitudinalement. Les adultes peuvent voler ce qui facilite les infestations.



**Figure 7 :** Morphologie des Coléoptères [35]

Les œufs sont piriformes, de couleur blanc et rose. Ils peuvent atteindre 0,6 mm de longueur sur 0,2 mm de largeur. Les larves possèdent des pattes bien développées ce qui les rendent très agiles. Elles sont cylindriques avec de longues soies, puis incurvées et duvetées à la fin de leur développement.

Les adultes s'accouplent et pondent à plusieurs reprises. Le total des œufs déposés varie de 300 à 400. Les pontes s'échelonnent sur plusieurs semaines. Les œufs sont pondus, soit isolément, soit en petits amas à l'intérieur des grains attaqués ou à leur surface, parfois parmi les débris qui gisent entre eux.

La durée moyenne d'incubation est de 15 jours à 26°C et 65% d'humidité relative [36]. Elle est de neuf jours à 21°C et 70% HR. Après l'éclosion, les larves s'introduisent dans les grains en creusant des tunnels aux alentours du germe et continuent leur développement à l'intérieur [37]. Des larves dans certains cas sont capables de se nourrir et de se développer librement entre les grains. Le nombre de mue varie de 2 à 4 à une température de 29°C et de 70 à 80% HR.

Thomson [32] a estimé la durée de développement des différents stades larvaires à 17 jours et les stades pré-nympe et nymphe à 7 jours à 29°C et 70% HR, la durée de cycle est en moyenne de 38 jours. Par ailleurs, la durée de développement sur le blé à 14% de teneur en eau du grain et 30°C varie de 30 à 40 jours. Et de 58 jours à 26°C [36]. La température optimale pour le développement de *R. dominica* est 28°C. L'espèce est plus sensible au froid : une température de 21°C arrête sa multiplication et les adultes ne survivent pas à 3°C. L'adulte peut supporter des températures assez élevées, mais une exposition de 3 min à 50°C suffit pour les tuer [37]. *R. dominica* est considéré comme le plus ennemi des grains après *S. oryzae*. Ce sont les adultes qui causent le plus de dégâts. Ils attaquent directement les grains à l'aide de leurs mandibules et arrivent à les vider complètement de leur contenu.

Les femelles sont particulièrement voraces avant la ponte. Elles ne consomment d'ailleurs pas tout ce qu'elles rongent et on retrouve une certaine quantité de farine intacte mêlée à leur excrément.

## **I. 5.2. Méthodes de lutte contre les insectes des denrées stockées**

La protection des céréales stockées contre les attaques d'insectes et d'acariens soulève des problèmes variés et elle doit faire appel à un ensemble de techniques différentes qu'il est nécessaire d'appliquer à bon escient.

Le souci majeur d'un stockeur est de garder son stock de céréale intact. Un ensemble de mesure préventive et curative, il s'agit de toutes techniques destinées à réduire l'infestation au champ, au début du stockage ainsi que pendant le stockage.

### **I. 5.2.1. Lutte chimique**

Avec le développement de la chimie, on s'est vite rendu compte qu'il y avait tout un arsenal capable d'éliminer les ennemis de l'homme. Cette approche a conduit à une élimination spectaculaire, du moins à court terme, des organismes nuisibles, et à une détérioration parallèle, mais pas nécessairement visible de la qualité de l'environnement.

Depuis la venue des composés organiques de synthèse, on regroupe les insecticides en insecticides organiques (les organochlorés, organophosphorés, carbamates et pyréthriinoïdes représentent la grande majorité des insecticides organiques de synthèse qui ont été employés ou sont utilisés actuellement) [38], et inorganiques (généralement à base d'arsenic ou de fluosilice, sont aujourd'hui prohibés).

Largement répandue, en raison de son efficacité, elle doit être appliquée avec discernement pour limiter les risques qu'elle peut faire courir aux consommateurs des denrées. Deux types de traitement sont généralement employés :

- Traitement par contact :

Il consiste à recouvrir les grains, l'emballage ainsi que les locaux de stockage d'une pellicule de produit insecticide qui agit par contact sur les déprédateurs, dont l'effet est plus ou moins rapide avec une persistance d'action plus longue.

- Traitement par fumigation :

La fumigation consiste à traiter les grains à l'aide d'un gaz toxique, qu'on appelle fumigant. L'intérêt majeur de la fumigation est de faciliter la pénétration des gaz à l'intérieur du grain et donc de détruire les œufs, larves et nymphes qui s'y développent [39, 40, 41].

A cause de leur effet négatif sur l'environnement, l'utilisation des insecticides chimiques est devenue de plus en plus restrictive [42]. L'utilisation intensive des insecticides de synthèse pour lutter contre les insectes phytophages a conduit à la contamination de la biosphère. Selon Philogène [43], tous les pesticides posent un problème de contamination à court ou à long terme, selon la nature de la molécule utilisée dans les traitements et selon la manière avec laquelle ils sont appliqués. Les études consacrées à la dispersion des pesticides dans l'environnement ont prouvé la présence de ces produits dans plusieurs points de la biosphère qui n'ont subi aucun traitement [44]. L'utilisation des insecticides chimiques conduit aussi à un désordre écotoxicologique qui est accompagné d'une augmentation spectaculaire du nombre d'espèces devenues résistantes aux insecticides chimiques [45].

Une dégradation naturelle et spontanée des pesticides chimiques est extrêmement rare, la cinétique de disparition par voie biologique d'un pesticide dans le sol débute toujours par une période de latence, plus au moins longue, au cours de laquelle la dégradation est pratiquement nulle.

Tous ces produits phytosanitaires ont une caractéristique en commun : ils sont neurotoxiques. Des résidus de pesticides ont été détectés dans de nombreux secteurs de la chaîne alimentaire : il a été prouvé que le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) a une demi-vie de 10 ans dans l'eau et de 40 ans dans le sol exposé [46].

### **I. 5.2.2. Lutte physique et mécanique**

Elles concernent toutes les techniques mécano-thérapeutiques susceptibles de rendre le stock sain. En général, ces techniques ne sont pas efficaces contre les formes cachées. Elles sont recommandées pour pallier aux problèmes des résidus chimiques liés aux différents traitements chimiques appliqués aux denrées stockées. Ainsi plusieurs techniques ont été expérimentées et ont eu des succès divers : l'écrasement mécanique dans les « Entoleter », le traitement par le froid et le chaud, le stockage étanche ou sous atmosphère contrôlée et les radiations ionisantes.

La lutte par le froid consiste à abaisser la température de stockage, ce qui entraîne un ralentissement du développement des insectes, freiné dès que la température est inférieure à 10°C.

La lutte par le chaud consiste à une élévation de la température (température supérieure à 50°C), ce qui entraîne la mort des insectes. Le passage des produits dans un séchoir permet d'éliminer les insectes présents dans les grains.

### **I. 5 2 3. Lutte biologique**

Ces dernières décennies, la protection de l'environnement s'impose de plus en plus comme une préoccupation mondiale majeure. La méthode classique de lutte biologique par utilisation de micro-organisme, de prédateurs, de parasitoïdes et de substances naturelles d'origine végétale, les industries agrochimiques orientent de plus en plus leur effort vers l'étude de produits naturels pour la recherche de nouveaux insecticides [47].

Le concept de lutte biologique a subi une évolution au cours du temps et intègre dans sa définition actuelle toutes les formes non chimiques de contrôle des ravageurs des récoltes mais aussi des mauvaises herbes.

Les lieux de stockage représentent des systèmes stables, avec des niveaux déterminés de température et de l'humidité, parce qu'ils forment des enceintes closes, ce qui est favorable pour procéder à une lutte biologique.

L'utilisation des phéromones d'insectes attractifs et répulsifs d'alimentation est d'un haut niveau de détection. Ils peuvent être employés comme indicateur des époques d'application des méthodes de lutte contre certains ravageurs des denrées stockées.

Ainsi, la lutte par les insecticides botaniques est très recommandée, parmi les moyens mis en œuvre par les plantes pour se défendre contre leurs déprédateurs, les médiateurs chimiques jouent un rôle déterminant [48]. Dans le bassin méditerranéen, on rencontre un très grand nombre de plante aromatique. Son climat riche en luminosité et en chaleur, qu'accompagnent des saisons marquées, exige de la part des plantes des efforts adaptatifs favorable à une richesse moléculaire évolutive leur conférant de multiples propriétés, entre autre l'effet insecticide [49].

Les espèces de la famille de *Meliaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Labiataeae* et *Canellaceae* sont les principales familles les plus prometteuses comme source de bioinsecticides [50]. Parmi plusieurs huiles essentielles, celles de la famille des *Labiataeae* ont reçu une attention considérable dans la recherche des produits naturels pour lutter contre les

ravageurs des denrées stockées [51, 52, 53, 54]. La même famille a fait l'objet de plusieurs études et ils ont montré que les espèces aromatiques sont les plus utilisées pour lutter contre les insectes [55].

Selon les ressources disponibles et la pression exercée par les phytophages, les familles des plantes développent des quantités différentes de leurs ressources à leur protection. Cependant, grand nombre d'entre elles n'a pas encore fait l'objet d'étude tant sur le plan phytochimique que sur le plan propriété insecticide.

Un examen systématique des découvertes phytochimiques répertoriées, en utilisant la base de données NAPRALERT (Natural Products Alert Database), révèle que seulement 2 à 5% des espèces végétales ont été examinées en détail d'un point de vue phytochimique [56]. Une étude réalisée par Balick et *al.* [57], a montré que moins de 1% des plantes tropicales sont étudiées d'un point de vue phytochimique. La voie donc, reste ouverte vers la découverte de nouvelles plantes et par la suite de nouvelles molécules à effet phytoinsecticide.

Pour notre étude nous avons testé l'activité insecticide de l'huile essentielle de trois espèces de menthes sur deux *Coléoptères* appartenant au groupe de ravageurs dits *Sitiobis*. Cette étude et ce choix ont été guidés par l'importance des dégâts qu'engendrent ces ravageurs et aussi leur large répartition à travers notre pays.

Cette première partie a été consacré donc à l'étude chimique de trois espèces de menthes (*Mentha pulegium*, *Mentha suaveolens* et *Mentha piperita*) qui poussent au Maroc et à leur valorisation par les tests insecticides. Notre intérêt fût porté à ces menthes étant donné leur importance économique à l'échelle mondiale et aussi leur grande utilisation par la population marocaine. D'autre part, nous avons voulu aussi contribuer à la recherche de biopesticides à base de produits naturels contre les ravageurs des denrées alimentaires.

## II. ETUDE CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE EXTRAITE DES TROIS MENTHES

La récolte des plantes a été réalisée dans des régions différentes :

- *Mentha pulegium (flio)* a été récoltée auprès de Aïn Aouda à 6 Km de la capitale Rabat.
- *Mentha suaveolens (merceta)* a été récoltée dans la région de Khémisset et précisément à Oulmès.
- *Mentha piperita (naâna abdi)* a été récoltée dans la région de Meknès.

Les plantes ont d'abord été séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière et à l'ombre pendant une vingtaine de jours dans la réserve de notre laboratoire à la Faculté des Sciences de Rabat.

### II. 1. Protocole d'extraction

#### II. 1.1. Extraction de l'huile essentielle par la méthode d'hydrodistillation

Une masse végétale qui représente une proportion d'environ 40% est complètement immergée dans de l'eau (proportion de 60%), on ajoute quelques grains de pierre ponce, le tout est ensuite porté à ébullition. On maintient le chauffage à une température douce pendant 4h, les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle et l'eau se séparent par différence de densité.

L'HE s'est extraite avec l'acétate d'éthyle et ensuite séchée par le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Le solvant est évaporé à l'aide d'un rotavapeur, l'huile est récupérée, placée dans des échantillons opaques qui sont conservés au réfrigérateur.



**Figure 8 :** Appareillage de l'hydrodistillation

### **II. 1.2. Rendement obtenu**

Le protocole expérimental décrit ci-dessus a été utilisé pour les trois espèces de menthes. Les rendements obtenus sont comme suit :

**Tableau 2 :** Rendement des HE

<b>Espèce</b>	<b>Rendement (%)</b>
<i>M. pulegium</i>	2,33
<i>M. suaveolens</i>	<b>4,33</b>
<i>M. piperita</i>	1,72

Ces différences de rendement sont dues essentiellement à la différence de morphologie des plantes : *M. suaveolens* présente le rendement le plus élevé car ses feuilles sont beaucoup plus larges et ses fleurs plus grandes que celles de l'espèce *M. piperita* et celles de *M. pulegium*.

Il faut noter que le rendement et la composition chimique des HE dépendent de plusieurs facteurs à savoir l'espèce, le milieu de récolte, la période de récolte, les pratiques culturales et la technique d'extraction.

## **II. 2. Analyse chimique des HE étudiées**

### **II. 2.1. Caractérisation par chromatographie en phase gazeuse**

La chromatographie en phase gazeuse est une technique très répandue extrêmement sensible, la séparation sur la colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux. L'analyse des composés solides ou liquides impose de les porter à l'état de vapeur par chauffage.

L'appareil utilisé est de type DANI, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La colonne utilisée est une colonne capillaire DB5 en silice fondue de 30 m de longueur et de 0,32 mm de diamètre intérieur.

Les conditions chromatographiques sont données ci-dessous :

\* Le gaz vecteur est l'azote avec une pression de 0,6 bar à l'entrée de l'injecteur, son débit est à l'ordre de 1 ml/min avec une fuite de 90%.

\* Le détecteur est alimenté par un mélange d'hydrogène avec une pression d'entrée de 0,8 bar et d'air synthétique avec une pression d'entrée de 1 bar.

\* La température de four a été programmée au début à 50°C pendant 5 min puis montée jusqu'à 200°C à raison de 4°C/min.

\* La température de l'injecteur est de 220°C.

\* La température de détecteur est de 230°C.

\* Le volume injecté est de 1µl dilué à 5%, la fuite est réglée à 90%.

Le chromatogramme a été couplé à un ordinateur équipé d'un logiciel IQ3 permettant de calculer les pourcentages des différents constituants de l'HE. Les calculs ont été réalisés selon la méthode de standard interne ; les pourcentages des différents constituants de l'HE sont assimilés aux pourcentages des aires des pics du chromatogramme.

#### **II. 2.1.2. Résultats et discussion de l'analyse par CPG**

- Pour *M. pulegium* :

Les résultats de l'analyse chimique par CPG de l'HE de *M. pulegium* sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 3** : Principaux composés chimiques de l'HE de *M. pulegium* (CPG)

<b>Composé</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
$\alpha$ -pinène	10,70	1,70
Limonène	14,33	0,44
Menthone	16,13	8,63
<b>Pulégone</b>	19,23	<b>73,33</b>

L'HE est caractérisé par la teneur élevée en certains éléments. Le chromatogramme de l'HE de *M. pulegium* démontre sans ambiguïté que cette espèce se caractérise par son haut taux en pulégone (73,33%), le second pic intense correspond au menthone (8,63%). Ces résultats trouvés sont identiques à ceux déjà trouvés dans une étude sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* du Portugal dans ses différentes étapes de développement [58], alors que dans une étude comparative de la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et *Mentha suaveolens* collectées dans la région de Fès, on a trouvé que le composé qui prédomine sur toute la constitution chimique de l'huile essentielle de *M. pulegium* était la piperitone (35.56%) [59].

- Pour *M. suaveolens* :

Les principaux constituants de cette essence sont rassemblés dans le tableau suivant :

**Tableau 4** : Principaux composés chimiques de l'HE de *M. suaveolens* (CPG)

<b>Composé</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
Menthone	10,74	3,34
Pulégone	15,70	17,61
Pipéritone	16,08	9,18
<b>Pipéritène</b>	19,02	<b>33,03</b>

D'après ces résultats, les constituants majoritaires de l'HE de *M. suaveolens* sont la pipéritène (33,03%), la pulégone (17,61%) et la pipéritone (9,18%), pour les produits légers, nous retrouvons le menthone (3,34%).

Les huiles essentielles de deux chémotypes de *Mentha rotundifolia* (*M. suaveolens*) originaire d'Algérie obtenues par entraînement à la vapeur d'eau, sont analysées par GC-MS

et GC-FID. Les résultats montrent l'existence dans le premier chémotype d'oxyde de pipéritone (19,7–31,4 %) et pipéritène (27,8–29,4 %) tandis que le second révèle une teneur très élevée en pipéritène (54,9 %) ainsi que l'oxyde de pipéritène (17,6 %) [60].

## **II. 2.2. Caractérisation par CPG-MS**

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse CPG-MS est une technique d'analyse qui possède plusieurs atouts : le chromatogramme en phase gazeuse permet de séparer les constituants d'un mélange. Le spectromètre de masse associé permet d'obtenir le spectre de masse de chacun des constituants et bien souvent de les identifier.

La chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse possèdent des limites de sensibilité voisines. Leur association permet de disposer d'un outil analytique très performant. L'identification de produits est réalisable pour des quantités de l'ordre du nanogramme, la détection par fragmentométrie est possible jusqu'au picogramme.

Cette technique réclame peu d'échantillon, la quantité injectée est de l'ordre du microlitre. Elle est rapide, le temps d'acquisition du spectre est identique à celui de l'analyse chromatographique.

Deux modes sont disponibles :

\* Le mode SCAN : on réalise un balayage sur une gamme de masse prédéterminée. Il est à noter que plus on réalise un balayage de masse sur une gamme large, moins on sera sensible.

\* Le mode SIM (Single Ion Monitoring) : on choisit d'analyser de 2 à 3 masses jusqu'à 20 masses. Dans ces conditions, on aura plus de chances de détecter le sommet d'un pic.

Pour réaliser nos spectres, nous avons utilisé le mode SCAN. Les paramètres de l'instrument sont :

- Méthode SCAN en IE.
- Chromatographe HP 6890.
- Injecteur : injection manuelle, à pression constante : 2,15psi, volume injecté : 2µl avec une seringue de 10µl, le solvant utilisé est l'Hexane.

- La colonne est capillaire HP 19091S-433, longueur 30 m, diamètre 250  $\mu\text{m}$  sa température maximal : 325°C.
- La température initiale du four 40°C, montée en température 10°C/min.
- La température finale 250°C, le temps total de l'opération 32 min.
- Mode avec division.
- Le détecteur est un spectromètre de masse quadripôle à une température 150°C, la température de la source 230°C.
- Le gaz vecteur est l'Hélium (He).

### II. 2.2.1. Résultats et discussion de l'analyse par CPG-MS

- Pour *M. pulegium* :

L'analyse de l'HE de *M. pulegium* nous a permis d'identifier les composés rassemblés dans le tableau ci-après:

**Tableau 5** : Principaux composés chimiques de l'HE de *M. pulegium* (CPG-MS)

N° de pic	Composé	TR (min)
1	$\alpha$ -pinène	5,59
2	$\beta$ -pinène	6,33
3	Inconnu	6,67
4	D-limonène	7,26
5	Eucaliptol	7,29
6	Menthone	9,34
7	Pulegone	11,48
8	Piperitone	11,52
9	Inconnu	11,56
10	Inconnu	11,59
11	Inconnu	11,76
12	Inconnu	11,92
13	Carvone	12,43
14	Caryophyllène	13,45
15	Inconnu	13,64
16	$\alpha$ - caryophyllène	13,91

Le chromatogramme de l'HE de *M. pulégium* montre que cette essence est surtout riche en monoterpènes et confirme ce que nous venons de montrer par la première méthode (CPG) : la pulégone est le constituant majoritaire de l'HE de *M. pulegium* (elle présente une large bande dans le chromatogramme), ce qui explique l'appellation : menthe à pulégone.

- Pour *M. suaveolens* :

L'analyse de l'HE de *M. suaveolens* montre la présence dans l'HE des composés réunis dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 6** : Principaux composés chimiques de l'HE de *M. suaveolens* (CPG-MS)

N° de pic	Composé	TR (min)
1	$\alpha$ -pinène	5,60
2	$\beta$ -pinène	6,35
3	Terpinolène	7,01
4	Eucalyptol	7,29
5	$\gamma$ -terpinène	7,74
6	$\alpha$ -fenchène	7,94
7	Inconnu	8,57
8	Pulégone	9,52
9	Pipéritone	9,53
10	Inconnu	10,29
11	Pipéritène	11,08
12	Menthone	11,17
16	Caryophyllène	13,45
17	5-méthyl-9-méthylène-2-isopropyl bicyclo(4.4.0)dec-1-ène	13,74
18	7-méthyl-10-isopropyl bicyclo(4.4.0)dec-1-ène	14,29
19	Ledol	15,67
20	$\alpha$ -cadinol	16,41
21	Inconnu	26,62

Cette HE contient des monoterpènes, des sesquiterpènes et d'autres composés organiques. Nous avons aussi conclu que les monoterpènes sont plus volatiles que les sesquiterpènes.

- Pour *M. piperita* : (pour cette espèce nous avons fait que la CPG-MS)

**Tableau 7** : Principaux composés chimiques de l'HE de *M. piperita* (CPG-MS)

<b>Composé</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Linalool</b>	<b>60,72</b>
Linalyl acetate	20,79
Geraniol	3,26
1,8-cineol	2,33
Inconu	2,10
Limonene	1,54
Neomenthol	Traces
Menthol	Traces
Pulegone	Traces
Isomenthone	Traces
Menthone	Traces
Methyl acetate	Traces
Piperitone	Traces
Inconu	4,86

Nous avons distingué qu'il y a une différence entre les deux modes d'identification au niveau des temps de rétention et cela pour le même constituant de l'HE de même espèce de plante. Si nous prenons par exemple la pulegone, le chromatogramme de l'HE de *M. pulegium* issu de la CPG montre que le temps de rétention de la pulegone est de 19,23 min alors qu'il est de 11,48 min pour l'analyse en présence du couplage (CPG-MS).

La différence observée est liée à la méthode utilisée (colonne, mode opératoire, température...). Les trois espèces de menthe contiennent une composition chimique très variée qui peut être attribuée à la mise au point de beaucoup de réactions et avoir par la suite des effets en agissant seule ou bien sous forme de mélange.

La distinction de composition constatée sur les huiles essentielles étudiées est vraisemblablement à mettre en rapport avec des facteurs biotiques tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol, aux méthodes d'extractions et aussi au type des colonnes utilisées pour effectuer les analyses chimique.

### **III. EVALUATION DE L'ACTIVITE INSECTICIDE DES HUILES ESSENTIELLES DES TROIS MENTHES**

Les tests ont été réalisés au laboratoire de département de Zoologie à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat.

#### **III. 1. Matériels et méthodes**

L'étude a porté sur deux Coléoptères : *Rhyzopertha dominica* et *Sitophilus oryzae*. Ces insectes ont été collectés au souk des grains de Rabat. Le matériel utilisé consiste en des boîtes de pétri 9 cm de diamètre grillagées afin d'obtenir une aération parfaite du contenu des boîtes, du blé et des micro-seringues.

Cinq boîtes de pétri contenant chacune une masse de 5 g de blé sur lequel nous avons déposé un volume (Cn) d'huile essentielle à l'aide des micro-seringues. 10 adultes de chaque espèce d'insecte ont été ensuite placés séparément dans ces boîtes de pétri. Les témoins, au nombre de 10 et dans les mêmes conditions, n'ont pas subi de traitement. Les essais ont été conduits dans des conditions de température ambiante et mesurés à l'aide d'un thermomètre : 18°C et à 70% d'humidité relative.



Figure 9 : Test de l'activité insecticide des HE



Figure 10 : Boîtes de pétri, contenant le blé infecté par *S. oryzae*

### III. 2. Résultats du test insecticide

Les résultats trouvés vont être présentés sous forme de tableaux. Chaque tableau regroupe les pourcentages de mortalité des insectes traités par différentes doses du produit testé.

**Tableau 8** : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte *S. oryzae* après traitement par HE de *M. pulegium*

	<b>C<sub>1</sub> = 50 µl</b>	<b>C<sub>2</sub> = 12 µl</b>	<b>C<sub>3</sub> = 3µl</b>
<b>Durée</b>	24 h	24 h	24 h
<b>Essais</b>			
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	100
4	100	100	100
5	100	100	100

**Tableau 9** : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte *R. dominica* après traitement par HE de *M. pulegium*

	<b>C<sub>1</sub> = 50 µl</b>	<b>C<sub>2</sub> = 12 µl</b>	<b>C<sub>3</sub> = 3µl</b>
<b>Durée</b>	24 h	24 h	24 h
<b>Essais</b>			
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	100
4	100	100	100
5	100	100	100

**Tableau 10** : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte *S. oryzae* après traitement par HE de *M. suaveolens*

	<b>C<sub>1</sub> = 50 µl</b>	<b>C<sub>2</sub> = 12 µl</b>	<b>C<sub>3</sub> = 3µl</b>
<b>Durée</b>	24 h	24 h	24 h
<b>Essais</b>			
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	80
4	100	100	100
5	100	100	50

**Tableau 11** : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte *R. dominica* après traitement par HE de *M. suaveolens*

	<b>C<sub>1</sub> = 50 µl</b>	<b>C<sub>2</sub> = 12 µl</b>	<b>C<sub>3</sub> = 3µl</b>
<b>Durée</b>	24 h	24 h	24 h
<b>Essais</b>			
1	100	100	100
2	100	100	90
3	100	100	50
4	100	100	100
5	100	100	70

**Tableau 12** : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte *S. oryzae* après traitement par HE de *M. piperita*

	<b>C<sub>1</sub> = 50 µl</b>	<b>C<sub>2</sub> = 12 µl</b>	<b>C<sub>3</sub> = 3µl</b>
<b>Durée</b> <b>Essais</b>	24 h	24 h	24 h
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	100
4	100	100	100
5	100	100	100

**Tableau 13** : Pourcentage de mortalité d'espèce d'insecte *R. dominica* après traitement par HE de *M. piperita*

	<b>C<sub>1</sub> = 50 µl</b>	<b>C<sub>2</sub> = 12 µl</b>	<b>C<sub>3</sub> = 3µl</b>
<b>Durée</b> <b>Essais</b>	24 h	24 h	24 h
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	100
4	100	100	100
5	100	100	100

**Remarque** : Les insectes se trouvant dans la boîte pétri témoin n'enregistraient aucun mort. Nous avons gardé cette boîte de pétri avec les insectes plus de 3 mois dans notre laboratoire et aucun mort n'a été signalé.

### **III. 3. Discussion**

Selon ces résultats nous pouvons conclure que les HE de *M. pulegium* et de *M. piperita* se sont avérées les plus efficaces, quelle que soit la concentration utilisée et l'espèce d'insecte choisi, puisque la mortalité des insectes était totale et cela dans les premières 24 h qui suivent le traitement.

D'après les résultats obtenus dans une étude antérieure sur l'effet de l'huile essentielle de cinq plantes médicinales : Eucalyptus, Menthe, Thym, Romarin et Citronnelle, les huiles essentielles ont été avérées plus toxique par inhalation que par contact ou ingestion, sur deux espèces d'insectes des denrées stockées : *Tribolium confusum* et *Sitophilus oryzae*. La mortalité totale des insectes n'a atteint 100% qu'après 6 jours post traitement [61].

L'HE de *M. suaveolens* s'est révélée toxique pour les deux espèces de *Coléoptères*, le pourcentage de mortalité est de 100% respectivement pour les doses de 50 et 12  $\mu$ l. Pour la dose 3  $\mu$ l, nous avons observé une toxicité aiguée provoquant la mortalité d'environ 85% dans le premier jour de traitement alors qu'elle a atteint 100% le deuxième jour.

Les insectes subissant le traitement par une dose de 3  $\mu$ l ont montré une petite résistance qui n'a pas duré plus d'une journée puisqu'on a pu atteindre la mortalité totale au bout du deuxième jour. L'absence de mortalité au niveau du témoin montre que notre test reste fiable pour l'étude de l'effet insecticide des huiles essentielles testées.

L'activité insecticide de l'huile essentielle de ces plantes ne nécessite pas beaucoup de temps pour se manifester ; elle est presque identique pour les trois espèces de menthes, la mortalité maximale (100%) étant enregistrée le premier jour post traitement avec une dose de 12  $\mu$ l.

Tous ces tests effectués peuvent confirmer que le traitement des denrées alimentaires par l'huile essentielle issue des plantes aromatiques et médicinales peut être très efficace pour lutter contre les ravageurs de denrées alimentaires stockées. Ces huiles contiennent des produits chimiquement très intéressants.

D'un autre coté, nous savons que l'homme consomme les plantes médicinales depuis très longtemps, aussi l'industrie alimentaire se dirige vers l'utilisation de ces plantes médicinales et aromatiques et de leurs produits, plus précisément les huiles essentielles.

L'application des produits naturels peut présenter beaucoup d'avantages pour la santé de l'être vivant et pour son environnement par rapport aux produits de synthèse chimique qui contaminent globalement la biosphère.

L'obtention de ces produits naturels (huiles essentielles) nécessite beaucoup de professionnalisme et sans doute des dépenses élevées puisque pour avoir quelques microlitres d'huile essentielle il faut des quantités considérables de la matière végétale qui est devenu pourtant de plus en plus demandée au marché mondiale. Mais les meilleurs résultats que l'on peut obtenir à court ou à long terme encouragent à préparer des produits naturels à des fins insecticides.

## **CONCLUSION**

Les produits naturels étaient et restent toujours une source inépuisable de structures complexes et diverses vu le rôle que peuvent jouer certains composés purs dans beaucoup d'applications, à savoir l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire, l'industrie cosmétique, la parfumerie, etc.

Les plantes synthétisent plusieurs substances du métabolisme secondaire. Ces molécule peuvent avoir différents effets chez les insectes : répulsif, attractif, perturbateur du développement, inhibiteur de la reproduction, etc. Leur toxicité peut être directe ou indirecte sur les organes cibles (organes sensoriels, système nerveux, système endocrines, appareil digestif, appareil reproductif, etc.).

Ces dernières années, et face à une législation de plus en plus restrictive sur l'application des pesticides de synthèse, la recherche de phytoinsecticides s'inscrit dans une stratégie particulièrement adaptée aux exigences du consommateur tout en préservant l'environnement.

Ainsi, les instances internationales comme l'OMS ont interdit l'usage de certains produits insecticides synthétisés chimiquement comme les organochlorés. D'autres ont imposé l'arrêt de la production du bromure de méthyle en 2005 puisqu'il est toxique pour la santé humaine et polluant pour l'environnement, en particulier, il contribue à la destruction de la couche d'ozone [62].

Le travail de recherche entrepris dans le cadre de la valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales Marocaines, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité insecticide des huiles essentielles extraites de trois espèces de menthes qui poussent facilement au Maroc: *M. pulegium*, *M. suaveolens* et *M. piperita*.

Les analyses par CPG-MS ont montré l'existence de la pulegone (73,33%) comme produit majoritaire de l'huile essentielle de *M. pulegium* et de la pipéritène (33,03%) pour *M. suaveolens* ainsi que le linalool (60,72%) et son acétate (20,79%) pour *M. piperita*.

Les huiles essentielles se sont avérées trop toxiques vis-à-vis des insectes ravageurs des denrées alimentaires stockées : *S. oryzae* et *R. dominica* avec un taux de mortalité très élevé. Ces huiles essentielles peuvent être utilisées comme des Bioinsecticides afin de minimiser l'utilisation des insecticides synthétiques. Au terme de ce travail nous pouvons conclure que les trois espèces de menthes ont une activité insecticide certes sur les deux espèces d'insectes : *S. oryzae* et *R. dominica*. Ceci nous mène à dire que les plantes étudiées sont prometteuses comme source de Bioinsecticides et se prêtent bien à des investigations dans le domaine de la lutte biologique.

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Gwinner J., Harnisch R. et Mück O., (1996). Manuel sur la manutention et la conservation des grains après récolte, Projet de production des stockes et des récoltes, GTZ, p 388.
- [2]. Mörner J., Bos R. et Fredrix M., (2002). Réduire et éliminer l'usage des pesticides organiques persistants. Document d'orientation sur des stratégies alternatives de gestion durable des déprédateurs et des vecteurs, p 94.
- [3]. Cherin P., Voronskab E., Fraoucene N. et De Jaeger C., (2012). Toxicité aiguë des pesticides chez l'homme. *Médecine & Longévité*, 4 (2) : 68–74.
- [4]. El Bakouri H., (2006). Développement de nouvelles techniques de détermination des pesticides et contribution à la réduction de leur impact sur les eaux par utilisation des substances organiques naturelles. Thèse de doctorat en Sciences, Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des Sciences et Techniques de Tanger.
- [5]. Péguin M., (2012). Panorama des services écologiques fournis par les milieux naturels en France. Union Internationale pour la Conservation de la Nature, Vol 1 : contexte et enjeux.
- [6]. Ngamo L. S. T. et Hance Th., (2007). Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical, *Tropicultura*, 25 (4) : 215-220.
- [7]. Delaveau P., (1974). Plantes agressives et poisons végétaux. Horizons de France, p 240.
- [8]. Léger A., (2008). Biodiversité des plantes médicinales Québécoises et dispositifs de protection de la biodiversité et de l'environnement, Université du Québec à Montréal.
- [9]. Fennane M., (1987). La grande encyclopédie du Maroc: Flore et végétation, ouvrage réalisé sous la direction de Mohamed Fennane avec la participation de Mohammed Ibn Tattou et *al.*, Vol. 4, p 237.
- [10]. Bellakhdar J., (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea, *Journal of Ethnopharmacology*, 35 (2) : 123–143.
- [11]. Usaid (2008). Stratégie nationale de développement du secteur des plantes aromatiques et médicinales, Agence Internationale pour le Développement International.
- [12]. El Fadl A., Chtaina N., (2010). Etude de base sur la culture de la menthe au Maroc, Programme régional de lutte intégrée contre les organismes nuisibles.

- 
- [13]. Ministère de l'agriculture du développement rural et de la pêche maritime, (2000). Analyse des données et perspective de l'évolution du secteur des plantes aromatiques et médicinales au Maroc (cas particulier de Riff).
- [14]. Schwob R., (1984). L'essence de menthe dans le monde. Communication au 1er Colloque International sur les plantes aromatiques et médicinales du Maroc.
- [15]. Molares S., and Ladio A., (2009). Chemosensory perception and medicinal plants for digestiv aliments in a Mapuche community in NW Patagonia, Argentina, *Journal of Ethnopharmacology*, 123 (3) : 397-406.
- [16]. Fournier P., (1948). Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France, Tome II, Encyclopédie biologique, 229-240.
- [17]. Karousou R., (2007). "Mints", smells and traditional uses in Thessaloniki (Greece) and other Mediterranean countries, *Journal of Ethnopharmacology*, 109 (2) : 248–257.
- [18]. Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M. et Trotin F., (1996). Plantes médicinales des régions tempérées, Ed Maloine, p 384.
- [19]. Encyclopédie du monde végétale, (1964). Tome I, l'histoire de la botanique : la botanique dans l'antiquité.
- [20]. Ismaili-Alaoui M., (1992). Biotransformation of terpenic compounds by fungi I. Metabolism of R-(+)-pulegone, *Tetrahedron Letters*, 33 (17) : 2349–2352.
- [21]. Jahandiez E. and Maire R., (1932). Catalogue des plantes du Maroc (Spermatophytes et Ptéridophytes). Minerva, Alger. 2 (*Dicotylédones Archichlamydées*), 489-496.
- [22]. Il Idrissi A., (1982). Etude des huiles essentielles de quelques Espèces *Salivia*, *Lavandula* et *Mentha* du Maroc, Thèse de troisième cycle, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat.
- [23]. Mossaddak B., (1995). Investigation du polymorphisme chimique via la caractérisation chimiotaxinomique des menthes cultivées au Maroc, Thèse de DES ès-sciences physiques, spécialité chimie organique, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat.
- [24]. Tanji A., (2008). Techniques de production de la menthe dans la province de Settat. Exposé fait lors de la journée sur « Dangers des pesticides sur la menthe », 27 Mars 2008.
- [25]. Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M. et Hseini S., (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental), *Lejeunia*, N° 186.

- 
- [26]. Jamison J. R., (2003). Chapter 84 – Peppermint (*Mentha piperita*), Clinical Guide to Nutrition & Dietary Supplements in Disease Management, p 611–614.
- [27]. Maksimovic S. and *al.*, (1999). Effect of different agroecological factors on yield and quality of peppermint, *Rostlinna Vyroba - UZPI*. 45 (6) : 259-263.
- [28]. Werker E. et *al.*, (1993). Glandular Hairs and Essential Oil in Developing Leaves of *Ocimum basilicum* L. (*Lamiaceae*), *Annals of botany*, 71 (1) : 43-50.
- [29]. Zhiri A. et Baudoux D., (2005). Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies, *Aromathérapie scientifique*, p 79.
- [30]. Benjilali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaili-alaoui M. et Ayadi A., (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé, *Plantes médicinales et phytothérapie*, Tome XX, n° 2, 155-167.
- [31]. Brich L. C., (1953). Experimental background to study of distribution and abundance of insectes. *Ecol.*, 34 (4) : 698-711.
- [32]. Thomson V., (1966). The biology of the lesser grain borer *Rhizopertha dominica* (Fab). *Bull. Grain. Tec.*, 4 (4) : 163-168.
- [33]. Delobel A. et Tran M., (1993). Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes, Institut français de recherche pour le développement en coopératif, Centre technique de coopération agricole et rurale.
- [34]. Bekon K., (1989). Evolution des pertes en matière sèche des grains dues à un ravageur secondaire : *Tribolium castaneum* (Herbst), coléoptère *Tenebrionidae*, lors de la conservation des céréales. Céréales en région chaudes. AUPELF-UREF, Eds John Libbey Eurotext, p 97-104.
- [35]. Singh P., (2012). Grain storage insect-pest infestation – issues related to food quality and safety (Review), *International Journal of Engineering & Science Research*, 2 (12) : 1957-1974.
- [36]. Potter C., (1935). The biology and distribution of *Rhizopertha dominica* (Fab.). *Tran. R. Entomol. Soc. Lond.*, Vol 83: 449-482.
- [37]. Halstead D. G. H., (1968). Some observations on the biology of *Lophocateres pusillus* (Klug) (*Coleoptera: Trogositidae*), *Journal of Stored Products Research*, 4 (3) : 197–202.
- [38]. Regnault Roger C., (2005). Enjeux Phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, Ed Lavoisier, p : 20-43.

- 
- [39]. Shi M., (2012). Individual-based modelling of the efficacy of fumigation tactics to control lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*) in stored grain, *Journal of Stored Products Research*, Vol 51: 23–32.
- [40]. EL Lakwah F., (1990). Fumigation experiments with phosphine in traditional mud silos in Egypt to control stored- product insects. Proceeding 5th international working conference on stored-product protection. Sept. 9-14. Bordeaux. Vol. II: 799-810.
- [41]. Wang D., Collinsc P. J. and Gao X., (2006). Optimising indoor phosphine fumigation of paddy rice bag-stacks under sheeting for control of resistant insects, *Journal of Stored Products Research*, 42 (2) : 207–217.
- [42]. Rousseau J. M., Rüttimann M. et Brinquin L., (2000). Intoxications aiguës par neurotoxiques organophosphorés : insecticides et armes chimiques. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 19 (8) : 588–598.
- [43]. Philogene B. J. R., (2005). Effets non intentionnels des pesticides organiques de synthèse: impact sur les écosystèmes et la faune. Dans : enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, p : 171-187.
- [44]. Gregor D. J. and Gummer W. D., (1989). Evidence of atmospheric transport and deposition of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Canadian arctic snow. *Environmental Science and technology*, Vol 23: 561-565.
- [45]. Nakakita H. and Winks R. G., (1981). Phosphine resistance in immature stages of a laboratory selected strain of *Tribolium castanum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, Vol 17: 43-52.
- [46]. Hrdina P. D., Singhal R. L. and Ling G. M., (1975). DDT and Related Chlorinated Hydrocarbon Insecticides: Pharmacological Basis of Their Toxicity in Mammals, *Advances in Pharmacology*, Vol 12: 31–88.
- [47]. Tietze L. F. and Modi A., (2000). Multicomponent domino reactions for the synthesis of biologically active natural products and drugs, *Medicinal Research Reviews*, 20 (4) : 304–322.
- [48]. Prates H. T., et al., (1998). Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst), *Journal of Stored Products Research*, 34 (4) : 243-249.
- [49]. Penoel D., (1994). La médecine aromatique. *Research. Mediterranea*, Vol 1: 24-29.
- [50]. Jacobsen M., (1989). Botanical pesticides past, present, and future. In: insecticide of Plant Origin ACS Symposium Series 387 : 1-10.

- 
- [51]. Mansour F., Ravid U. and Putievsky E., (1986). Studies of the effects of the essential oils isolated from 14 species of *Labiata* on the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*. *Phytoparasitica*, Vol 14 : 137-142.
- [52]. Tunçw I. and Sahinkaya S., (1998). Sensitivity of two greenhouse pests to vapours of essential oils. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Vol 86 : 183-187.
- [53]. Isman M. B., (2000). Plant essential oils for pest diseases management. *Crop Protection*, Vol 19 : 603-608.
- [54]. Lee B., Choi W., Lee S. and Park B., (2001). Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop Protection*, Vol 20 : 317-320.
- [55]. Shaaya E., Kostjukovski M., Eilberg J. and Sukprakan C., (1997). Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, Vol 33 : 7-15.
- [56]. Akerele O., (1984). WHO's traditional medicine programme: progress and perspectives *Journal WHO Chron*, 38 (2) : 76-81.
- [57]. Balick M. J., Elisabetsky E and Laird SA (Editors), (1996). Medicinal resources of the tropical forest - biodiversity and its importance to human health. Columbia University Press, p 464.
- [58]. Rodrigues L., (2013). Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal, *Industrial Crops and Products*, Volume 43 : 692–700.
- [59]. Derwich E. et al., (2010). Comparative Essential oil Composition of Leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a Traditional Herbal Medicine in Morocco, *Am. Eurasian J. Sustain. Agric.*, 4 (1) : 47-54.
- [60]. Brada M. et al., (2007). Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie, *Biotechnol Agron. Soc. Environ.* 11 (1) : 3-7.
- [61]. Benazzeddine S., (2010). Activité insecticide de cinq huiles essentielles vis-à-vis de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculionidae) et *Tribolium confusum* (Coleoptera : Tenebrionidae), Mémoire Online, Ecole nationale supérieure agronomique El Harrach, Algérie.
- [62]. Environmental Protection Agency, (2001). Protection of stratospheric ozone: process for exempting quarantine and preshipment applications of methyl bromide. Vol 66 : 37752-37769.

---

**DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DE L'ACTIVITE  
ANTIBACTERIENNE ET ANTIOXYDANTE DE *CISTUS*  
*LADANIFERUS***

## INTRODUCTION

Beaucoup de microorganismes causent des dommages sur la santé humaine. L'utilisation abusive des antibiotiques a entraîné une certaine résistance chez ces microorganismes responsables de toxi-infections alimentaires. Il était donc fort intéressant de chercher des alternatives pour ces produits [1]. Les huiles essentielles et les extraits des plantes médicinales se caractérisent par une forte activité antibactérienne.

La présente partie est consacrée à l'évaluation de la sensibilité des bactéries aux extraits de *Cistus ladaniferus* et de son huile essentielle. L'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne a été réalisée au laboratoire de Bactériologie médicale de l'Institut National d'Hygiène (INH) de Rabat, par la technique de diffusion en puits en utilisant le milieu Mueller Hinton comme couche. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de différents extraits de la plante choisie est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition produite autour des puits après 24h d'incubation à 37°C. La concentration minimale inhibitrice a été réalisée pour l'huile essentielle en adoptant la méthode de microtitration.

L'utilisation dans la médecine traditionnelle de la plante *C. ladaniferus* pour soigner et calmer certaines douleurs, nous a incité aussi à tester l'activité antioxydante des différents extraits bruts de la plante par la méthode de DPPH.

## I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et leur gravité. La situation est davantage plus préoccupante à cause de l'apparition des souches de microorganismes antibiorésistants, l'apparition de l'antibiorésistance est un phénomène naturel de défense des bactéries vis-à-vis de l'action exercée par l'antibiotique qui est là pour détruire ou arrêter la multiplication de la bactérie. Certaines bactéries auparavant sensibles à l'antibiotique ne sont plus détruites ou leur multiplication n'est plus arrêtée. C'est la bactérie qui devient résistante et non pas l'homme ou l'animal. Le développement de la résistance aux antibiotiques est devenu une préoccupation majeure en termes de santé humaine et animale, car il réduit les possibilités de traitement en cas d'infection. Certaines familles d'antibiotiques ne sont plus efficaces contre certaines espèces bactériennes.

Un grand nombre de plantes possèdent des propriétés biologiques qui trouvent des applications dans divers domaines à savoir la médecine, la pharmacie, la cosmétologie et l'agriculture, les plantes médicinales sont généralement dotées d'un pouvoir biologique important [2].

Les PAM ont été utilisées depuis le temps afin de combattre toutes sortes d'infections tel que les infections intestinales, cutanées, respiratoires et virales [3, 4, 5].

Les HE des différentes espèces de plantes médicinales ont été utilisées pour l'évaluation de leur activité antibactérienne, les résultats ont prouvé une forte activité contre des souches Gram+ et Gram- [6].

Beaucoup de travaux ont montré que des extraits de PAM ont un large spectre d'activité contre les bactéries, les souches Gram-négative ont été signalées les plus résistantes en comparaison avec les souches Gram-positives à cause de leurs paroi de nature dure. Les extraits par différents solvants de PAM ont montré une très bonne activité antimicrobienne (diamètres d'inhibition entre 32 et 12 mm), l'exploitation des PAM est un moyen pour le développement de nouveaux produits antimicrobiens [7]. D'autres travaux ont montré la cohérence entre la composition chimique des HE et leur forte activité antibactérienne [8].

En effet, l'OMS estime que, pour se soigner, 80 % de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales [9]. Ces espèces végétales d'aussi grande importance pour la santé des populations méritent d'être étudiées scientifiquement pour leur meilleure utilisation.

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales [10].

De nombreux travaux antérieurs étaient focalisés sur la mise en évidence de pouvoir antimicrobien des extraits de plantes aromatiques et médicinales. Ceux, dont l'efficacité contre les micro-organismes pathogènes a été prouvée, trouvent des applications pratiques

dans divers domaines. Les huiles essentielles et les extraits fixes sont les plus largement exploités.

D'autre part, des additifs alimentaires et des antibiotiques commerciaux ont été utilisés pour contrôler les infections chez l'homme, ces produits ont entraîné des réactions hypertensives ainsi que certaines résistances vis-à-vis des pathogènes humaines (dues à des souches bactériennes). Il a été indispensable alors de chercher des aliments sans additifs chimiques et par la suite proposer des remèdes contre la croissance microbienne [11].

Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle. Bon nombres de travaux ont été consacré ces dernières années aux propriétés médicales des plantes aromatiques et médicinales et en particulier aux propriétés antimicrobiennes de leurs extraits [12].

Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement, parce que les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable.

La présente partie comportera une étude sur une plante très exploitée dans la médecine traditionnelle au Maroc et spécialement dans la région du moyen Atlas vu le nombre de bienfaits qu'elle ne cesse de donner. Il s'agit de *Cistus ladaniferus*.

D'après un questionnaire que nous avons réalisé à Oulmès dans la région du moyen Atlas du Maroc, où se trouve la plante en abondance, la population utilise *Cistus ladaniferus* dans la médication quotidienne, les gens l'utilisent spécialement pour lutter contre les maux de l'estomac.

## **I. 1. Aperçu sur *Cistus ladaniferus***

Le genre *Cistus* a fait l'objet de certaines études chimiques ; nous reprenons, à la suite, les principaux travaux réalisés sur l'activité biologique des extraits et de l'huile essentielle obtenu à partir de *Cistus ladaniferus* :

Des travaux ont montré que le ciste présente des effets : antifongiques, antiviral, anti-inflammatoire, gastroprotecteur, antitumoral [13].

Dans une étude préliminaire réalisé sur les divers extraits du *C. ladaniferus* (HE, concrète du Ciste, absolu du Ciste et résinoïde de labdanum), l'HE était la composante qui manifeste le pouvoir antibactérien et antifongique le plus efficace. La réponse des micro-organismes, diffère d'une souche à l'autre, d'une substance à l'autre et d'une concentration à l'autre. La classification des souches selon leur sensibilité à l'HE de *Cistus ladaniferus*, par référence à une concentration faible (2000 ppm) ou moyenne (4000 ppm) montre un gradient de sensibilité croissant d'*Aspergillus niger* (la souche la plus résistante) à *Mucor* (la souche la plus sensible) en passant par *Botrytis* et *Verticillium*. L'action inhibitrice des extraits du *Cistus ladaniferus* est due, surtout, à leur composition chimique riche en composés sesquiterpéniques à structure de base labdanique [14].

*Cistus ladaniferus* sécrète du labdanum qui est une sorte de gomme-résine produite par des glandes oléifères présentes sur les feuilles, les rameaux et les sommités fleuries de la plante. On dit souvent ciste-labdanum. On immerge les rameaux et les feuilles dans l'eau bouillante, la résine surnage, puis elle est décantée et coulée en bloc. Ce produit est utilisé en parfumerie pour son odeur chaude, balsamique et aphrodisiaque. C'est aussi un puissant fixatif dont l'odeur rappelle celle de l'ambre gris (produit issu du cachalot).

Le labdanum contient des composés diterpénoides bicycliques, du type labdane et clérodane ; des monoterpènes : (35 à 55 %  $\alpha$ -pinène, 50%, Camphène) ; monoterpénol : (Bornéol) ; des aldéhydes et des cétones. Aujourd'hui, le labdanum est utilisé en parfumerie pour ses propriétés odorantes et comme stabilisant dans les parfums, on le trouve dans le parfum « Poison » de Christian Dior (1985) ; « Rouge Hermès » d'Hermès (2000) ; « Youth-Dew » d'Estée Lauder (1952) ; « Vol de Nuit » de Guerlain (1933) [15].

En 2005, une étude a été faite sur cinq espèces de *Cistus* se trouvant en Turkey, il s'agit de *C. creticus* L., *C. laurifolius* L., *C. monspeliensis* L., *C. parviflorus* Lam., et *C. salviifolius* L., dans cette étude l'activité antibactérienne des extraits : aqueux, méthanolique, chloroformique, avec de l'acétate d'éthyle et le butanol, a été testée sur *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213 and ATCC 25923), *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (RSKK 1122), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), et *Candida albicans* (ATCC 10231). Tous les

extraits testés ont inhibé la croissance des bactéries testées sauf *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* qui ont montré une certaine résistance [16].

*Bouamama et al.*, ont montré que les extraits aqueux et organiques des espèces *C. villosus* L et *C. monspeliensis* L marocaines sont dotés d'un pouvoir antimicrobien intéressant vis-à-vis des microorganismes responsables de beaucoup d'infections chez l'homme. [17].

D'après tout ce qui précède nous avons constaté que le genre *Cistus* est doté d'activités biologiques prometteuses ce qui nous a poussé à tester l'activité antibactérienne et antioxydante de *Cistus ladaniferus*. L'extrait aqueux de cette espèce a prouvé auparavant un effet relaxant sur des intestins du lapin et par conséquent la possibilité de l'utiliser comme traitement des troubles gastro-intestinaux. [18]. L'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* a été également considéré comme traitement curatif et préventif contre l'hypertension [19].

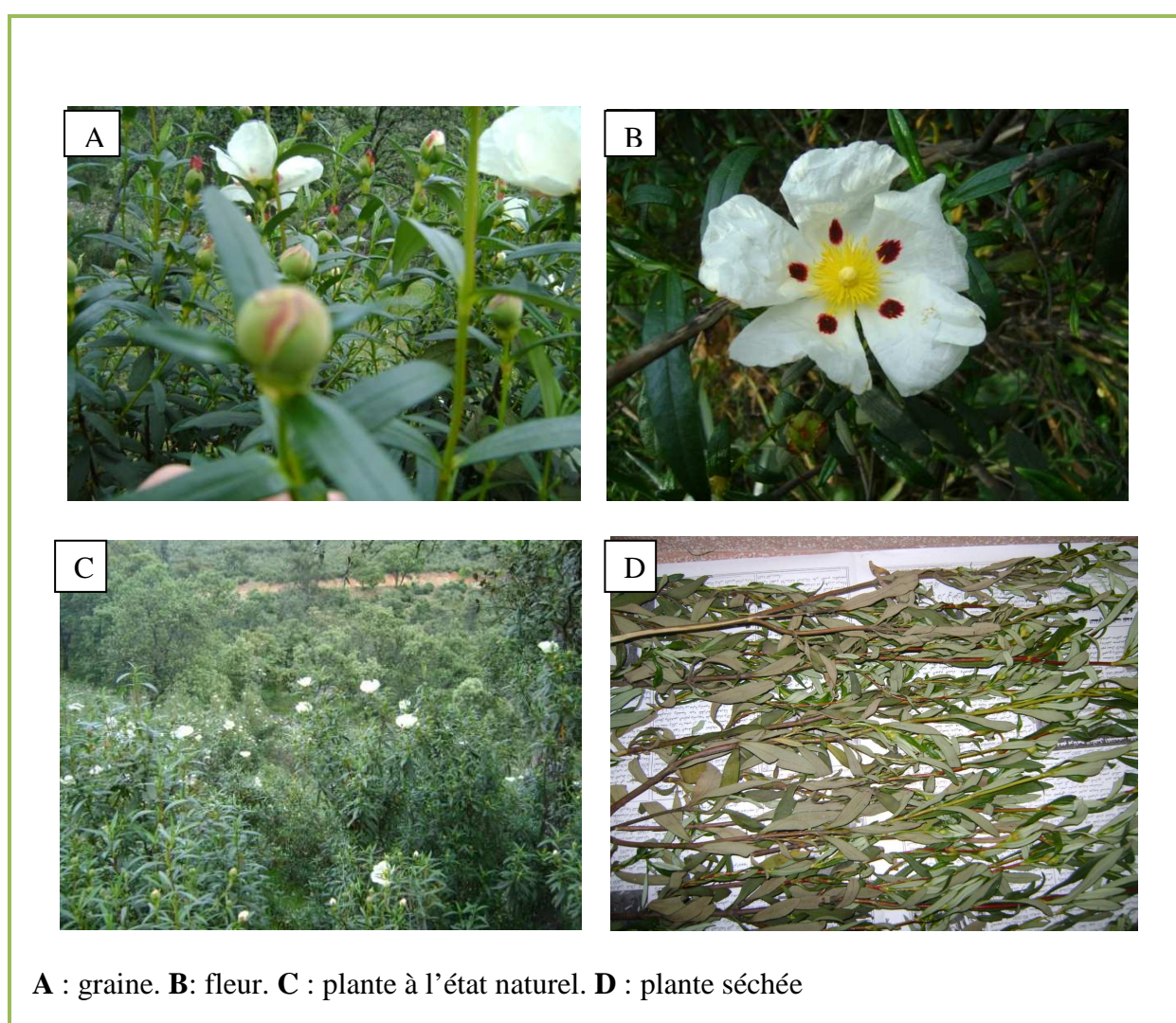
#### **Aperçu descriptif de *Cistus ladaniferus* :**

*Cistus ladaniferus* est une plante appartenant à la famille des *Cistaceae*, elle est représentée par sept genres (*Cistus*, *Fumane*, *Halimium*, *Tuberaria*, *Helianthemum*, *Hudsonia* et *Lechea*), le genre *Cistus* a lui seul 16 espèces particulièrement réparties dans la région de la méditerranée. L'espèce *Cistus ladaniferus* est répandue dans le sud de l'Espagne, l'Italie, la Sicile, le Maroc et l'Algérie.

*Cistus ladaniferus* connue au Maroc sous le nom vernaculaire « *touzzalt* » est un arbuste très odorant, très utilisée par la population locale de la région d'Oulmès (moyen atlas), c'est une plante médicinale pouvant atteindre 3 mètres de hauteur ; ses feuilles sont simples et opposées, sans stipule, ovales de 4-8 x 0.6-2.5 cm, linéaires et sont vertes et densément couvertes de poils étoilés en dessous, les fleurs sont solitaires, de 7-10 cm, blanches. La floraison est entre Avril et Juin. Cet arbrisseau contient des globes luisants, couvertes par des glandes sécrétrices d'une résine brunâtre. [20].

*Cistus ladaniferus* est une plante présentant un intérêt biologique: antifongique, antiviral, antiinflammatoire, gastroprotecteur, antitumoral et à la prévention des maladies cardiovasculaires [21]. L'huile essentielle du *Cistus ladaniferus* est extrêmement complexe, dans certains cas, jusqu'à 300 composés ont été détectée par CPG, la plupart d'entre eux étant seulement présents sous forme de traces [22].

La composition chimique de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* (commercialisée), a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse, couplée aux indices de rétention [CPG-(IR)], et par résonance magnétique du carbone-13 (RMN<sup>13</sup>C). Les analyses ont conduit à l'identification de 31 molécules. Cette composition chimique est dominée par la présence de monoterpènes et de sesquiterpènes hydrocarbonés, le principal représentant des monoterpènes est l' $\alpha$ -pinène (52,6%). Les molécules oxygénées sont présentes en très faibles proportions, elles sont majoritairement représentées par des sesquiterpénols, comme le viridiflorol (6,7%) et le lédol (2,2%), et par des monoterpènes oxygénés, tels que le trans-pinocarvéol (3,2%) et l'acétate de bornyle (2,2%) [23].



**Figure 11** : *Cistus ladaniferus*

## **I. 2. Les microorganismes**

Les organismes vivants sont tous de formidables chimistes aux capacités souvent insoupçonnées. Chaque cellule est le siège d'un nombre considérable de réactions qui lui permettent de créer les molécules nécessaires à sa vie à partir des molécules de son environnement.

Les bactéries sont des êtres vivants unicellulaires et autonomes, procaryotes qui ne contiennent pas de noyaux et qui se trouvent en très grand nombre parce qu'ils peuvent se multiplier rapidement. Il y a beaucoup de types de bactéries qui sont toutes éparées dans différents groupes et chaque groupe ayant des propriétés uniques.

Les bactéries représentent un groupe étonnant complexe et fascinant. Tandis que la plupart des bactéries doivent trouver des aliments (sucres, protéines et vitamines) pour vivre, certaines sont capables de faire leur propre alimentation avec les choses trouvées dans l'environnement, comme la lumière du soleil et le dioxyde de carbone.

Leur pouvoir peut être soit commensal, soit pathogène. Les bactéries pathogènes provoquent chez l'homme des infections dont les symptômes sont caractérisés par des éruptions cutanées, toux, écoulement nasal, fatigue, nausée, douleurs musculaires, fièvres, etc. ; alors que les bactéries commensales participent au maintien de la santé en stimulant le système de la défense et en permettant de reconstruire l'immunité. Elles occupent des places au niveau de la muqueuse accessible, nez, bouche, pharynx, intestin, etc.

Les maladies infectieuses causées par les bactéries affectent des millions de personnes dans le monde entier et causent de lourdes pertes au niveau économique. Ces infections bactériennes sont traitées par des antibiotiques qui sont des agents antimicrobiens non ou relativement peu toxiques pour l'organisme humain ou animal, certains antibiotiques inhibent la synthèse de la paroi bactérienne et les acides nucléiques, d'autres altèrent la membrane cytoplasmique et perturbent la synthèse protéique au niveau du ribosome [24].

A côté des antibiotiques, beaucoup de plantes aromatiques sont caractérisées par la synthèse de molécules odorantes connues pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire.

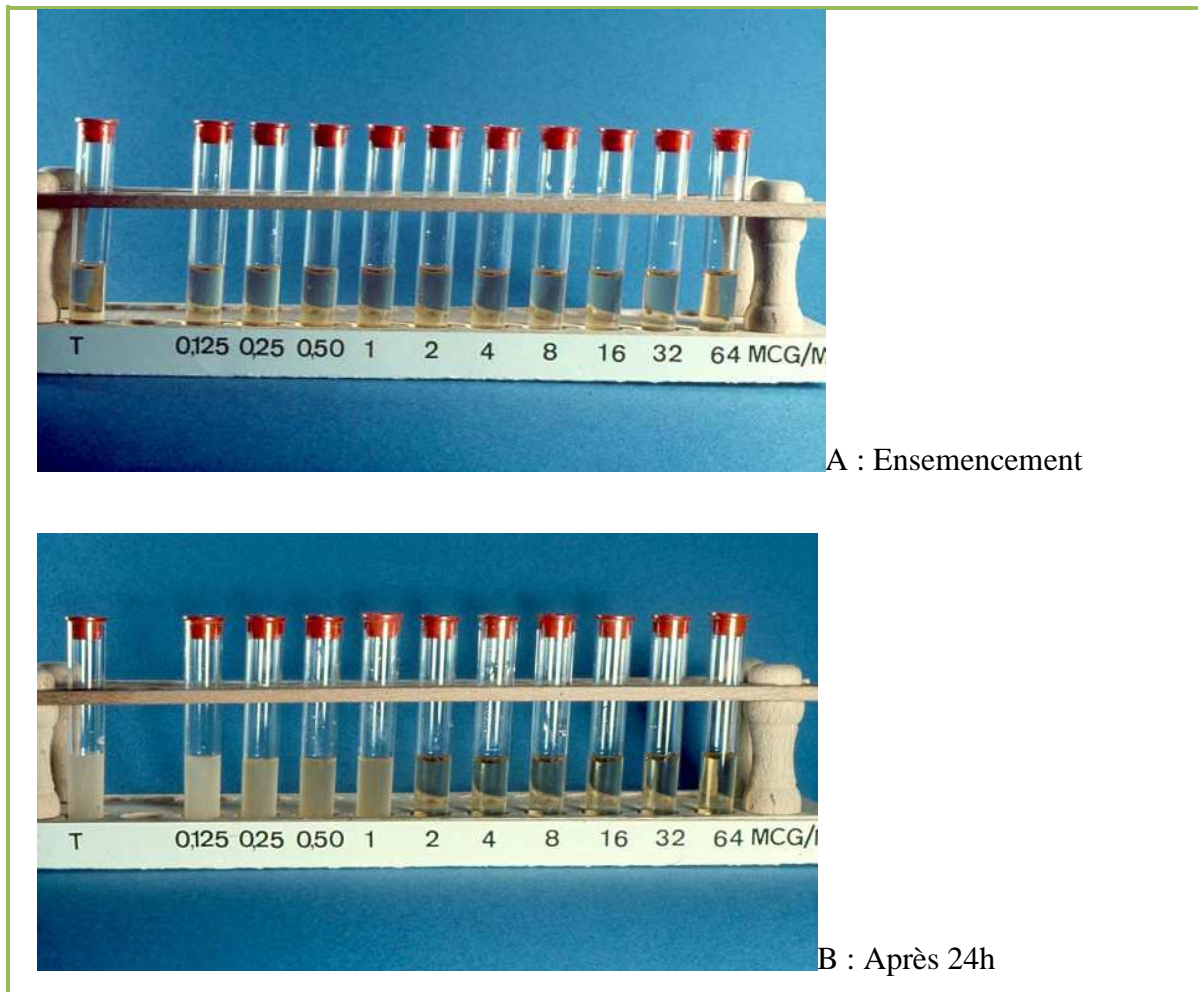
### I. 3. Techniques de détermination de l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité d'un produit sur une souche bactérienne consiste à le mettre en contact tout en observant les conséquences sur le développement et la survie de la culture bactérienne. Beaucoup de techniques ont été mises en évidence aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide.

#### I. 3.1. Technique en milieu liquide

Cette technique consiste à distribuer dans des tubes à essai contenant un certain volume nutritif ensemencé du germe à tester, différentes concentrations du produit à tester (antibiotique, huile essentielle, extrait d'une plante, substance synthétisée...).

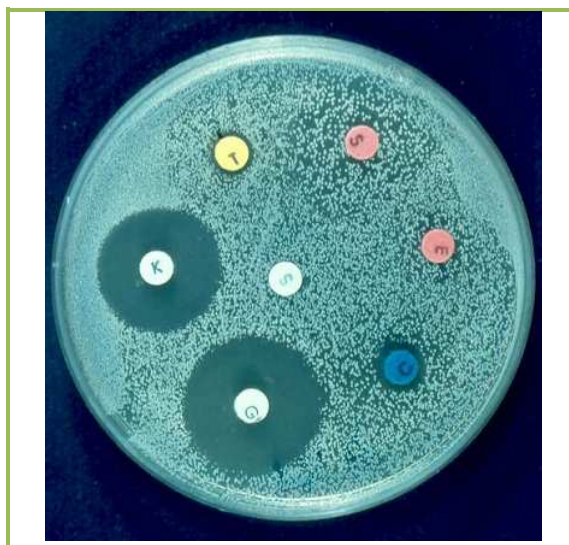
Après la durée de l'incubation des subcultures s'effectuent afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices de la croissance microbienne.



**Figure 12** : Détermination directe de la CMI en milieu liquide

### I. 3.2. Technique en milieu solide

Appelée aussi technique de l'antibiogramme. Dans cette technique on utilise des disques de papier filtre imprégnés du produit à tester en solution et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface avec une suspension bactérienne. On incorpore l'antibiotique à une concentration donnée dans la gélose. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en mm.



**Figure 13 :** Antibiogramme de quelques antibiotiques

Une variante de cette technique consiste en l'aménagement dans la gélose coulée et solidifiée en boîte de Pétri. On remplit cette cavité d'un volume donné du produit à tester qui va diffuser dans la gélose, la lecture se fait après incubation en mesurant le diamètre d'inhibition.

Dans notre travail, nous avons procédé pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et les extraits de *Cistus ladaniferus* par la technique en milieu solide, et pour la détermination de la CMI de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* la technique en milieu liquide.

## **I. 4. Pouvoir antioxydant**

Les PAM ont beaucoup d'intérêt comme source potentiel de molécules bioactives, elles ne cessent de prouver des activités biologiques intéressantes pour l'homme et pour son environnement.

Les domaines de l'industrie alimentaire et cosmétiques connaissent de vrais problèmes à cause de l'utilisation des produits industrialisés qui protègent contre l'oxydation. Il était alors recommander de trouver des antioxydants naturels qui minimisent ces dégâts.

L'oxygène joue un double rôle fondamental dans chaque processus biologique : d'une part c'est un élément indispensable à la vie, d'autre part il est responsable pour pratiquement tous les processus de décomposition. Le fer d'un clou rouillé, par exemple, a formé un alliage avec l'oxygène. Le fer est donc oxydé et a manifestement perdu de sa qualité. Il se passe la même chose avec du bois qui se brûle : le bois se lie à l'oxygène, produisant ainsi de la chaleur (feu) et des cendres (décomposition) [25].

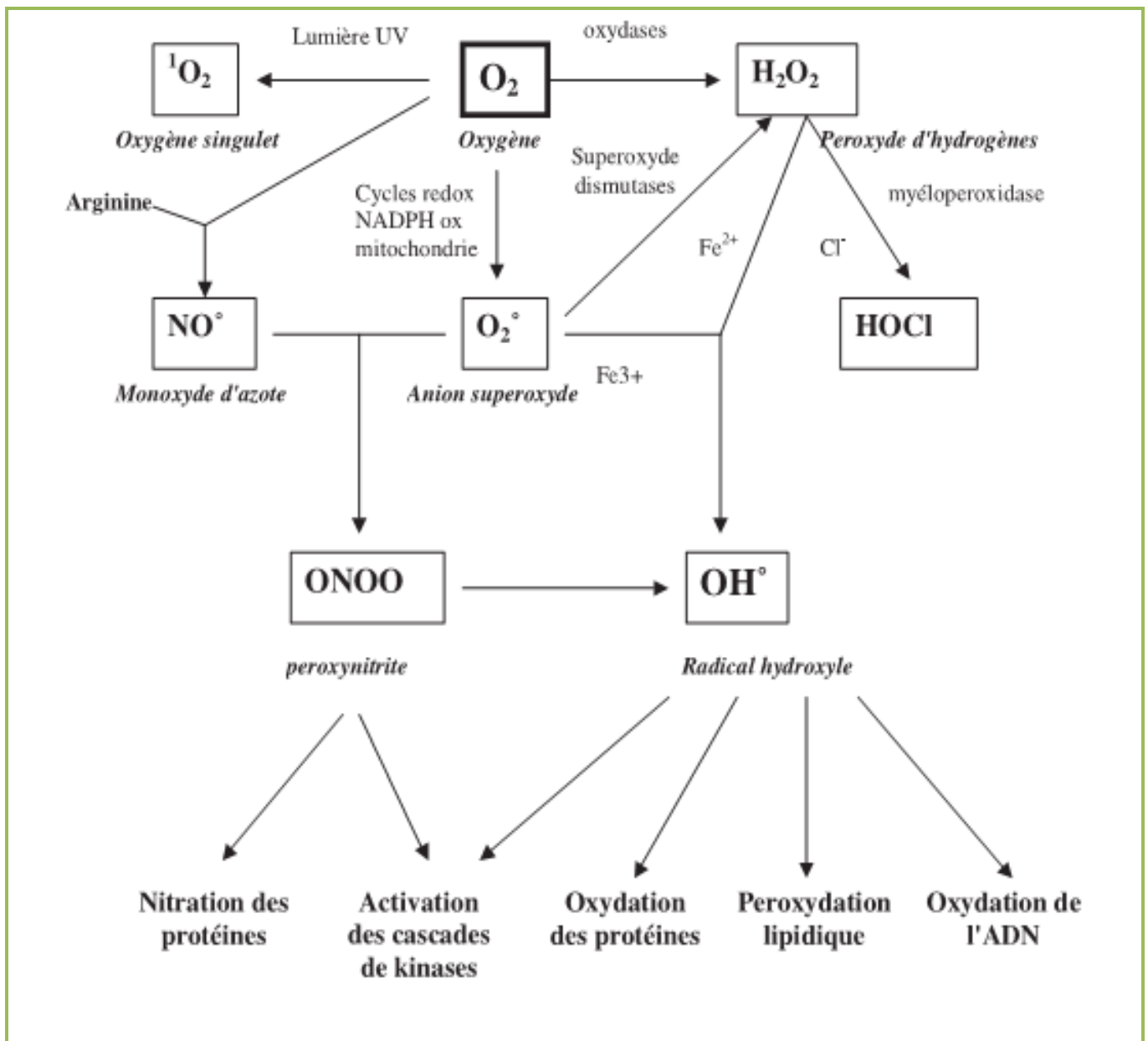
La combustion de nutriments dans nos cellules corporelles est également un processus de décomposition de ces substances, nécessitant pour cela de l'oxygène et produisant de l'énergie (chaleur). Il s'agit ici d'une oxydation souhaitée. Un clou rouillé par contre est la suite d'une oxydation non souhaitée. A côté de l'oxygène, il y a plusieurs autres éléments pouvant provoquer l'oxydation, il va de soi qu'il faut donc éviter le plus possible les processus d'oxydation non souhaitée dans notre corps. L'oxydation non souhaitée dans notre corps des acides gras, par exemple, ne provoque pas seulement la décomposition de ces acides gras, mais aussi l'apparition des « radicaux libres ».

### **I. 4.1. Les radicaux libres**

Les radicaux libres sont des particules très petites, très actives et très agressives, pouvant causer beaucoup de dégâts. Ces « terroristes » apparaissent lors de chaque processus d'oxydation ; aussi bien l'oxydation souhaitée que non souhaitée. La formation de radicaux libres dans notre corps peut également être la suite de notre division cellulaire normale, de notre système de défense et de notre système de détoxification. Extérieurement notre corps est exposé aux effets des radicaux libres par la radiation, la fumée de cigarettes et la pollution de l'air, la pollution alimentaire par les additifs synthétiques, le surmenage, le stress, les métaux lourds, etc [26].

Les radicaux libres sont des composés caractérisés par une structure électronique déséquilibrée qui leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires. Ils favorisent habituellement le bon fonctionnement de l'organisme et la santé des mammifères, mais leur excès peut être néfaste.

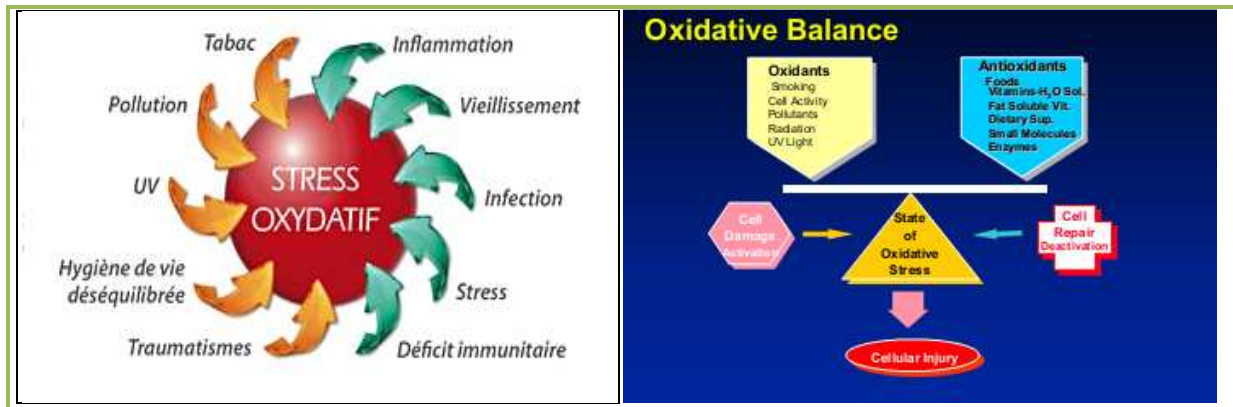
L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé « espèces réactives de l'oxygène » (EOR). Cette appellation inclut les radicaux libres et certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ) [27].



**Figure 14** : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie [27]

### I. 4.2. Le stress oxydatif

La production des radicaux libres est maîtrisée par des systèmes de défenses où la balance antioxydante / prooxydante reste équilibrée, mais dans le cas où on a un déficit en antioxydants ou par suite de déficit on a une surproduction énorme de radicaux c'est ce qu'on appelle le stress oxydant [27].



**Figure 15** : Balance oxydative

Notre corps se défend de deux manières contre un excès de radicaux libres. Il a d'une part à sa disposition les enzymes produites par le corps qui neutralisent les radicaux libres en les liants. On cite comme titre d'exemple : la catalase, le glutathion et le SOD (le super oxyde dismutase). D'autre part le corps peut disposer d'antioxydants qui sont des substances que l'on trouve généralement dans notre alimentation pouvant prévenir l'oxydation non souhaitée ainsi que la formation de radicaux libres non souhaitée comme la vitamine A, le bêta-carotène, la vitamine C, la vitamine E, la vitamine B6, le zinc, le sélénium, la taurine, la méthionine et d'autres substances comme l'ail, le pycnogénol et certaines plantes.

Les antioxydants sont alors un moyen de protéger les cellules du corps contre les dommages causés par les radicaux libres qui se sont produits par les mécanismes physiologiques et qui sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable.

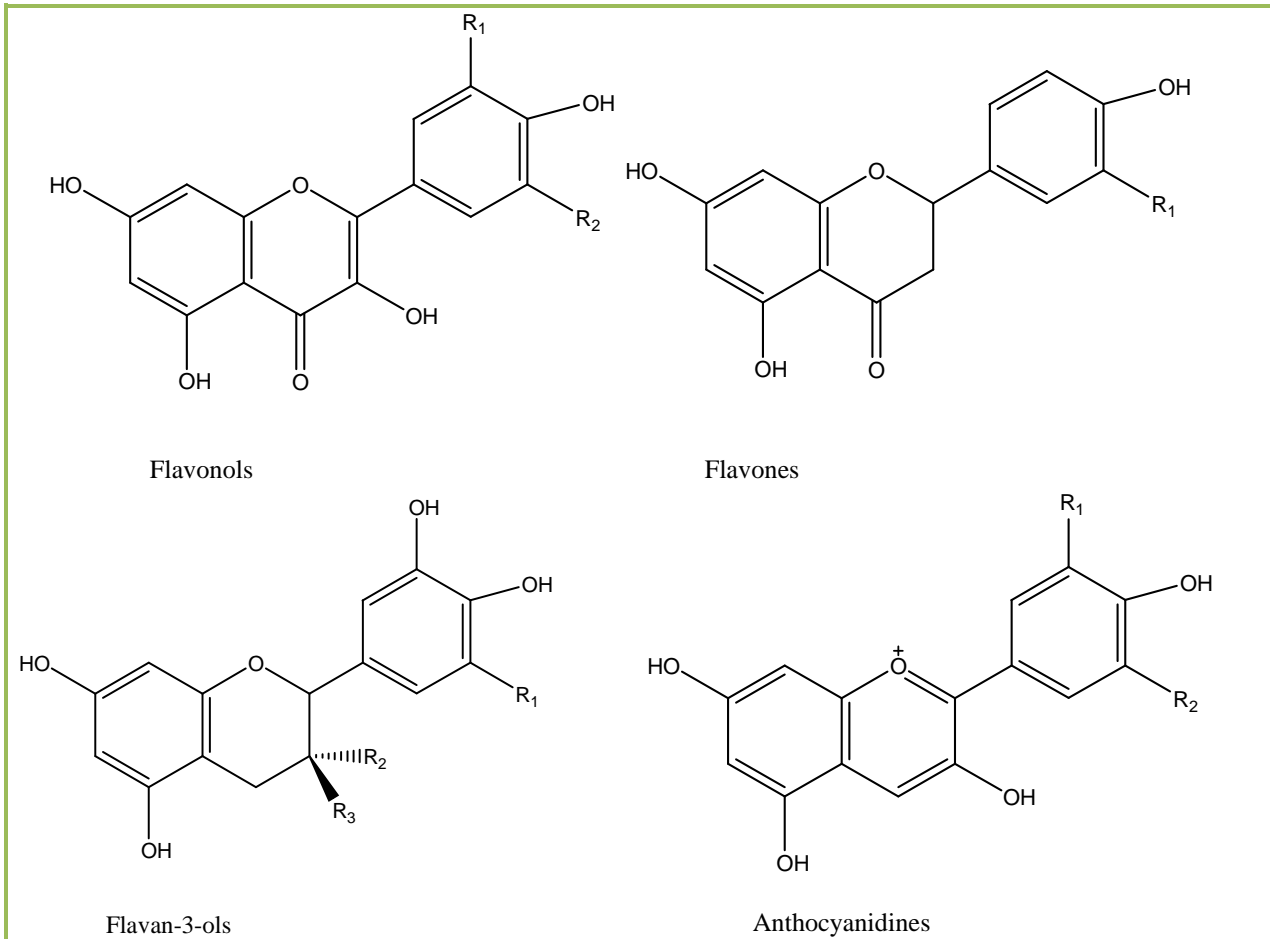
#### **I. 4.3. Revue sur l'activité antioxydante de *Cistus ladaniferus***

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux antioxydants d'origine naturels, ils ont trouvé que des plantes médicinales peuvent être des antioxydants vu la présence des métabolites à l'intérieur de leurs tissus [28]. Une étude a rapporté que *Cistus ladaniferus* peut être une bonne source pour les antioxydants naturels qui peuvent être exploités dans le domaine de l'industrie alimentaire vu le taux élevé des flavonoïdes et produits phénoliques y existant [29]. L'HE d'*Afraegle paniculata* (*Rutaceae*) a manifesté une propriété antioxydante comparable à celle de la vitamine C. Les  $CI_{50}$  sont 2,2 mg/mL pour l'HE et 1,7 mg/mL pour la vitamine C, ceci a expliqué l'emploi de cette espèce en médecine traditionnelle [30]. Une autre étude a montré que l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* (Algérie) présente un pouvoir antioxydant qui est moins efficace en comparaison à celui de la vitamine E [31]. Dans le but de tester l'activité antioxydante des plantes marocaines nous nous sommes intéressés à évaluer cette activité pour *Cistus ladaniferus* de la région du moyen atlas du Maroc.

L'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* (Espagne) contient des flavonoïdes qui sont des composés doués d'une forte activité antioxydante [32]. Les feuilles de *Cistus ladaniferus* contiennent un certain nombre d'Hydrocarbures : le Pinène, le Camphène, le Sabinène, le Myrcène, le Phellandrene, le Terpinène, le Limonène, le Cymène ; des Carbonyles : le 1,8-Cineol, le 2,2,6-Triméthylcyclohexanone, le Fenchone, le Thujone, l'iso-Menthone, le Benzaldéhyde, le Bornylacétate, l'Acétophène le Citral, et des Alcools : le Cis-Hexen-3-ol-1, le trans-Hexen-2-ol-1, le Linalool, le Terpinen-4-ol, le Borneol, le Geraniol, l'Eugénol mais aucun composé ne prédomine [33], une étude récente a mis le point sur la corrélation entre l'activité antioxydante et le pourcentage des composés polyphénoliques (Flavonoïdes), Trente extraits de plantes (y compris *Cistus ladaniferus* d'Espagne ainsi que d'autres plantes médicinales marocaines) ont été utilisés dans cette étude qui a prouvé que l'activité antioxydante a été attribuée aux composés polyphénoliques se trouvant dans ces extraits [34].

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des végétaux et assurant la protection vis-à-vis des rayonnements ultra-violet. La structure de base des flavonoïdes est celle de diphenols (deux noyaux phénol) à quinze atomes de carbone, assemblage C6-C3-C6. Les flavonoïdes sont les composés biologiquement les plus actifs parmi les polyphénols, leur nombre avoisine 5000 molécules. Parmi les différentes classes de flavonoïdes on trouve:

- flavonols (kaempférol, quercétine, myricétine, isorhamnétine ...)
- flavones (apigénine, lutéoline)
- flavan-3-ols (catéchines, épicatechines, théaflavines et théarubigines ...)
- anthocyanidines (cyanidine, delphinidine, malvidine, pélagonidine ...)
- chalcones et aurones.



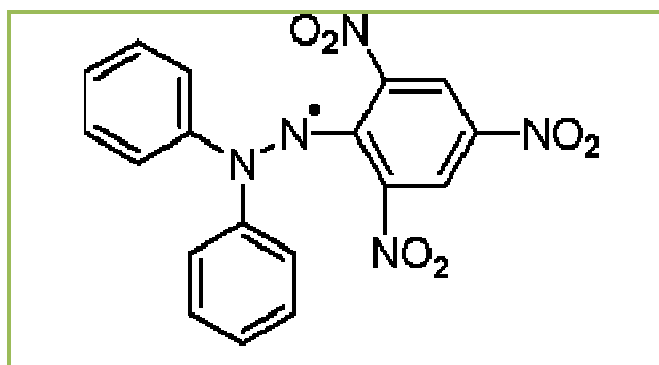
**Figure 16** : Les structures chimiques de quelques flavonoïdes

Ils sont présents le plus souvent sous les forme d'hétérosides (combinés à un ou plusieurs sucres : oses), dans les fruits, légumes, thé et quasiment toutes les plantes médicinales. Les flavonoïdes sont connus pour leur activité antioxydante [35], ils sont des vrais piègeurs des radicaux libres [36].

Ils ont aussi une action de protection vasculaire = action vitaminique P (P pour perméabilité) en tant que cofacteurs de la vitamine C (acide ascorbique), ainsi qu'une action anti-inflammatoire [37]. Ils pourraient réduire la prolifération cellulaire et exercer une activité antitumorale, surtout certains dérivés de flavones [38], et des chalcones [39].

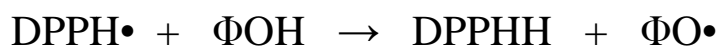
Les flavonoïdes ont d'autres propriétés tels que : propriétés anti-angiogéniques (apigénine, lutéoline) [40, 41], ils préviennent la fixation des hormones cancérogènes sur les cellules (isoflavones). Ils ont aussi une Action de prévention des cancers, surtout par combinaison synergique d'agents chimiopréventifs [42], ils sont anti-hépatotoxiques, anti-ulcéreux et certains sont anxiolytiques, tranquillisants, ligands pour les récepteurs aux benzodiazépines [43].

Pour tester l'activité antioxydante des extraits de *Cistus ladaniferus*, à savoir l'extrait de l'Hexane, l'extrait de DCM, l'extrait d'AcOEt, l'extrait de MeOH et l'extrait aqueux, nous avons procédé selon la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Ce composé chimique fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [44]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, le DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. Ce radical stable possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit la coloration devient jaune pale, la mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette due à une recombinaison des radicaux DPPH• mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.



**Figure 17** : Structure chimique du radical libre DPPH•

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants (groupements phénoliques), se fait par la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques). Le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transformé en une molécule stable DPPHH [45] selon la réaction :



## **II. PARTIE EXPERIMENTALE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE**

### **II. 1. Matériels et méthodes**

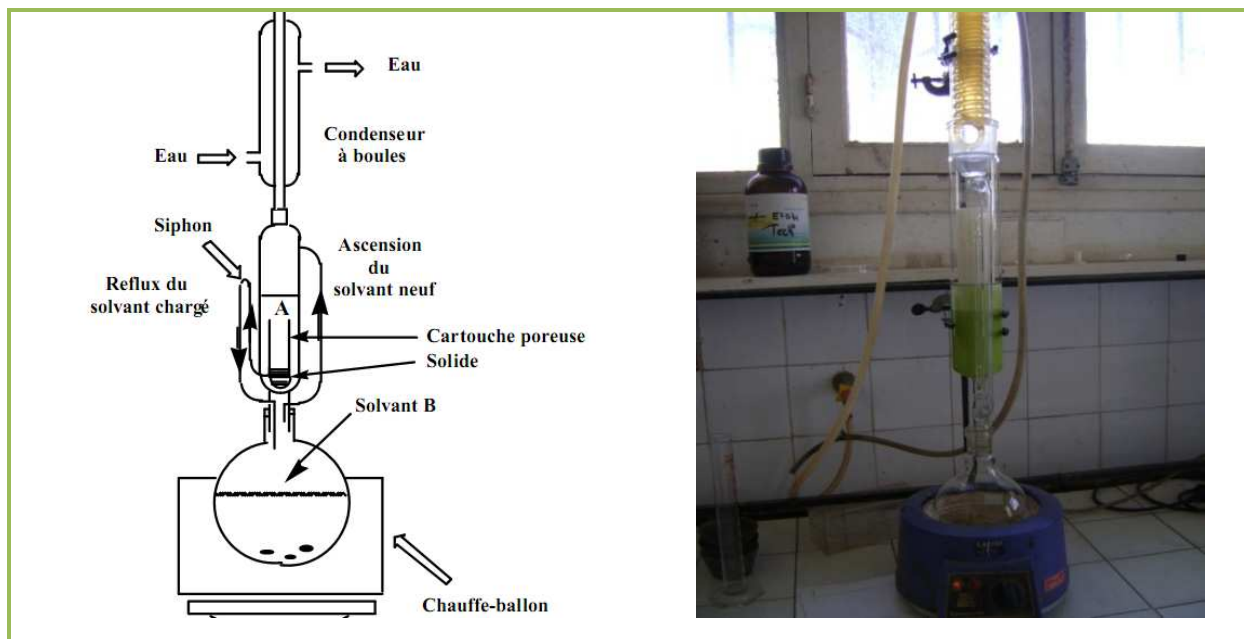
#### **II. 1.1. Matériels**

##### **II. 1.1.1. Les produits à tester**

Pour tester l'activité antibactérienne de la plante étudiée nous avons utilisé l'huile essentielle et cinq types d'extraits de *Cistus ladaniferus* : un à l'hexane, un au dichlorométhane, un à l'acétate d'éthyle, un au méthanol et un dernier aqueux. L'huile essentielle et les différents extraits testés ont été préparés au Laboratoire de Substance Naturelles et Thermolyse Eclair de la Faculté des Sciences de Rabat.

Pour l'huile essentielle nous avons utilisé la méthode d'hydrodistillation décrite dans la première partie.

Pour les extraits hexanique, dichlorométhanique, acétate éthylique et méthanolique nous avons utilisé l'extracteur de Soxhlet, il s'agit d'un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide/liquide. Le rapport solide/liquide est de 1/5 à 1/10 (v/v), le solvant est porté à ébullition, puis condensé avec le condenseur à boules, dans le réservoir à siphon, contenant le solide à extraire dans une cartouche de papier épais. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation du solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute. Ce cycle peut être répété plusieurs fois, selon la facilité avec laquelle le produit diffuse dans le solvant.



**Figure 18** : Extracteur Soxhlet

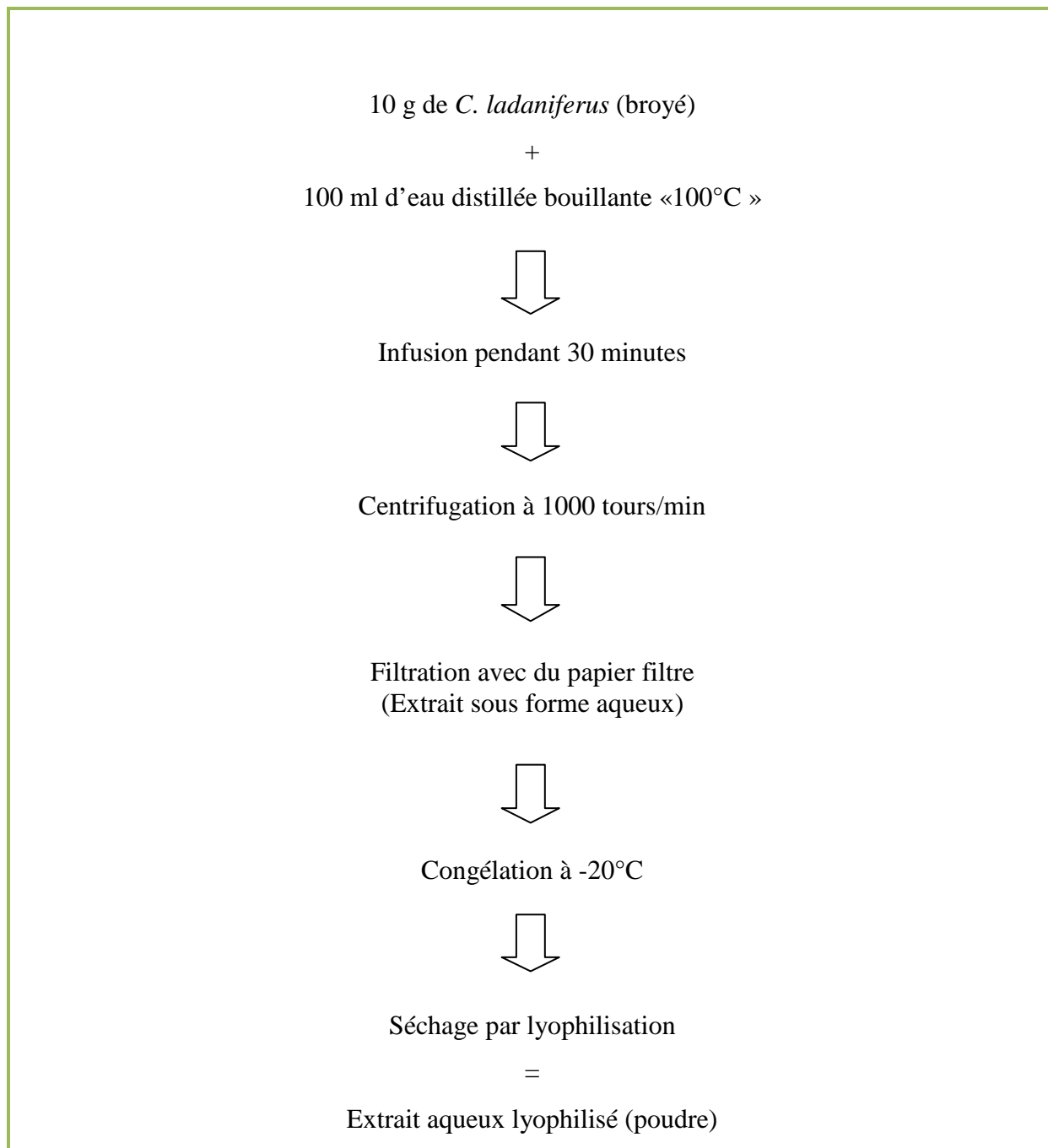
Pour réaliser l'extraction, nous avons placé dans une cartouche 200 g de *Cistus ladaniferus* en poudre, nous avons rempli le ballon avec 800 ml du solvant et nous avons mis le système en marche jusqu'à l'extraction de la majorité des substances existantes dans l'échantillon (24 h).

Nous avons réalisé cette extraction à l'aide de solvants de polarité croissante en allant par du moins polaire au plus polaire : l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Les extraits obtenus sont récupérés après évaporation complète du solvant à l'aide du rotavapeur. Ils sont ensuite placés dans des petits flacons opaques et conservés à 4 °C.

Pour l'extrait aqueux, l'extraction des substances bioactives contenues dans la partie aérienne de la plante (poudre de *Cistus ladaniferus*) est réalisée par infusion dans l'eau distillée bouillante.

Après broyage de la partie aérienne de *Cistus ladaniferus*, 10 g de poudre de la plante sont additionnés à 100 ml d'eau distillée bouillante. On laisse 30 minutes pour infusion avec agitation magnétique. L'extrait aqueux obtenu est ensuite centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 minutes pour se débarrasser des débris de plantes puis filtré sur papier filtre.

Le filtrat (68 ml ± 6) est ensuite lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur. La congélation de l'extrait à -20°C est une condition nécessaire avant lyophilisation afin de garder intacte les molécules extraites de la partie aérienne de la plante choisie.



**Figure 19** : Schéma du protocole

### II. 1.1.2. Les souches bactériennes

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est constitué de souches bactériennes appartenant à la collection des souches de l'INH, elles sont conservées au Département de Bactériologie Médical de l'INH et ont été isolées à partir des différents liquides biologiques des patients. Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance, on les utilise entre autres pour le criblage des substances naturelles ou de synthèse à effet antimicrobien.

Ces souches sont regroupées dans le tableau qui suit, où nous avons mentionné la source et les pathogènes dont elles sont responsables.

**Tableau 14** : Les souches bactériennes utilisées

Les groupes des souches testées	Les souches testées	La source des souches
Gram-positive	<i>Streptococcus sanguis</i>	Infections cutanées
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	Infections urinaires
	<i>Multi résistant</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Infections nosocomiales
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Infections urinaires
Gram-négative Non entérobactéries	<i>Acinetobacter baumannii</i> ,	Infections nosocomiales
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ,	Infections de l'oreille
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infections urinaires
Gram-négative entérobactéries	<i>salmonella enteritidis</i>	Toxi infection Alimentaire
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Toxi infection Alimentaire
	<i>Salmonella arizonae</i>	Toxi infection Alimentaire
	<i>Hafnia alveie</i>	Infections urinaires
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Toxi infection Alimentaire
	<i>Escherichia coli</i>	Infections vaginales
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Infections urinaires

### **II. 1.1.3. Les milieux de culture**

Les milieux utilisés pour l'entretien des souches et l'étude de la sensibilité bactérienne aux extraits testés sont : le milieu Breat Heart Infusion (BHI), et le milieu Mueller Hinton Agar (MHA) qui est standardisé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Pour les solvants nous avons utilisé :

- ✓ l'eau physiologique stérile : NaCl (9g/l), pour préparer et diluer les suspensions bactériennes.
- ✓ le Twin 80% : pour solubiliser l'huile essentielle
- ✓ l'eau distillé pour solubiliser l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux.
- ✓ le DMSO pour solubiliser l'extrait de l'Hexane, de Dichlorométhane et de l'Acétate d'éthyle.

### **II. 1.2. Méthodes**

#### **II. 1.2.1. Dilution des essais**

Pour l'extrait aqueux et l'extrait MeOH, nous avons effectué des dilutions avec de l'eau distillée stérile, et pour les extraits de l'hexane, de DCM et de l'EtOAc nous avons utilisé le DMSO, et pour l'HE le Twin 80% selon la même procédure. Les résultats les plus significatifs ont été enregistrés pour les dilutions de l'ordre de 1/2.

#### **II. 1.2.2. Test d'écouvillonnage**

On dispose des colonies pures de différentes souches bactériennes sur un milieu de culture, on met stérilement de l'eau physiologique dans un tube à hémolyse puis on prélève une fraction des colonies pures et on les met en suspension. L'opacité est ensuite ajustée afin d'avoir un inoculum qui correspond à l'échelle 0,5 de Mac Farland [46].

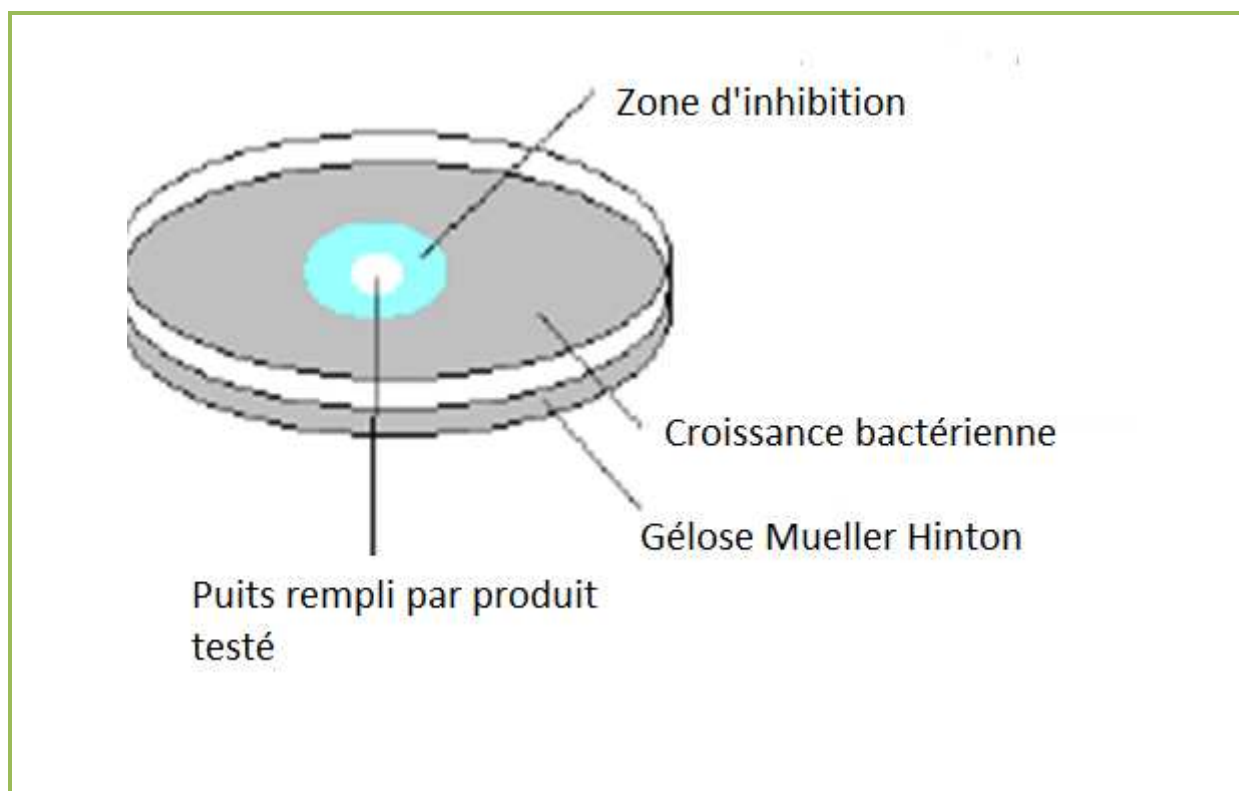
On fait couler stérilement 18 ml de milieu MHA dans des boîtes de Pétri, une fois la gélose est solidifiée les boîtes sont conservées à +4°C jusqu'à la date d'utilisation qui ne doit pas dépasser une semaine. On trempe l'écouvillon dans la suspension puis on ensemence par la suite la gélose par 1ml de suspension (eau physiologique contenant une souche active).

On laisse sécher 3 à 5 minutes, on met par la suite des puits sur le fond de la boîte (Il faut les éloigner de 1 cm du bord minimum), on remplit ces puits par 50  $\mu$ l d'extrait qu'on veut tester pour différentes dilutions. On les dépose dans un endroit froid à +4°C durant 30 min pour faciliter la diffusion des extraits surtout pour l'huile essentielle et empêcher sa volatilité immédiate. L'incubation se fait à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Les tests ont été répétés trois fois et pour chaque test antibactérien on a associé deux boîtes témoins, afin de vérifier l'absence de contamination pendant l'ensemencement.

### II. 1.2.3. La lecture des résultats

La lecture des résultats obtenus se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition produite autour des puits après incubation.



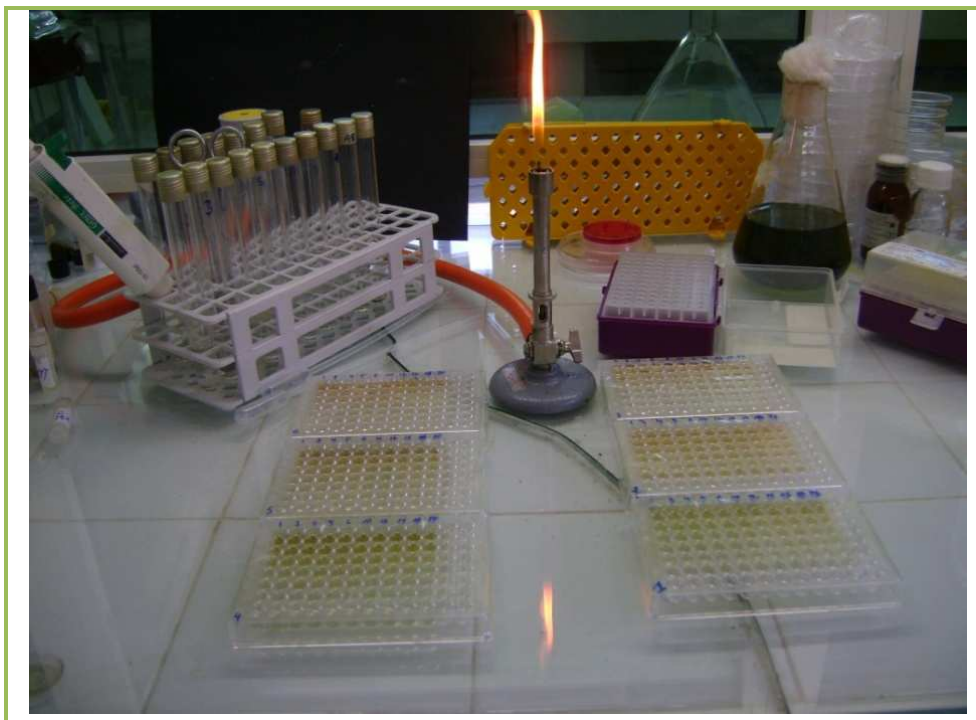
**Figure 20** : Schéma représentant une zone d'inhibition

#### II. 1.2.4. Détermination de la CMI

Nous avons adopté pour la détermination de la CMI, la technique de microtitration décrite par Eloff [47] sur microplaques stériles en utilisant le MTT : le bromure de [3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium] (sigma, Saint-Louis, MO) comme indicateur de variabilité.

Dans chaque puits, on verse 80  $\mu$ l de milieu de culture liquide (BHI), on ajoute 90  $\mu$ l du produit à tester, des dilutions successives ont été ensuite réalisées.

Chaque puit est ensuiteensemencé par 10  $\mu$ l de la suspension des microorganismes et à la fin de la période d'incubation à la température adéquate, le MTT est préparé extemporanément à 0,4 mg/ml dans de l'eau physiologique stérile. 10  $\mu$ l de la solution MTT sont rajoutés dans chaque puit, la plaque est ré-incubée pendant 10 à 30 minutes à 37°C.



**Figure 21** : Des plaques pour la microtitration

Les puits où nous avons observé une coloration bleue violette, indiquaient une croissance microbienne.

## II. 2. Résultats et discussion

### II. 2.1. Diamètres d'inhibition

Les diamètres d'inhibitions obtenus lors de criblage de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et des différents extraits de *Cistus ladaniferus* sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau 15** : Activité des différents extraits de *Cistus ladaniferus* (diamètre de la zone d'inhibition des cultures microbiennes en mm)

Dilutions Souches	HE			Ext Hexane			Ext EtOAc			Ext MeOH			Ext DCM			Ext H <sub>2</sub> O		
	1/2	1/4	1/8	1/2	1/4	1/8	1/2	1/4	1/8	1/2	1/4	1/8	1/2	1/4	1/8	1/2	1/4	1/8
<b>SS</b>	20	19	18	11,5	10	-	13,5	11	8	21,5	19	15	12	11	-	15	12	11
<b>SE</b>	25	23	19	10,5	8	-	11,5	10	8	23	19	17	16	15	12	20	18	15
<b>SA</b>	27	25	22	12	10	-	12	10	8	21	19	15	16	15	13	20	17	15
<b>MSA</b>	28	25	21	-	-	-	13	11	8	19	17	16	-	-	-	15	14	11
<b>SL1</b>	12	11	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PA</b>	12	10	10	-	-	-	12	11	-	21	18	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>HA</b>	13	10	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SL3</b>	15	14	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>KP</b>	15	14	14	-	-	-	-	-	-	17	15	13	-	-	-	16	15	12
<b>EC</b>	18	17	17	10	8	8	10	8	-	15,5	12	10,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>SL2</b>	19	17	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PF</b>	22	20	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>AB</b>	24	20	18	-	-	-	-	-	-	20	19	13	18	17	13	20	19	15
<b>Y</b>	25	22	19	8	-	-	11	10	-	21	18	15	13	11	-	18	17	13

**SS** :*Streptococcus sanguins*, **SE** :*Staphylococcus epidermis*, **SA** :*Staphylococcus aureus*, **MSA** :multi résistant *Staphylococcus aureus*, **SL1** :*salmonella enteritidis*, **PA** :*Pseudomonas aeruginosa*, **HA** :*Hafnia alveie*, **SL3** :*Salmonella arizonae*, **KP** :*Klebsiella pneumoniae*, **EC** :*Escherichia coli*, **SL2** :*Salmonella Typhimurium*, **PF** :*Pseudomonas fluorescens*, **AB** :*Acinetobacter baumannii*, **Y** :*Yersinia enterocolitica*. **HE** : Huile essentielle ; **Ext Hexane** : Extrait de l'hexane ; **Ext EtOAc** : Extrait de l'acétate d'éthyle ; **Ext MeOH** : Extrait de méthanol ; **Ext DCM** : Extrait de dichlorométhane ; **Ext H<sub>2</sub>O** : Extrait aqueux ; ND : non déterminé.

Nous donnons ci-dessous quelques photos montrant les zones d'inhibition :

**Pour l'huile essentielle:**

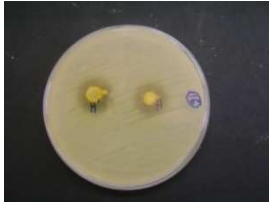


Photo 1: *Klebsiella pneumoniae*



Photo 2: *Acinetobacter baumannii*

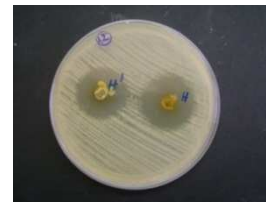


Photo 3: *Staphylococcus aureus*

**Pour l'extrait méthanolique:**



Photo 4: *Staphylococcus aureus*



Photo 5: *Streptococcus sanguinis*



Photo 6: *Acinetobacter baumannii*



Photo 7: *Escherichia coli*

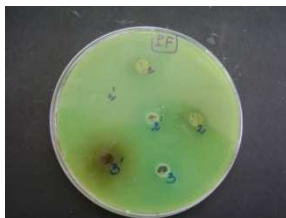


Photo 8: *Pseudomonas fluorescens*



Photo 9: *Salmonella Typhimurium*

**Figure 22 :** Photos montrant des zones d'inhibition de la croissance bactérienne

## II. 2.2. La CMI de l'HE

La concentration minimale inhibitrice a été déterminée pour l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*, nous avons présenté les résultats dans le tableau suivant :

**Tableau 16** : La CMI de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

Souches	<i>SS</i>	<i>SE</i>	<i>SA</i>	<i>MSA</i>	<i>SL1</i>	<i>PA</i>	<i>HA</i>	<i>SL3</i>	<i>KP</i>	<i>EC</i>	<i>SL2</i>	<i>PF</i>	<i>AB</i>	<i>Y</i>
CMI (µg/ml)	++	++	+	+++	-	++	+	+	++	+	+	-	+	+++

*SS* : *Streptococcus sanguinis*, *SE* : *Staphylococcus epidermis*, *SA* : *Staphylococcus aureus*, *MSA* : multi résistant *Staphylococcus aureus*, *SL1* : *salmonella enteritidis*, *PA* : *Pseudomonas aeruginosa*, *HA* : *Hafnia alveie*, *SL3* : *Salmonella arizonae*, *KP* : *Klebsiella pneumoniae*, *EC* : *Escherichia coli*, *SL2* : *Salmonella Typhimurium*, *PF* : *Pseudomonas fluorescens*, *AB* : *Acinetobacter baumannii*, *Y* : *Yersinia enterocolitica*. CMI : concentration minimale inhibitrice. + : 250µg/ml, ++ : 125µg/ml, +++ : 50µg/ml, - : Pas d'activité.

La photo qui suit montre une microplaque utilisée pour la détermination de la CMI.



**Figure 23** : Microplaque montrant la présence des souches bactérienne

### **II. 3. Discussion**

Les essais de criblage du pouvoir antimicrobien ont été réalisés par la méthode de diffusion sur gel. C'est un test préliminaire et qualitatif, recommandé par la pharmacopée française afin d'avoir une idée sur le potentiel inhibiteur de l'huile essentielle et de quelques extraits de *Cistus ladaniferus*.

D'après les résultats trouvés, il apparaît qu'au moins un des produits issus par l'extraction a manifesté une activité. On remarque que pour l'huile essentielle, toutes les souches bactériennes sont sensibles avec un diamètre d'inhibition considérable ; les souches Gram positives ont un diamètre d'inhibition avec une moyenne de l'ordre de 25 mm ; pour les souches Gram négatives on a observé une diminution de la zone d'inhibition par rapport à la première catégorie et pour les mêmes concentrations en huile essentielle avec un diamètre d'inhibitions d'une moyenne de l'ordre de 17,5 mm. On trouve toujours pour chaque essai que le diamètre d'inhibition est proportionnel à la concentration en huile essentielle.

Contre *Staphylococcus aureus* (photo 3), l'huile essentielle montre une efficacité inhibitrice avec un diamètre d'inhibition allant jusqu'à 28 mm (la CMI est de l'ordre de 250 µg/ml). Pour les souches Gram négatives, qui présentent généralement de fortes résistances, on trouve des diamètres d'inhibitions compris entre 24 mm pour la souche *Acinetobacter baumannii* (CMI : 250µg/ml ; photo 2), et 12mm pour la souche *Salmonella enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa* qui ont enregistré une CMI considérable (125µg/ml), la CMI de la souche *Yersinia enterocolitica* était la plus intéressante dans l'ensemble (62.5 µg/ml).

Dans une étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* provenant d'Unités Commerciales (Distilleries « U Mandriolu » et « Phytosun »), sur 7 souches bactériennes en utilisant la méthode de diffusion par disque, *Staphylococcus aureus* était la plus sensible à l'huile essentielle avec une CMI de l'ordre de 200 µg/ml [48].

Beaucoup de travaux entrepris ont montré que les bactéries Gram positives ont une forte sensibilité pour les huiles essentielles que les bactéries Gram négatives [49], la structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives les rend toutefois plus sensibles à l'action de ces huiles que celle des souches Gram négatives qui limite le passage des substances [50].

Pour notre étude, il ressort des résultats obtenus que l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* de la région d'Oulmès prononce une activité inhibitrice sur l'ensemble des bactéries testées aussi bien Gram négatives que Gram positives.

Les valeurs de diamètres d'inhibition obtenus dans le cas des extraits avec les différents solvants de l'espèce *Cistus ladaniferus* sont généralement faibles par rapport à ceux obtenus dans le cas de l'huile essentielle.

Selon les chiffres mentionnés dans le tableau des résultats, on constate que l'extrait méthanolique présente des diamètres d'inhibition considérables, pour les souches bactériennes Gram positives, on enregistre une moyenne de 21 mm, tandis que certaines souches Gram négatives ont montré une certaine résistance, il s'agit des souches *Salmonella enteritidis*, *Hafnia alveie*, *Salmonella arizonae*, *Pseudomonas fluorescens* (photo 8), *Salmonella Typhimurium* (photo 9) pour laquelle la moyenne de diamètre d'inhibition est de l'ordre de 18.9 mm.

Des résultats obtenus concernant l'activité antibactérienne des extraits aqueux de 15 plantes médicinales testées ont montré que trois de ces plantes : *Myrtus communis*, *Cistus ladaniferus* et *Cistus monspeliensis* sont dotées d'une activité antibactérienne importante. Le spectre d'action de quatre extraits chimiques (méthanolique, éthanolique, à l'acétate d'éthyle et aqueux) de ces plantes contre 14 souches bactériennes Gram positives et Gram négatives a montré que les bactéries Gram positives sont plus sensibles aux extraits des plantes que les bactéries Gram négatives [51].

Pour notre extrait aqueux nous avons constaté pratiquement les mêmes résultats qui ont été obtenus pour l'extrait méthanolique avec des diamètres d'inhibition un peu faibles par rapport aux diamètres d'inhibition trouvés.

Pour les extraits hexanique, dichlorométhanolique et éthylacétyleique nous avons observé des diamètres d'inhibitions moyennement faibles en comparaison avec ce qui précède, pour l'extrait de l'AcOEt, le produit a inhibé la croissance de quatre souches Gram positives avec un diamètre d'inhibition de moyenne de 12,5 mm, alors que pour les souches Gram négatives seules trois souches parmi les dix souches ont manifesté une inhibition, avec un diamètre d'inhibition de moyenne 11 mm.

Pour les extraits de dichlorométhane et de l'Hexane, nous avons constaté une inhibition de trois souches Gram positives sur quatre souches, avec un diamètre d'inhibition de moyenne de 14,5 mm pour DCM et de 11,3 mm pour l'Hexane.

L'inhibition des souches Gram négatives a enregistré une grande résistance, on a observé pour l'extrait de DCM l'inhibition de deux souches parmi huit souches avec un diamètre d'inhibition de moyenne de 15,5 mm, et pour l'extrait hexanique on n'a eu l'inhibition que de deux souches sur les dix souches que nous avons testé avec un diamètre de zone d'inhibition faible de moyenne de 9 mm.

On a remarqué que selon l'ordre croissant de la polarité des solvants utilisés pour l'extraction, l'activité antibactérienne se prononce de mieux en mieux, on peut expliquer ceci par le nombre et la nature des composés extraits ; pour l'extrait hexanique (inhibition de la croissance de 5 souches sur 14), ceci explique un pouvoir antibactérien beaucoup plus faible que celui trouvé dans le cas de l'extrait méthanolique (inhibition de la croissance de 9 souches sur 14).

### III. PARTIE EXPERIMENTALE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Le test de l'activité antioxydante des extraits de *Cistus ladaniferus* a été réalisé au laboratoire de l'institut Pharmaceutique Biologie et Biotechnologie de l'université Heinrich Heine de Dusseldorf en Allemagne.

#### III. 1. Matériels et méthodes

##### III. 1.1. Matériels

Les produits que nous avons testés sont des extraits de *Cistus ladaniferus*, il s'agit des extraits à l'hexane, au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle, au méthanol et l'extrait aqueux, ces extraits nous les avons préparés selon le protocole décrit auparavant.

##### III. 1.2. La préparation de la solution

Nous avons procédé pour réaliser l'évaluation de l'activité antioxydante suivant le protocole décrit par Lopes-Lutz [52], nous avons solubilisé le DPPH dans le méthanol absolu pour avoir une solution de DPPH (solution violette), les échantillons des extraits ont été préparés par dissolution dans le méthanol à raison de 1.7 mg/ml. Les solutions mères ont subis ensuite des dilutions pour avoir les concentrations suivantes : 50, 150, 300 et 450 µg/ml.

Dans des cuves, nous avons introduit 3 ml de chaque extrait et 1 ml de la solution méthanolique au DPPH (4.5 mg/100 ml). Les tubes sont ensuite placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min dans le spectrophotomètre et la lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Pour chaque dilution nous avons préparé un blanc constitué de la solution de DPPH et un contrôle positif constitué d'une solution de propylgallate (76 µM), (antioxydant de référence). Les tests ont été répétés 3 fois pour chaque dilution.

L'absorbance a été mesuré après 30 min, les valeurs obtenues sont transformées ensuite en pourcentage en utilisant la formule suivante :

$$A_A (\%) = [(A_B - A_P) / (A_B - A_{Pos})] \times 100$$

Où :

$A_A$  : l'activité antioxydante en comparaison avec le contrôle positive.

$A_B$  : l'absorption de la solution de DPPH

$A_P$  : l'absorption de l'échantillon (extrait)

$A_{Pos}$  : l'absorption du contrôle positif (propylgallate).

### III. 2. Résultats

En présence des piègeurs des radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en DPPHH (2, 2 diphenyl 1 picryl hydrazine) de couleur jaune [53].

L'activité antioxydante de nos produits a été évaluée par la méthode de DPPH. La solution méthanolique de DPPH $\cdot$  présente une coloration violette, le protocole appliqué repose sur la réduction de DPPH par un composé à propriété anti-radicalaire qui entraîne sa décoloration. En présence d'un antioxydant, la forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune et par conséquent une diminution de l'absorbance.

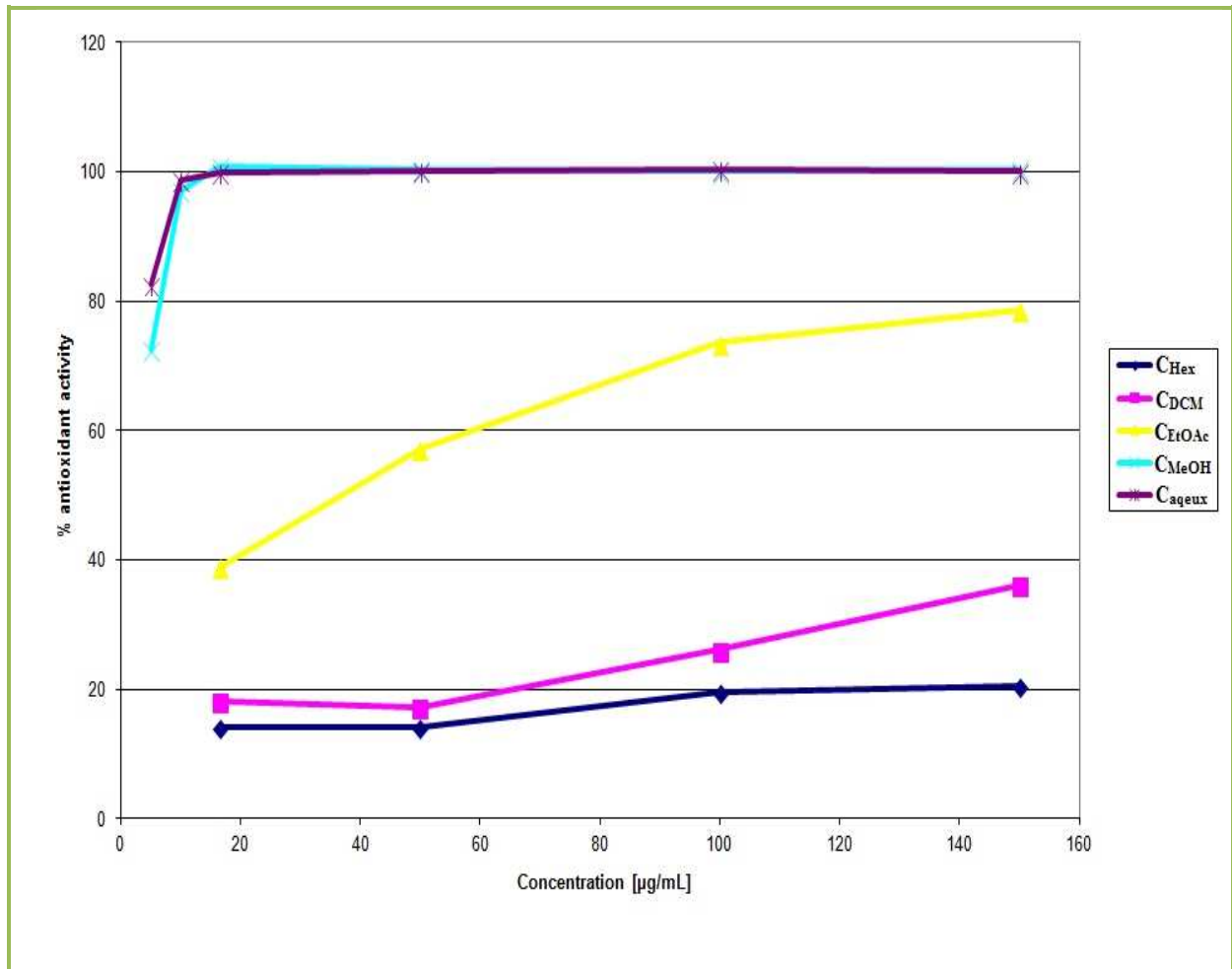


**Figure 24** : Transformation de coloration de la solution DPPH

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été comparé à celui du propylgallate connu par son pouvoir anti radicalaire et donc antioxydant élevé.

Le test précédant nous a permis de déterminer l'activité antioxydante des différents extraits de *Cistus ladaniferus*. La détermination du pourcentage de cette activité a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 517 nm.

La figure qui suit représente la variation du pourcentage de l'activité antioxydante en fonction des concentrations des extraits de *Cistus ladaniferus* testés.



**Figure 25 :** Activité antioxydante des extraits de *Cistus ladaniferus*

### III. 3. Discussion

Les résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité antioxydante révèlent que tous les extraits testés ont un pouvoir antioxydant. L'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *Cistus ladaniferus* ont présenté une forte activité antioxydante, cette activité atteint 100% pour une concentration de 10 µg/mL pour les deux extraits.

Pour l'extrait de l'acétate d'éthyle, cette activité reste marquante et nous avons observé qu'elle se corrèle avec la concentration. Les extraits de dichlorométhane et de l'hexane prononcent une activité moyennement faible qui peut atteindre respectivement 38% et 20%.

Dans une étude sur les fractions de l'acétate d'éthyle et du n-butanol, de l'extrait éthanolique de *Cistus ladaniferus*, les auteurs ont adopté l'idée que cette plante peut être une source d'antioxydants naturels qui peuvent trouver utilisation dans l'industrie alimentaire [54].

Dans le but de trouver une corrélation entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques de 30 plantes utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique, Dudonné et *al.* ont prouvé que l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* originaire d'Espagne contient une importante composition en polyphénols et une bonne activité antioxydante et ceci en utilisant les différentes méthodes de la détermination de cette activité [55]. Ceci indique que les composés phénoliques sont les principaux contributeurs des propriétés antioxydantes pour ces plantes étudiées. *Cistus ladaniferus* se caractérise donc par des propriétés biologiques importantes, les produits dérivés de cette plante peuvent être des piègeurs des radicaux libres à prendre en considération.

## CONCLUSION

L'évaluation de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* a permis d'affirmer qu'elle a un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de tous les microorganismes testés indépendamment de leurs Gram, signalons que la bactérie à Gram positive était plus sensible que la bactérie à Gram négative.

Notre étude est la première faite sur l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* de la région du moyen Atlas (Oulmès) et qui a donné de bons résultats pour une inhibition de la croissance bactérienne qui cause des infections nosocomiales (provoquées par les souches : *Acinetobacter baumannii*, multi résistant *Staphylococcus aureus*), les infections alimentaires (provoquées par la souche *Yersinia enterocolitica*) ainsi que les infections urinaires (provoquées par les souches *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*).

Les extraits par les différents solvants de *Cistus ladaniferus* exhibent une activité antibactérienne contre la plupart des souches testées en dépit de leur morphologie et de leur Gram. Les résultats montrent que la bactérie Gram négative est plus résistante que la bactérie Gram positive. En effet, cette activité est due à la richesse en composés existants dans l'huile essentielle ainsi que dans les extraits (différents terpènes, polyphénols et flavonoides) [56].

L'activité antioxydante de différents extraits de *Cistus ladaniferus* est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques se trouvant dans sa composition chimique. En présence d'un radical libre DPPH•, l'atome d'hydrogène est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène.

Le pouvoir antioxydant puissant des extraits de *Cistus ladaniferus* peut être expliqué par le contenu phénolique des différents organes de cette plante connue par ses activités biologiques intéressantes. Bien que le test au DPPH• soit considéré comme une méthode simple, rapide et facile à mettre en œuvre, des expériences ont montré certaines difficultés de l'évaluation de l'activité antiradicalaire ceci doit être interprété avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH• à 515-520 nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et le type du solvant additionné à l'antioxydant [57].

Le test au DPPH n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH• et ainsi, d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques.

Les résultats montrent que *Cistus ladaniferus* est une plante dotée de propriétés biologiques importantes puisque les résultats du pouvoir antioxydant sont très intéressants. *Cistus ladaniferus* au Maroc peut être une source d'antioxydants naturels qui peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire et remplacer les antioxydants chimiques. .

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Haddouchi F. et al., (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria, *Food Chemistry*, 141 (1) : 253–258.
- [2]. Vlietinck A. J. et al., (1991). Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *Journal of Ethnopharmacology, Elsevier*, 32, (1–3) : 141–153.
- [3]. Grabley S. et Theiercke R., (1999). Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, Vol 64 : 101-54.
- [4]. Okigbo N. et al., (2009). Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(2) : 086-095.
- [5]. Mohamed I. E. T. et al., (2010). The antibacterial, antiviral activities and phytochemical screening of some Sudanese medicinal plants, *Journal of BioSciences EurAsia*. Vol 4 : 8-16.
- [6]. Di Pasqua R. et al., (2005). In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean *Apiacea*, *Verbenaceae* and *lamiaceae* against foodborne pathogens and spoilage bacteria, *Anal of Microbiology*, 55 (2) : 139-143.
- [7]. Oyedeji O. et al, (2011). Antibacterial, antifungal and phytochemical analysis of crude extracts from the leaves of *Ludwigia abyssinica* A. Rich. and *Ludwigia decurrens* Walter, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7) : 1192-1199.
- [8]. Sartoratto A. et al, (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol 35 : 275-280.
- [9]. Organisation Mondiale de la Santé (2002). Stratégie pour la médecine traditionnelle pour 2002–2005. WHO/EDM/TRM/2002.1, Genève.
- [10]. Kalayou S. et al, (2012). In–vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (7) : 516–522.
- [11]. Soković M. et al., (2007). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic Bacteria, *Food Global Science Books* 1 (1) : x-y.
- [12]. Licina B. Z. et al., (2013). Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L., *Food Control*, Vol 33 : 498-504.

- 
- [13]. Skoric M. et al., (2012). Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines, *Industrial Crops and Products*, Vol 38 : 153– 159.
- [14]. Tomás-Menor L. et al., (2013). Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species, *Food and Chemical Toxicology*, Vol 55 : 313–322.
- [15]. Haluk J. P., (2005). Les arbres à parfums, *Bulletin de l'Académie Lorraine des Sciences*, Vol 44 : 1-4.
- [16]. Güvenc A., et al., (2005). Antimicrobial studies on turkish *cistus* species, *Pharmaceutical biology*. Vol. 43, n°2 : 178-183.
- [17]. Bouamama H. et al., (2006). Antimicrobial activity of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 104 : 104-107.
- [18]. Aziz M. et al., (2006). Relaxant effect of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* on rodent intestinal contractions, *Fitoterapia*, Vol 77 : 425-428.
- [19]. Belmoukhtar M. et al., (2009). Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of aqueous extract of *Cistus ladaniferus*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*; Vol 389 : 145-149.
- [20]. Aafi A., Taleb M. S. et Fechtal M, (2002). Espèces remarquables de la flore du Maroc. Centre National de la Recherche Forestière, p 70.
- [21]. Attaguile G. et al., (2000). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol. Toxicol* 16 (2) : 83-90.
- [22]. Mariotti J. P. et al., (1997). Composition of the essential oil of *Cistus ladaniferus* L. cultivated in Corsica (France). *Flavour-and-Fragrance Journal*, 12 (3) : 147-151.
- [23]. Guinoiseau E., Lorenzi V., Luciani A., Tomi F., Casanova J. et Berti L. (2011). Susceptibility of the multi-drug resistant strain of *Enterobacter aerogenes* EA289 to the terpene alcohols from *Cistus ladaniferus* essential oil. *Nat Prod Commun*, 6 (8) : 1159-62.
- [24]. Rhayour K., (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de Doctorat, Université Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences Dhar Mehraz-Fès.

- 
- [25]. Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D., (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? Mécanismes biochimiques, p 91-96.
- [26]. Ir Greet V., (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base, Symposium « Antioxydants et alimentation » Institut Danone.
- [27]. Favier A., (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, Mécanismes biochimiques, p 108-115.
- [28]. Bidié A. dit Philippe et *al.*, (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales ivoirienne, *Sciences et Nature*, Vol. 8, n°1 : 1-11.
- [29]. Amensour M. et *al.*, (2010). Antioxidant Activity and Chemical Content of Methanol and Ethanol Extracts from Leaves of Rockrose (*Cistus ladaniferus*), *Plant Foods Hum Nutr*, Vol 65 : 170– 178.
- [30]. Konan N'dri S. et *al.*, (2011). Etude Chromatographique et Activité Anti-Oxydante de L'huile Essentielle de *Afraegle Paniculata* (*Rutaceae*), *European Journal of Scientific Research* Vol.63 n°4 : 482-488.
- [31]. Barkat M. et *al.*, (2011). Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*, *Revue de génie industriel*, Vol 6 : 46-54.
- [32]. Barrajon-Catalán E. et *al.*, (2010). *Cistaceae* aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells, *Food and Chemical Toxicology*, Vol 48 : 2273–2282.
- [33]. Konigs R. et Gulz P. G., (1974). The monoterpenes in the essential leaf oil of *Cistus ladaniferus* L, *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 72 (3) : 237-248.
- [34]. Dudonne S. et *al.*, (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays, *J. Agric. Food Chem.* Vol 57 : 1768–1774.
- [35]. Hirano R. et *al.*, (2001). Antioxydant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation, *Journal of nutritional science and vitaminology*, Vol 47, n° 5 : 357-362.
- [36]. Es-Safi N. E., Ghidouche S, et Ducrot P.H. (2007). Flavonoids, hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. *Molecules*, 12 (9) : 2228-2258.

- 
- [37]. Kim H. P., Son K. H., Chang H. W. et Kang S. S., (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 96 (3) : 229-45.
- [38]. Guo W., Wei X., Wu S., Wang L., Peng H., Wang J., et Fang B., (2010). Antagonistic effect of flavonoids on NSC-741909-mediated antitumor activity via scavenging of reactive oxygen species, *Eur J Pharmacol.* 649 (1-3) : 51-8.
- [39]. Szliszka E., Czuba Z. P., Mazur B., Paradysz A. et Krol W., (2010). Chalcones and dihydrochalcones augment TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells. *Molecules.* 15 (8) : 5336-53.
- [40]. Bédard V., (2008). Les propriétés anti-angiogéniques des flavonoïdes. Mémoire de maîtrise en chimie. Université du Québec à Montréal.
- [41]. Kim Y. H , Shin E. K., Kim D. H., Lee H. H., Park J. H., et Kim J. K., (2010). Antiangiogenic effect of licochalcone A. *Biochem Pharmacol*, 80 (8) : 1152-9.
- [42]. Amin A. R. et al., (2010). Enhanced anti-tumor activity by the combination of the natural compounds (-) epigallocatechin-3-gallate and luteolin: potential role of p53. *J Biol Chem*, 285 (45) : 34557-65.
- [43]. Medina J. H. et al., (1997). Overview--flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. *Neurochem Res.* 22 (4) : 419-25.
- [44]. Marsden S. B., (1958). Antioxydant and determination by the use of a stable free radical. *Nature*, Vol 181 : 1199-1200.
- [45]. Molyneux P., (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakar J. *Sci. Technol*, 26 (2) : 211-219.
- [46]. Mac Farland, (2003). Standardisation Method of Turbidity in C. Manual of Clinical laboratory method, page 119.
- [47]. Eloff J. N., (1998). A sensitive and quick method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med*, Vol 64: 711–713.
- [48]. Guinoiseau E., (2010). Molécules antibactériennes issues d’huiles essentielles : séparation, identification et mode d’action. Thèse de Doctorat, Université de Corse-Pasquale Paoli, Faculté des Sciences et Techniques.
- [49]. Friedman et al., (2002). Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteric*, *Journal of Food Protection*, 65 (10) : 1545-1560.

- 
- [50]. Burt S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, *International Journal of food Microbiology*, Vol 94 : 223-253.
- [51]. Amensour M., (2010). Etude de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits des plantes médicinales d'origine marocaine. Application bio-technologique à l'amélioration de la qualité des produits alimentaires. Thèse de Doctorat, Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des Sciences de Tetouan.
- [52]. Lopes-Lutz D. et al., (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils, *Phytochemistry*, 69 (8) : 1732–1738.
- [53]. Maataoui B. S. et al., (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du Figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus indica*), *Lebanese Science Journal*, Vol. 7, n° 1 : 1-8.
- [54]. Akkol E. K. et al., (2012). Anticholinesterase and antioxidant effects of the ethanol extract, ethanol fractions and isolated flavonoids from *Cistus laurifolius* L. leaves, *Food Chemistry*, 131 (2) : 626–631.
- [55]. Dudonné et al., (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem*, 57 (5) : 1768-1774.
- [56]. Alías J. C., Sosa T., Valares C., Escudero J. C. et Chaves N., (2012). Seasonal variation of *Cistus ladanifer* L. diterpenes, *Plants*, Vol 1 : 6-15.
- [57]. Popovici et al., (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, Vol 4 : 25-39.

---

**TROISIEME PARTIE : EXTRACTION ET ELUCIDATION DES  
STRUCTURES CHIMIQUES DE METABOLITES  
SECONDAIRES ISOLEES DES CHAMPIGNONS  
ENDOPHYTIQUES DE PLANTES MAROCAINES**

## INTRODUCTION

Toutes les plantes abritent une flore fongique constituée de champignons non pathogènes dits "endophytes". Bien qu'ils soient invisibles et peu connus, leur fonction écologique apparaît de plus en plus évidente puisqu'ils participeraient activement à une meilleure adaptation des plantes à leur environnement. Ils sont d'ailleurs qualifiés de mutualistes, exerçant un pouvoir protecteur pour les plantes. Une des composantes de ce mutualisme serait la production de molécules bénéfiques à la plante : ces molécules auraient des propriétés antibiotiques contre les agents phytopathogènes, insecticides ou anti-appétantes contre les insectes, neurotoxiques contre les herbivores, ou encore hormonales pour stimuler la croissance de la plante.

Certains endophytes sont très bénéfiques, voire nécessaires à leur plantes-hôtes. Elles améliorent l'accès de la plante aux nutriments et parfois empêchent certains organismes pathogènes de les coloniser, et inversement (dans le cas de relations symbiotiques vraies) grâce à une batterie de molécules utiles ou défensives produites par le métabolite de l'endophyte.

Une large gamme de molécules complexes produits par des endophytes a été découverte et est en cours d'exploration, souvent avec des vertus antibiotiques, et parfois antiparasitaires voire anticancéreuses dans quelques cas quand ils sont utilisés chez les animaux et les humains. Un endophyte notable en termes d'intérêt médicinal a été découvert par le Dr Gary Strobel. C'est *Pestalotiopsis microspora*, un champignon endophyte vivant à l'intérieur de l'If *Taxus wallachiana* de l'Himalaya, qui produit le taxol [1].

*Piriformospora indica* est un champignon endophyte de l'ordre Sebaciales semble pouvoir coloniser les racines et entretenir une relation symbiotique avec n'importe quelle plante terrestre. *Piriformospora indica* s'est aussi montré capable d'augmenter le rendement des récoltes et les défenses de plusieurs variété cultivées (d'orge, tomates, maïs, etc.) contre certains agents pathogènes des racines [2, 3].

Il est spéculé qu'il peut y avoir beaucoup de milliers d'endophytes utiles pour l'humanité, mais comme il y a peu de scientifiques travaillant dans ce champ et comme les forêts et les régions de diversité biologique sont rapidement détruites, beaucoup d'endophytes utiles pour guérir les maladies pourraient être en permanence perdus avant qu'ils soient

découverts. Les champignons endophytes représentent alors un important champ de recherche pour les produits naturels qui ne cessent de renforcer la richesse dans le domaine pharmaceutique.

Le but de cette partie est l'extraction et l'identification des métabolites bioactives d'un extrait issu du champignon endophytique : *Fusarium begoniae* isolé de la plante marocaine *Aristolochia paucinervis* (connue au Maroc sous le nom vernaculaire *Bereztem*).

La culture de champignon a été réalisée dans le riz solide, l'extraction des métabolites secondaires a été faite par des solvants organiques, et nous avons fait des fractionnements et des purifications en utilisant plusieurs techniques chromatographiques.

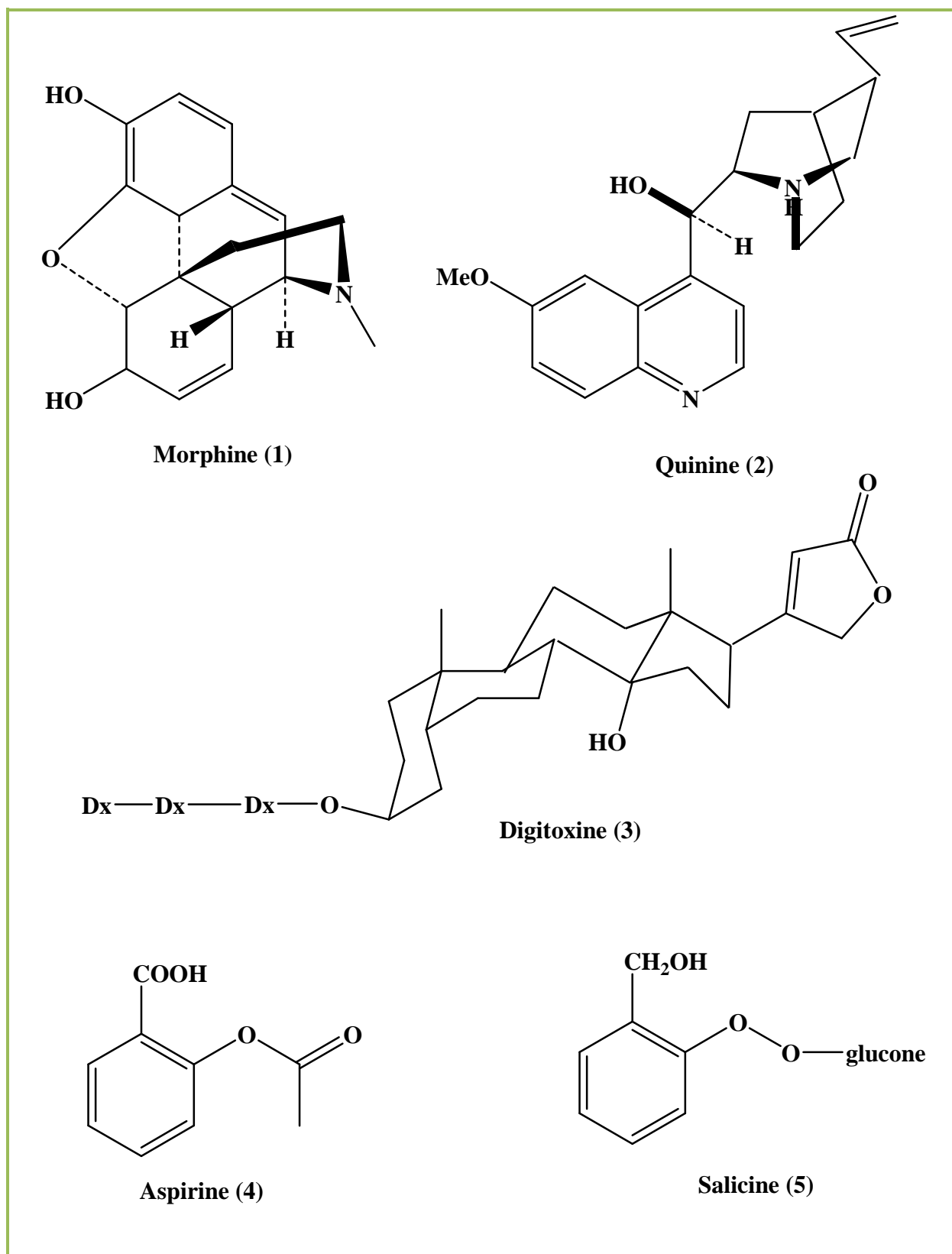
Les fractions et les composés purs ont été analysés par chromatographie et par spectrométrie de masse. Les structures ont été élucidées en utilisant les différentes techniques de la RMN (1D et 2D).

## **I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

L'utilisation médicinale des produits naturels date depuis plusieurs millénaires de l'histoire humaine. En effet, les produits naturels ont été une partie intégrante, dans une forme ou une autre, de plusieurs systèmes thérapeutiques indigènes comme le cas de la médecine traditionnelle chinoise [4]. Dans cette médecine traditionnelle, les plantes naturelles étaient et sont toujours utilisées d'après des expériences empiriques plutôt que d'après des connaissances pharmacologiques.

Avec le développement scientifique actuel le besoin de comprendre le mode d'action des différents remèdes, un grand nombre des composés actifs produits naturellement ou à travers la chimie de synthèse ont été présentés à la médecine.

Beaucoup de drogues utilisées aujourd'hui sont d'origine naturelle comme l'analgésique : la morphine (1) (extraite de *Somniferum papaver*) [5], l'antipyrétique et l'antimalarial : la quinine (2) (extraite de *Cinchona pubescens*) [6] et le glycoside cardiaque : le digitoxin (3) (extraite de *Purpurea* des digitalines) [7]. D'autres médicaments sont dérivés des produits naturels tel que la fameuse aspirine (4) ainsi que sa structure de base la salicine (5) isolée de l'arbre du saule qu'on utilise à des fins curatives, ainsi que pour réduire les douleurs et les effets secondaires [8].



**Figure 26 :** Structures chimiques de quelques produits médicinaux d'origine naturelle

Dans le but de développement du rôle principal des nouveaux composés dans le domaine cosmétique et agrochimique, les chercheurs peuvent encore trouver des produits naturels prometteurs avec des structures uniques et activités biologiques remarquables. En dépit des nouvelles méthodes telle que la modélisation moléculaire et les différentes techniques de la chimie combinatoire, plus que 60% des drogues récemment approuvées dans les années 1981-2006 étaient d'origine naturelle ou dérivées des composés naturels [9], surtout dans le domaine des drogues antibactériennes, les produits naturels jouent donc un rôle essentiel à cause de grands nombres de composés avec ce genre d'activités.

La plupart, si ce n'est pas toutes les plantes étudiées dans les écosystèmes naturels sont infestées par des champignons microscopiques sans pour autant qu'elles ne développent de symptômes pathogènes. Ces microorganismes (champignons endophytes) colonisent les espaces inter et intracellulaires des tissus des végétaux vivants. Plusieurs d'espèces de ces microorganismes peuvent être isolées à partir d'une seule plante, mais très peu seraient spécifiques de la plante hôte [10]. Les champignons endophytes confèrent dans leur association symbiotique à la plante hôte une amélioration de son état de santé en synthétisant certains métabolites fonctionnels et en retour bénéficient de la protection et des nutriments de la plante [11].

Les facteurs métaboliques interviennent dans le contrôle du mutualisme plante-champignon, étant structurellement très variés, montrent des activités biologiques de type antibiotiques, antioxydantes, immunosuppressives. Les champignons endophytiques sont une excellente source pour des produits naturels bioactifs qui peuvent être utiles pour satisfaire le besoin de médicaments dans l'industrie médicale [12].

Les champignons endophytes sont des champignons microscopiques qui vivent dans les feuilles, les rameaux, les troncs et les racines des arbres sans qu'on puisse en soupçonner la présence. Ils sont encore mal connus puisque, en général, ils ne causent aucun problème à leur hôte. Ils représentent toutefois un important réservoir de biodiversité dans les écosystèmes forestiers [13]. De tels effets très spécifiques revêtent à la fois un grand intérêt écologique et une grande importance économique.

Les champignons synthétisent une large variété de métabolites secondaires, beaucoup de ces substances exposent des propriétés bioactives et qui ont été adoptées par conséquent par les êtres humains pour usage médicale tels que les antibiotiques, les agents d'abaissement

de cholestérol, ainsi que les inhibiteurs des tumeurs. Cependant, les champignons endophytiques isolés de la plante marocaine *Mentha pulegium* ont présenté un intérêt important vu l'importance des molécules qui ont été identifiées, ainsi que le rôle socioéconomique de la plante [14].

## II. MATERIELS ET METHODES

### II. 1. Matériels

#### II. 1.1. Matériel biologique

Nous avons travaillé sur le champignon *Fusarium begoneae* qui a été isolé de la plante marocaine *Aristolochia paucinervis*.

#### II. 1.2. Les solvants

Les solvants que nous avons utilisés pour la réalisation de ce travail sont : l'acétone, l'acétonitrile, le dichlorométhane, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le n-hexane, le n-butanol et le méthanol, ils ont été distillés avant utilisation. Ces mêmes solvants à un état ultra pur ont servi pour les mesures spectroscopiques.

Les solvants utilisés pour la HPLC et pour la LC/MS sont :

- L'acétonitrile : Li-Chro Solv HPLC grade, Merck
- Le méthanol : Li-Chro Solv HPLC grade, Merck
- L'eau NANOpure

Les solvants utilisés pour la RMN sont :

- DMSO-d<sub>6</sub> : Euriso-top
- CD<sub>3</sub>OD : Euriso-top
- CDCl<sub>3</sub> : Euriso-top
- CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> : Euriso-top

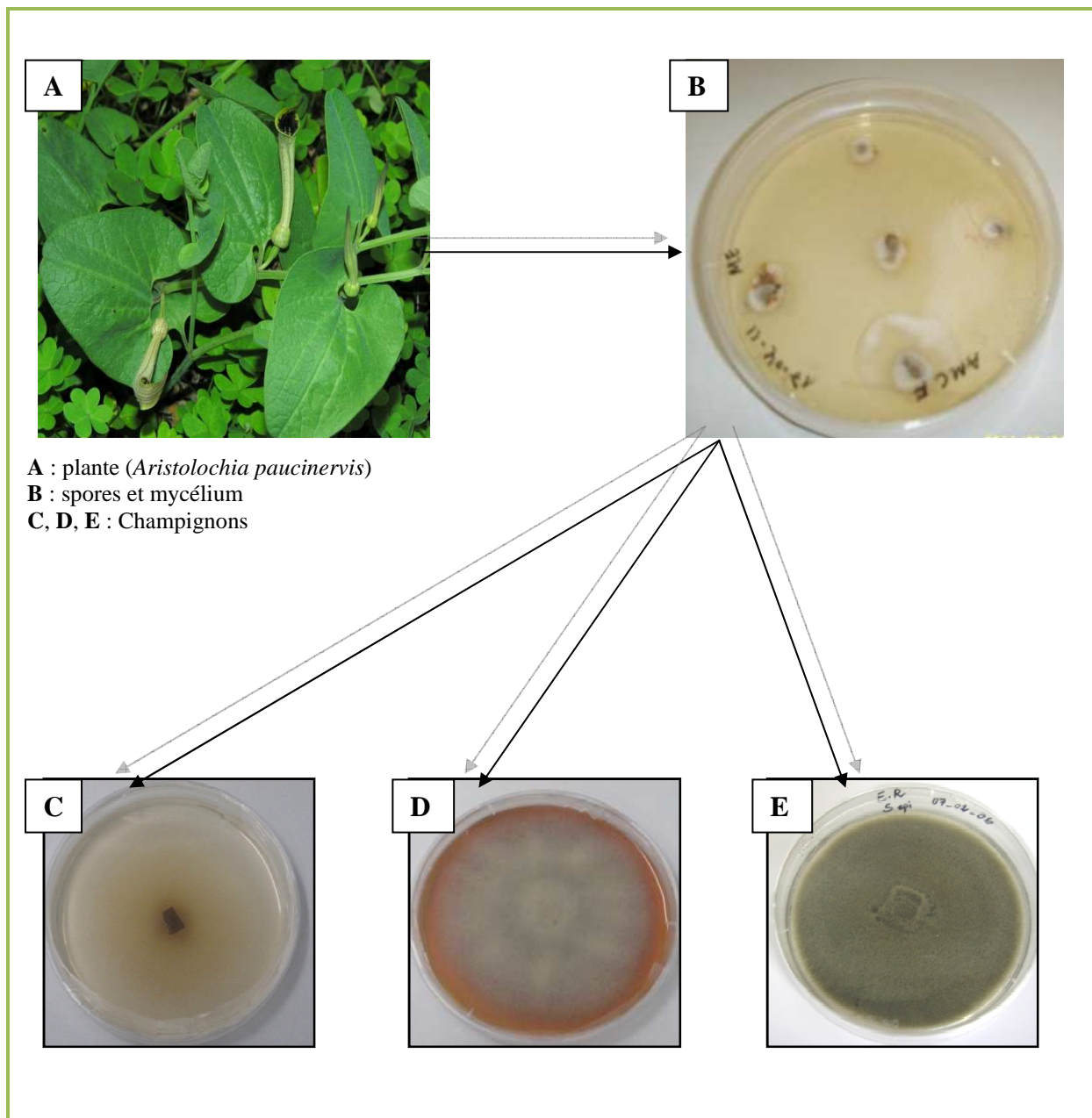
### II. 2. Méthodes

#### II. 2.1. Développement du champignon

Les différents organes d'*Aristolochia paucinervis* ont été coupés, lavés à l'eau stérilisés et puis désinfectés à l'aide de l'éthanol.

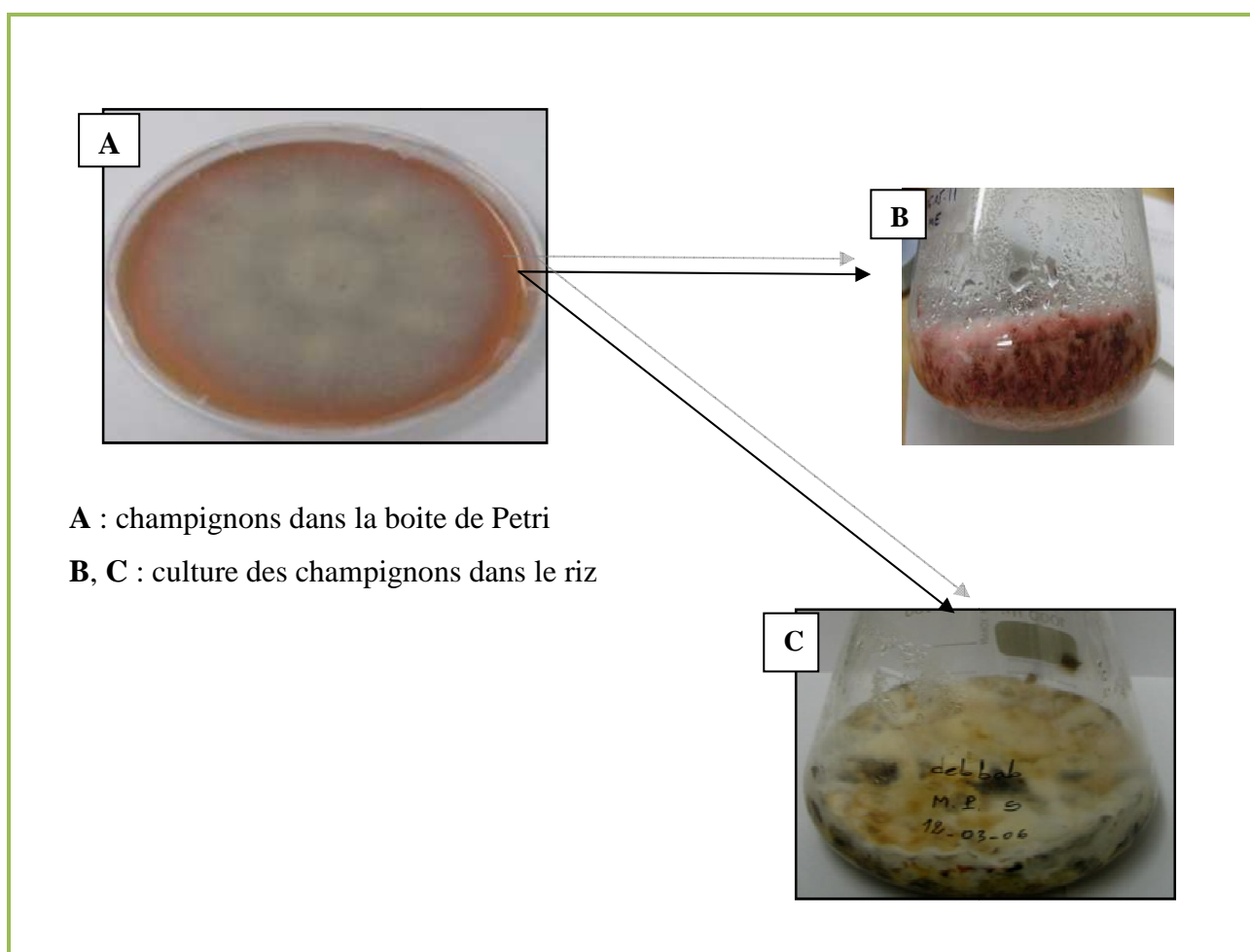
Nous avons récupéré les tissus intérieurs (tige, feuille, racine), et sous conditions stériles, nous les avons découpés et placés dans des boîtes de pétri qui contiennent au préalable un antibiotique pour empêcher la croissance bactérienne, des spores et mycéliums

des champignons ont été observés après un mois d'incubation à température ambiante. Ensuite nous avons transféré des spores et mycéliums des champignons développés dans des boîtes de Petri fraîches jusqu'à obtention des champignons purs.



**Figure 27** : Isolement et purification des champignons

Nous avons placé des parties du milieu de culture contenant des mycéliums dans le riz se trouvant dans des erlenmeyers stérilisés pendant 40 jours d'incubation à température ambiante, le champignon se développe et couvre tout le riz.



**Figure 28** : Développement du champignon dans le riz

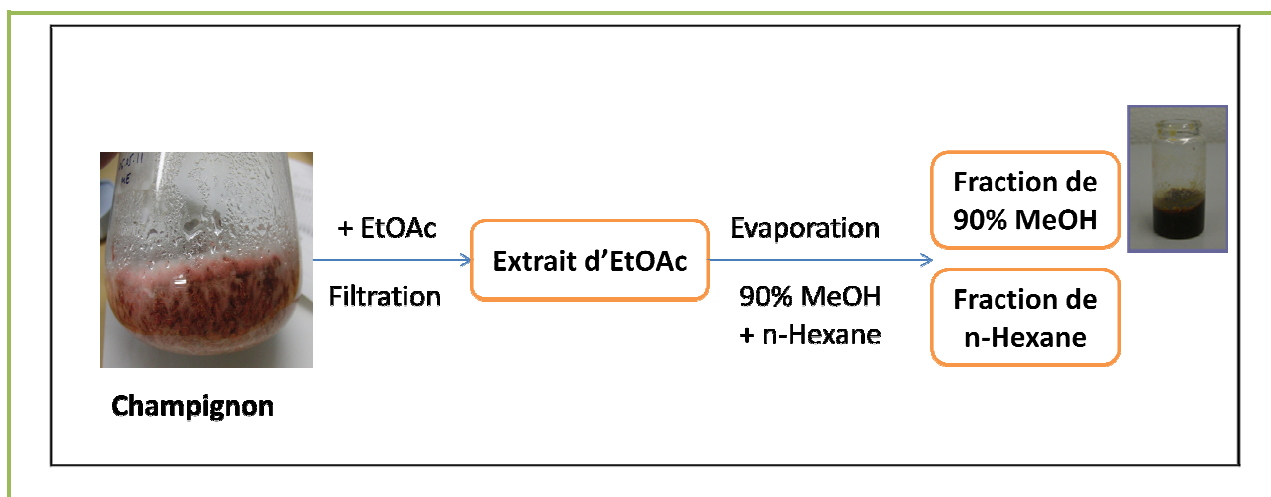
## **II. 2.2. Extraction liquide-liquide**

L'extraction liquide-liquide s'utilise généralement pour la séparation d'un mélange de composés organiques, elle est basée sur la séparation des composés dans deux solvants non miscibles et à polarité différente.

Les solvants utilisés ne doivent pas réagir avec les composés à séparer et doivent être facile à évaporer à la fin de la séparation.

Nous avons utilisé l'acétate d'éthyle à trois répétitions pour extraire la majorité des métabolites secondaires produits par les champignons endophytiques.

Après évaporation de l'acétate d'éthyle, nous avons lavé l'extrait par une fraction de (MeOH : n-Hexane / 90% : 10%) pour éliminer les acides gras et les composés non polaires (qui sont non désirés).

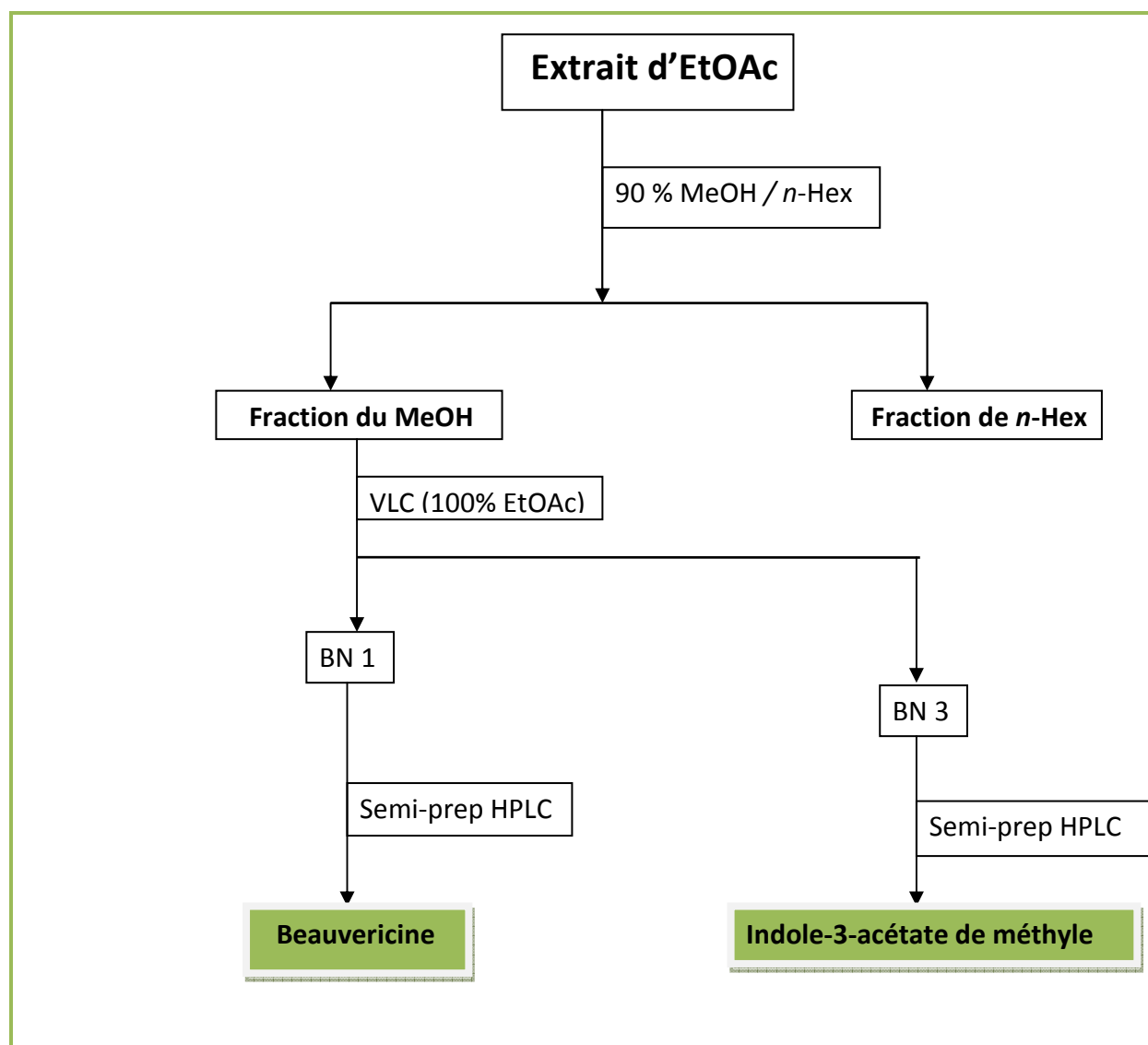


**Figure 29** : Extraction des métabolites secondaires

### II. 2.3. Isolement et purification des métabolites secondaires

A partir de l'extrait de l'AcOEt du champignon endophytique *Fusarium begoniae*, nous avons pu extraire cinq produits, il s'agit de : Beauvericine, Z-fusapyrone, Indole-3-acétate de méthyle, Indole 3-acide carboxylique et Acide de 1, 2-hydroxy-13-(hydroxyméthyle)-3, 5, 7-triméthyle-2, 4-tétradecadiène-1, 14-dioïque.

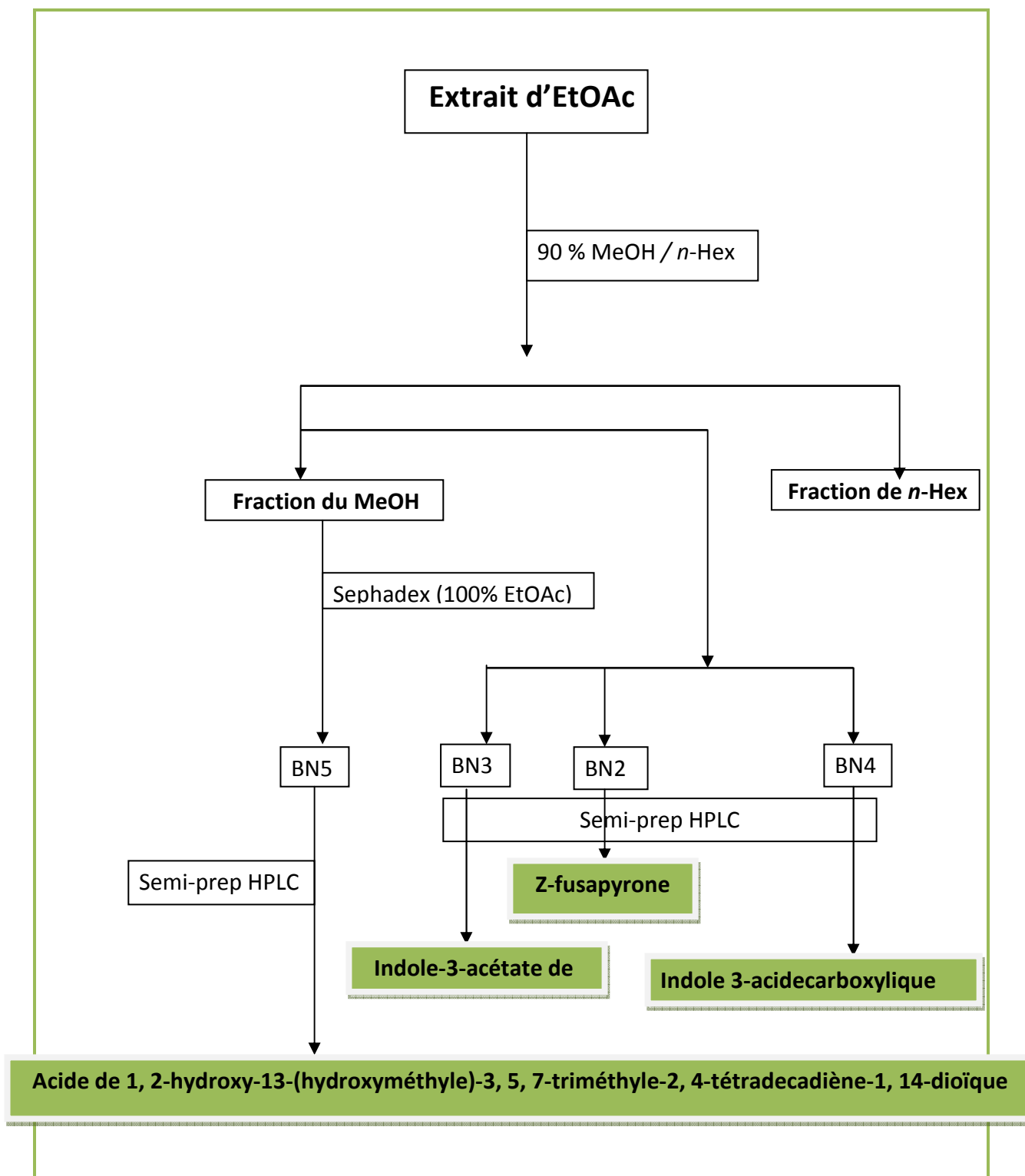
L'isolement des métabolites secondaires de *Fusarium begoniae* est fait selon le schéma suivant :



**Figure 30** : Protocoles d'isolement des métabolites secondaires BN1 et BN3

BN1 : Beauvericine avec des impuretés

BN3 : Indole-3-acétate de méthyle avec des impuretés



**Figure 31** : Protocoles d'isolement des métabolites secondaires BN2, BN4 et BN5

BN2 : Z-fusapyrone avec des impuretés

BN4 : Indole 3-acide carboxylique avec des impuretés

BN5 : Acide de 1, 2-hydroxy-13-(hydroxyméthyle)-3, 5, 7-triméthyle-2, 4-tétradecadiène-1, 14-dioïque

## **II. 2.4. Les méthodes chromatographiques de séparation**

Dans la chromatographie, les composés chimiques d'un mélange sont élués par une phase mobile à travers une phase stationnaire. Le mélange est premièrement placé dans la phase stationnaire et la phase mobile permet la migration des composés dans le système. La séparation d'un extrait est basée sur l'interaction sélective comme par exemple la surface d'adsorption et la solubilité des composés avec les deux phases.

### **II. 2.4.1. La Chromatographie sur couche mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant migre à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse au dessous de front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

Nous avons utilisé dans nos expériences une plaque avec du gel de silice F<sub>254</sub> (Layer thickness 0.2 mm, E. Merck, Darmstadt, Allemagne), la phase mobile a été choisie comme suit :

\*pour les produits polaires nous avons utilisé la plaque RP-18 F<sub>254</sub> (Layer thickness 0.2 mm, E. Merck, Darmstadt, Allemagne), la phase mobile est constitué de MeOH : H<sub>2</sub>O (90 :10, 80 :20, 70 :30 et 60 :40).

\*pour les produits semi-polaires et non polaires nous avons utilisé une plaque avec le gel de silice 60 F<sub>254</sub> (Layer thickness 0.2 mm, E. Merck, Darmstadt, Allemagne) avec la phase mobile :

-Pour les produits semi-polaires : DCM : MeOH (95 :5, 90 :10, 85 :15, 80 :20 et 70 :30) et DCM : MeOH : EtOAc (90 :10 :5 et 80 :20 :10).

-Pour les produits non polaires : n-Hexane : AcOEt (90 :10, 85 :15, 80 :20 et 70 :30) et n-Hexane : MeOH (95 :5 et 90 :10).

Les bandes de séparations sur la couche mince ont été révélées par adsorption de la lumière UV à 250 et 366 nm, celle-ci est ensuite pulvérisée par le réactif anisaldehyde/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et posée sur une plaque chauffante (à 100°C) pour quelques minutes.

On utilise la CCM pour bien choisir le solvant dit système qui va être la phase mobile pour la séparation sur colonne.

#### II. 2.4.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

La chromatographie liquide sous vide est une technique utilisée pour obtenir un fractionnement grossier rapide des extraits bruts. On utilise une colonne de verre dans laquelle on place 5 à 10cm de gel de silice 60.

L'extrait brut est mélangé avec une petite quantité de gel de silice en utilisant un solvant volatil, le tout est ensuite déposé en haut de silice existante dans la colonne. On commence la séparation par un solvant non polaire (Hexane ou DCM), et on augmente la polarité par la suite avec des solvants polaires (AcOEt ou le MeOH). Le débit est réglé à l'aide d'une pompe et les différentes fractions sont collectées dans des ballons (de 500 ml).

#### II. 2.4.3. Chromatographie sur colonne

Les différentes fractions obtenues par la VLC sont ensuite séparées par la chromatographie sur colonne en utilisant les différentes phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés déterminés par CCM. Les différents systèmes de séparation utilisés sont :

– La chromatographie à phase normale utilise la phase stationnaire polaire, typiquement le gel de silice combiné avec une phase mobile non polaire (n-Hexane, DCM). Les substances hydrophobes s'éluent plus vite que les substances hydrophiles.

– La chromatographie à phase renversée (PR) utilise une phase stationnaire non polaire et une phase mobile polaire (H<sub>2</sub>O, MeOH). La phase stationnaire est constituée par la silice avec une chaîne n-alkylique. Dans notre cas, nous avons utilisé le C-8 et C-18 comme ligands avec la matrice. Dans ce cas les composés hydrophiles s'éluent plus vite que les composés hydrophobes.

– La chromatographie d'exclusion: Le gel de Sephadex permet la séparation des substances en fonction du poids moléculaire. La phase stationnaire (Sephadex LH20) est constituée par une poudre dont les particules sont sous forme de sphères poreuses, les composés à petit poids moléculaire sont captés par les sphères poreuses alors que les grands composés seront exclus et sortent les premiers. Généralement le solvant utilisé est le méthanol, parfois on utilise 100 % méthanol ou bien un mélange MeOH : DCM (1 : 1).

– la chromatographie utilisant des résines échangeuses d'ions (HP20) qui agissent comme un moyen de séparation solide, les composants de l'échantillon sont retenus par les différentes résines en raison de leurs affinités électriques différentes. Par conséquent, ces composés peuvent être récupérés séparément à la sortie, l'élution a été réalisé en utilisant H<sub>2</sub>O et des quantités croissantes de MeOH et de l'Acétone.

Cette technique est largement utilisée dans une variété d'applications industrielles et pharmaceutiques, dans le dessalage et la décoloration des produits naturels, d'antibiotiques et de petites protéines. La masse de silice correspond approximativement à 30 fois plus du poids de l'extrait à séparer.

## **II. 2.4.4. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)**

### **II. 2.4.4.1. HPLC préparative**

L'HPLC préparative est utilisée pour l'isolement et la purification des fractions préalablement séparées par la colonne de séparation chromatographique. La phase mobile est une combinaison du MeOH (ou l'Acétonitrile) et de H<sub>2</sub>O NANOpur avec ou sans TFA (0.01%), ou bien elle est faite d'une manière isochratique, cela dépend du temps de rétention du composé.

Chaque injection est composée de 20 à 80 mg de la fraction dissoute dans 400 ml de système de solvant choisi, ce dernier est pompé à travers la colonne à un débit de 20 ml/min.

On peut décrire le système de la HPLC préparative comme suit :

- Pompe : Varian, PrepStar 218
- Détecteur : Varian, ProStar 320 UV-Vis detector
- Programme : Varian Star (V.6)
- Colonne : Varian Dynamax (250x4.6 mm ID et 250x21.4 mm, ID), pre-packed avec Microsorb 60-8 C 18, et avec integrated pre-column

#### **II. 2.4.4.2. HPLC semi-préparative**

Ce processus a été utilisé pour la purification des composés à partir des fractions déjà séparés par chromatographie sur colonne. Avant l'exécution de la séparation, des systèmes de solvants appropriés doivent être déterminés selon des combinaisons de MeOH et H<sub>2</sub>O NANOpur avec ou sans TFA (0.01%) ou bien avec ou sans l'acide formique (0.1%), le système est pompé d'une manière isochratique en fonction du temps de rétention du composé.

Chaque injection est composée de 3 mg de la fraction à analyser dissoute dans 1 ml du système du solvant, ce dernier est pompé à travers la colonne à un débit de 5 ml/min.

La détection des pics se fait à l'aide d'un détecteur UV et les composés purs sont collectés séparément dans des tubes.

L'HPLC semi- préparative est équipée de :

- Pompe : Merck Hitachi L-7100
- Détecteur : Merck Hitachi UV detector L-7400
- Colonne: Knauer (300x8 mm, ID), pre-packed with Eurosphere 100-10 C 18, with integrated pre-column

#### **II. 2.4.4.3. HPLC analytique (Dionex)**

La HPLC analytique a été utilisée pour identifier la répartition des pics à partir des extraits ou des fractions, elle nous permet aussi d'évaluer la pureté des composés isolés. Le gradient des solvants utilisés commence par MeOH : H<sub>2</sub>O NANOpur (10 : 90) ajusté à pH=2 par l'acide phosphorique, et atteint 100% de MeOH dans 35 min.

L'utilisation de l'acide phosphorique permet d'avoir une bonne séparation des pics qui sont larges (sharp peaks) détectables facilement à l'UV. Cependant, il y a certains inconvénients; dans le cas des composés ayant beaucoup d'atomes d'azotes (Purines et dérivés, Nucléotides...), la présence de l'acide rend les composé azotés très polaires (affinité d'accepter les protons) et la séparation se fait à une grande vitesse qui ne permet pas de les détecter.

La HPLC analytique est équipée de :

- Pompe : Dionex P580ALPG
- Détecteur : Dionex Photodiode Array Detector UV 340S
- Thermostat de la colonne : STH 585
- Autosamplar (passeur d'échantillon) : ASI-100T
- Programme : Chromeleon (V 6.3)
- Colonne : Knauer (125x4 mm, ID), pre-packed avec Eurosphere 100-5 C 18m avec integration pre-column.

## **II. 2.5. Détermination de la masse moléculaire**

### **II. 2.5.1. Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse permet l'identification des composés en se basant sur la différence du rapport masse/charge ( $m/z$ ) des molécules ionisées pour les séparer les uns des autres. La spectroscopie de masse donne des informations chimiques et structurales des molécules. Elle est équipée d'une source, d'un analyseur et d'un détecteur.

#### **II. 2.5.1.1. Spectrométrie de masse en mode d'ionisation par électrospray (ESI/MS)**

Le spectromètre de masse est un instrument d'analyse utilisé pour déterminer le poids moléculaire d'un composé. Fondamentalement, les trois parties du spectromètre de masse (source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur), devraient être maintenues dans des conditions de vide afin de maintenir le déplacement des ions à travers l'instrument sans aucune entrave de molécules d'air. Une fois que l'échantillon a été injecté dans la source d'ionisation, les molécules sont ionisées. Les ions sont ensuite transmis et extraits dans l'analyseur. Dans l'analyseur, les ions sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Une fois

le flux séparé des ions dans le détecteur, les signaux sont transmis au système de données, où le spectre de masse est enregistré.

### **II. 2.5.1.2. Chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse (LC/ESI-MS)**

La LC/ESI-MS est une méthode puissante pour la séparation de mélanges complexes, surtout quand beaucoup de composants peuvent avoir des polarités semblables.

La LC/ESI-MS se fait en utilisant la spectroscopie de masse Finnigan QDECA-7000 connectée à un détecteur UV. L'échantillon est dissout dans le MeOH-H<sub>2</sub>O et injecté dans la HPLC/ESI-MS. La phase stationnaire est une colonne HPLC à phase renversée constituée d'Eurospher C-18. Les spectres de masse de différents composés de l'échantillon sont générés en mode positif et en mode négatif, et les différentes fragmentations des composés ont été automatiquement enregistrées par l'appareil.

L'ionization électrospray (ESI) est une technique basée sur l'ionisation par la pression atmosphérique (API) et elle est très adoptée pour analyser les molécules polaires dont le poids moléculaire peut être moins de 100 Da et plus que 1000 Da.

La LC/ESI-MS est constituée de :

- Système HPLC : Agilent 1100 series (pump, detector and auto-sampler) Finnigan LC Q-DECA
- Colonne : Knauer (250 × 2mm, ID), pre-packed avec Eurosphere100-5, C 18, avec integration pre-column.

La phase mobile (les solvants):

- Acétonitrile ou méthanol Li-Chro solv HPLC (Merck),
- Acide ortho-phosphorique 0.15 %, pH 2.0 (Merck);
- Eau NANOpure (Barnstead).

### **II. 2.5.1.3. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)**

Le MALDI est une méthode d'ionisation introduite permettant l'analyse des molécules de hautes masses moléculaires (peptides, protéines, oligonucléotides..). La technique MALDI

utilise un faisceau laser pulsé dans l'UV (337nm) ou l'IR afin d'ioniser un mélange de matrice/échantillon.

L'utilisation de MALDI est adéquate pour les composés qui peuvent être vaporisés sans se décomposer, tant que le laser est absorbé directement vers le composé, les bandes moléculaires peuvent être cassées à cause de l'augmentation de l'énergie interne.

#### **II. 2.5.1.4. Spectrométrie de masse par la technique de bombardement d'atome rapide (FAB/SM)**

C'est une technique avec laquelle on peut analyser des molécules polaires de haut poids moléculaire (peptides, protéines, nucléosides, saccharides, antibiotiques, sels d'acides minéraux) et faire des déterminations de structure, l'échantillon est déposé en mélange avec une matrice liquide relativement non volatile sur le méplat métallique d'une canne d'introduction dans la source, la matrice est ensuite bombardée par un faisceau d'ions lourds tels que l'argon ou le xénon et on obtient des spectres d'ions positifs et négatifs. La FAB/MS basse résolution a été mesurée sur un spectromètre de masse Finnigan MAT 8430.

#### **II. 2.6. Elucidation des structures**

Après la détermination du poids moléculaire des composés purs, ils subissent des analyses de la résonance magnétique nucléaire (RMN) afin de déterminer leurs structures.

##### **II.2.6.1. Résonance magnétique nucléaire RMN**

La RMN est une technique basée sur les propriétés magnétiques de résonance du noyau de l'atome pour obtenir des informations sur la structure d'une molécule.

Avant d'effectuer l'analyse, l'échantillon doit être séché dans un lyophilisateur pendant au moins 24 h, ensuite il doit être dissout dans un solvant adéquat (solvant spécial pour la RMN) et dégazer pendant quelques minutes dans l'ultrason.

Généralement le choix des solvants deutériés dépend de la solubilité du composé. Pour la calibration des spectres, des pics de solvants sont pris en considération: CD<sub>3</sub>OD (à 3.3 ppm en <sup>1</sup>H, et 49.0 ppm en <sup>13</sup>C), CDCl<sub>3</sub> (à 7.26 ppm en <sup>1</sup>H, et 77.0 ppm en <sup>13</sup>C), DMSO-d<sub>6</sub> (à 2.49 ppm en <sup>1</sup>H et 39.5 ppm en <sup>13</sup>C). Le déplacement chimique ( $\delta$ ) est donné par ppm par rapport à une référence interne le TMS, et les constantes de couplage ( $J$ ) sont données par Hz.

L'instrument utilisé pour les mesures de la RMN était de type Bruker DRX-500. Certaines mesures ont été effectuées sur un appareil de type Bruker AM-300, ARX-400 et DMX-600.

## **II. 2.6.1.1. RMN à une dimension (1D)**

### ***II. 2.6.1.1.1. La RMN du proton $^1\text{H}$***

La RMN du proton est une analyse fondamentale pour l'élucidation de la structure. Une fois l'échantillon est identifié comme un composé pur, on l'envoie pour une analyse de RMN $^1\text{H}$ , les spectres obtenus pourraient décider si d'autres analyses de RMN sont nécessaire. Parfois, un spectre de RMN $^1\text{H}$  suffit à révéler la structure, en particulier pour les composés connus.

Un spectre de RMN $^1\text{H}$  donne les informations suivantes:

- le nombre d'atomes d'hydrogène, qui sont indiqués par l'intégration des pics,
- le type des atomes d'hydrogène (en rapport avec les groupes fonctionnels), qui est indiquée par les déplacements chimiques,
- le type de corrélation entre un atome d'hydrogène et l'autre, ce qui est indiqué par la constante de couplage ( $J$ ).

### ***II. 2.6.1.1.2. La RMN du carbone $^{13}\text{C}$***

La mesure de la RMN $^{13}\text{C}$  a besoin de plus de quantité d'échantillon car l'abondance isotopique de  $^{13}\text{C}$  et  $^{12}\text{C}$  dans la nature, est inférieure à celle de  $^1\text{H}$  et  $^2\text{H}$ .

Le spectre de RMN $^{13}\text{C}$  donne les informations suivantes:

- le nombre d'atomes de carbone,
- le type d'atomes de carbone (par rapport aux groupes fonctionnels), qui est indiqué par les déplacements chimiques.

Dans les spectres RMN du  $^{13}\text{C}$ , l'intégration des pics ne représente pas directement le nombre exact d'atomes de carbone (multiplicité).

### ***II. 2.6.1.1.3. La technique NOE (Nuclear Overhauser Effect)***

C'est une technique qui confirme si un proton est voisin d'un proton. En appliquant une excitation sur l'un des protons, l'intensité du proton voisin augmente.

***II. 2.6.1.1.4. La technique DEPT (Distortionales Enhancement by Polarisation Transfer)***

La DEPT est utilisée pour améliorer la sensibilité de l'expérience de RMN du  $^{13}\text{C}$ . Le processus commence par l'excitation des protons suivie par le transfert de la magnétisation des atomes de carbone.

Cette technique nous donne les informations à propos du nombre des carbones primaires, secondaires et tertiaires et par simple comparaison avec le spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  on peut connaître le nombre de carbones quaternaires existant.

**II. 2.6.1.2. RMN à deux dimensions (2D)**

La RMN bidimensionnelle fournit plus d'informations sur la structure des molécules, elle est appliquée particulièrement dans le cas où l'explication des structures est compliquée par la RMN 1D.

Dans la RMN 1D, le signal s'enregistre comme étant une fonction d'une seule variable dans le temps alors que pour la RMN 2D, il est enregistré comme une fonction de deux variables dans le temps.

***II. 2.6.1.2.1. La technique  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Correlation Spectroscopy)***

La technique de COSY (correlation spectroscopy) repose sur le couplage qui se fait entre les protons dans une molécule. Sur le spectre, le déplacement du proton se reporte sur deux axes ce qui entraîne un diagramme hermitien ; un spectre COSY donne des informations sur la connectivité H-H, les signaux dits d'intersection indiquent les noyaux qui se sont couplés entre eux, l'information la plus importante qui nous donne cette technique est la relation de voisinage des noyaux.

***II. 2.6.1.2.2. La technique HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)***

L'expérience HMQC permet d'obtenir en un temps d'expérimentation court avec des concentrations faibles la carte de corrélation entre proton(s) et noyau ( $^{13}\text{C}$ ) chimiquement liés (via les couplages  $^1J$  entre protons et noyau ( $^{13}\text{C}$ )). Elle s'avère très utile pour identifier sans ambiguïté les différentes résonances des spectres protoniques et le  $^{13}\text{C}$ .

***II. 2.6.1.2.3. La technique HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)***

La HMBC corrèle les carbones avec les protons qui sont liés avec deux ou trois bandes, elle est nécessaire pour détecter le couplage de longues distances, parfois on obtient la corrélation à quatre bandes sous forme de **W**. C'est une très bonne technique pour la détection des carbones quaternaires que l'on ne peut pas détecter par les autres méthodes de la RMN 2D, elle donne des indications essentielles sur le squelette de la molécule.

***II. 2.6.1.2.4. La technique ROESY (Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy) et la technique NOESY (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy)***

Ces deux techniques sont utilisées pour élucider la structure tridimensionnelle. Elles se basent sur les relations entre les protons dans l'espace, ça n'a rien avoir avec le nombre de bandes, par exemple deux protons en position Trans n'ont pas de corrélation. Seulement les protons dont la distance dans l'espace est entre 4 et 5 °A ont la chance de se changer et alors de se corrélent. Dans cette étude, nous avons utilisé seulement la REOSY.

**II. 2.7. Activité biologique : Cytotoxicité**

Les essais de cytotoxicité sont utilisés pour identifier la toxicité d'un composé sur la lignée des cellules de lymphome animal L-5178-Y en inhibant la prolifération des cellules. Nous avons recouru à la lignée cellulaires d'une souris, nous avons utilisé pour l'essai le test de microculture de MTT: le bromure de [3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium] selon un protocole décrit antérieurement [15], une lignée cellulaire d'une souris a été utilisé et l'expérience a été répété trois fois, un négatif control avec 0.1% d'éthanol a été inclut pour toutes les expériences qui ont été réalisés à l'Institut de Physiologie, Chimie et Patho-biochimie, Université de Mainz, Allemagne.

### III. RESULTATS

#### III. 1. Identification du champignon

Les critères morphologiques du champignon *Fusarium begoniae* ont été identifiés en utilisant le microscope électronique. Cette technique a été performée à l'Institut Royal Hollandais Académique des Arts et des Sciences (CBS), Utrecht, Hollande et déposé sous la référence *det 165-2006*.

* <i>Phylume</i>	<i>Ascomycota</i>
* <i>Subphylume</i>	<i>Ascomycetes</i>
* <i>Classe</i>	<i>Sordariomycetidae</i>
* <i>Ordre</i>	<i>Hypocreales</i>
* <i>Famille</i>	<i>Nectriaceae</i>
* <i>Genre</i>	<i>Fusarium</i>
* <i>Espèce</i>	<i>Fusarium begoniae</i>

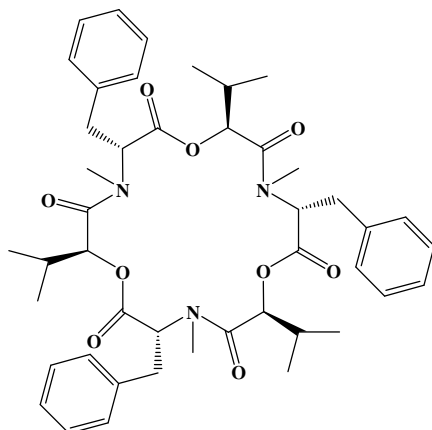
#### III. 2. Les composés isolés du champignon *Fusarium begoniae*

Le chromatogramme issu de l'HPLC de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Fusarium begoniae* a montré l'existence de nombreux composés chimiques, nous avons pu isoler cinq produits, à savoir : le Beauvericine (BN1), le Z-Fusapyrone (BN2), l'Indole-3-acétate de méthyle (BN3), l'Indole 3-acide carboxylique (BN4) et l'Acide de 1, 2-hydroxy-13-(hydroxyméthyle)-3, 5, 7-triméthyle-2, 4-tétradecadiène-1, 14-dioïque (BN5).

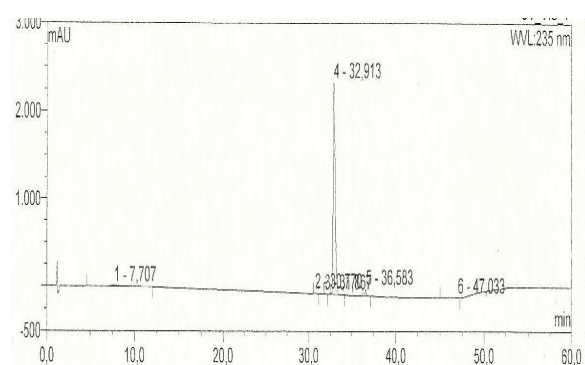
**III. 2.1. Le Beauvericine (BN1)**

<b>Source biologique</b>	<i>Fusarium begoniae</i>
<b>Quantité isolée</b>	21.2 mg
<b>Description physique</b>	Poudre blanche
<b>Formule Moléculaire</b>	C <sub>45</sub> H <sub>57</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>
<b>Poids moléculaire</b>	783 g/mol
<b>Temps de rétention HPLC</b>	32.91 min

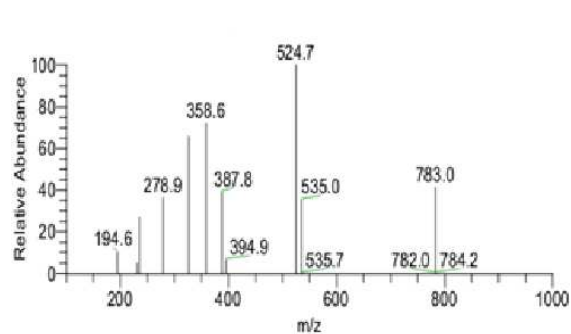
Structure



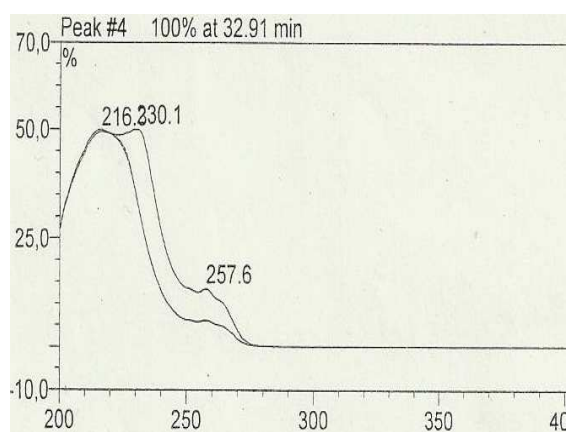
Spectre HPLC



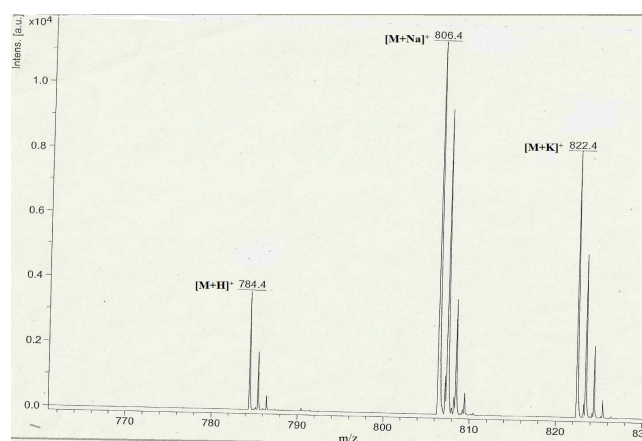
ESI-MS



Spectre UV



Spectre MALDI



Ce composé a été isolé sous forme de poudre blanche. La spectrométrie de masse en mode d'ESI montre un pic moléculaire à 783 m/z, le poids moléculaire est confirmé par la technique MALDI qui montre un pic très intense 806.4 [M+Na]<sup>+</sup>, ainsi que d'autres pics à 784.4 m/z [M+H]<sup>+</sup> et à 822.4 [M+K]<sup>+</sup>, ceci suggère la formule moléculaire C<sub>45</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>.

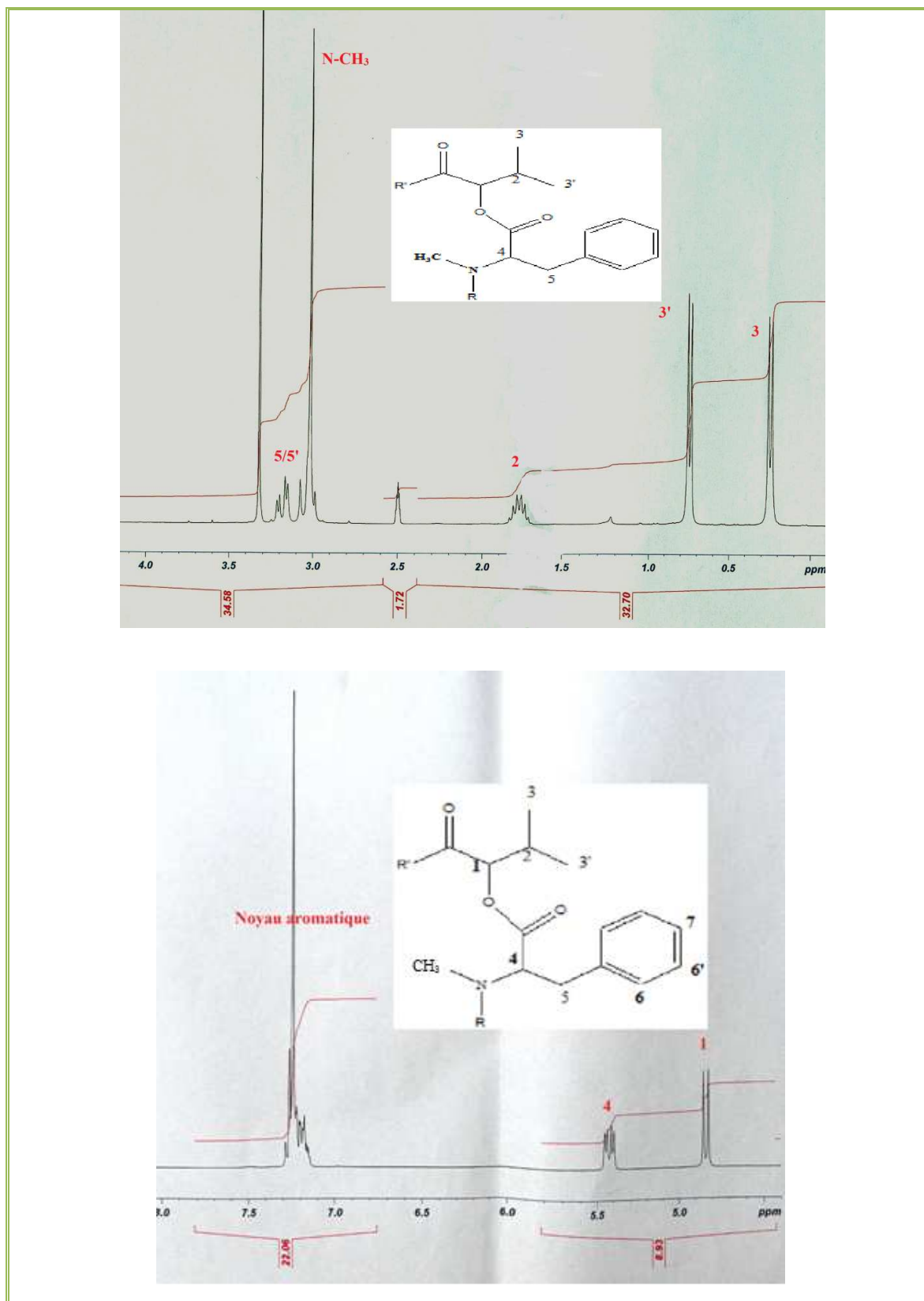
Le spectre RMN<sup>13</sup>C présente 15 pics ce qui montre que dans la structure on a une subunité qui se répète trois fois, le spectre RMN<sup>1</sup>H montre trois pics intégrés de trois protons qui sont attribués à deux groupements méthyles aliphatiques et un groupement méthyle attaché à un hétéroatome. Cela est confirmé par leur déplacement chimique, ainsi le premier apparaît à δ<sub>H</sub> 0.25 ppm (d, *J* = 6.8 Hz) et le deuxième à δ<sub>H</sub> 0.75 (d, *J* = 6.6 Hz) alors que le méthyle attaché à l'azote résonne à δ<sub>H</sub> 3.02 ppm (s), sur le spectre on trouve aussi un signal qui apparaît sous forme de multiplet à δ<sub>H</sub> 1.78 ppm (m) ainsi que d'autres signaux à 3.16 ppm (dd, *J* = 19.3, 4.8), 3.20 ppm (dd, *J* = 19.3, 4.8 Hz), 4.84 ppm (d, *J* = 8.9 Hz) et à 5.43 ppm (dd, *J* = 16.8, 4.8 Hz), et des protons aromatiques entre δ<sub>H</sub> 7.15 ppm et 7.28 ppm.

Les différentes corrélations ont été déterminées par le spectre COSY, on observe ainsi un premier système de spin formé par le proton H-1 (4.84 ppm) qui est corrélé à H-2 (1.78 ppm) qui est à son tour corrélé aux protons des deux méthyles (CH<sub>3</sub>-3 et CH<sub>3</sub>-3'), entre les protons des deux méthyles on observe une corrélation à longue distance (L R C). Le deuxième système de spin est formé par le proton H-4 (5.43 ppm) qui est corrélé aux deux protons H-5 (3.38 ppm) corrélés eux même aux protons aromatiques H-6, ces derniers sont corrélés au proton aromatique H-7.

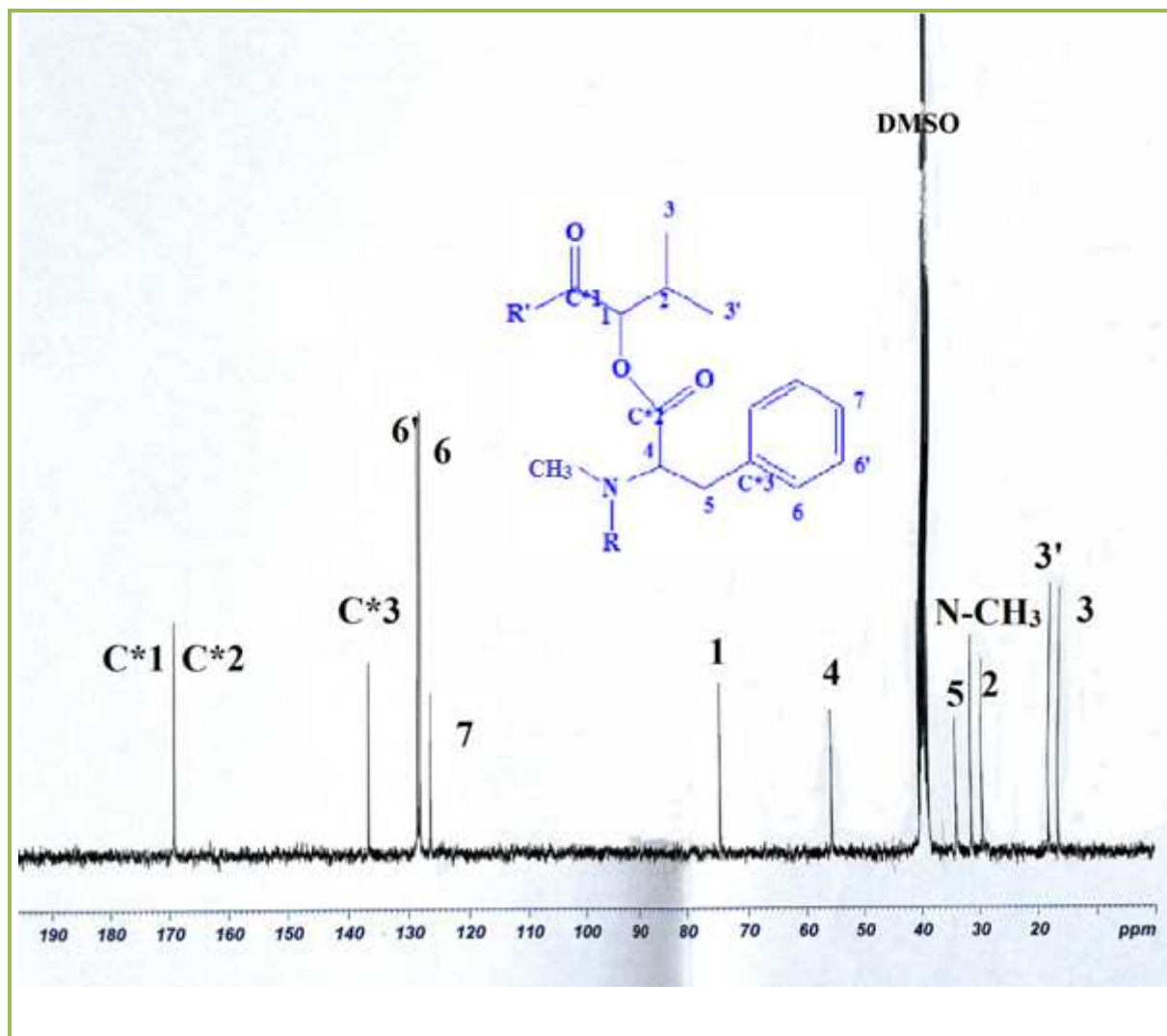
L'interprétation du spectre de HMBC nous a permis de confirmer la structure complète du peptide cyclique Beauvericine, nous avons confirmé les différentes corrélations possibles. Ces résultats trouvés sont conformes aux données de la littérature pour le composé Beauvericine [16].

**Tableau 17** : Les déplacements chimiques et les corrélations de Beauvericine

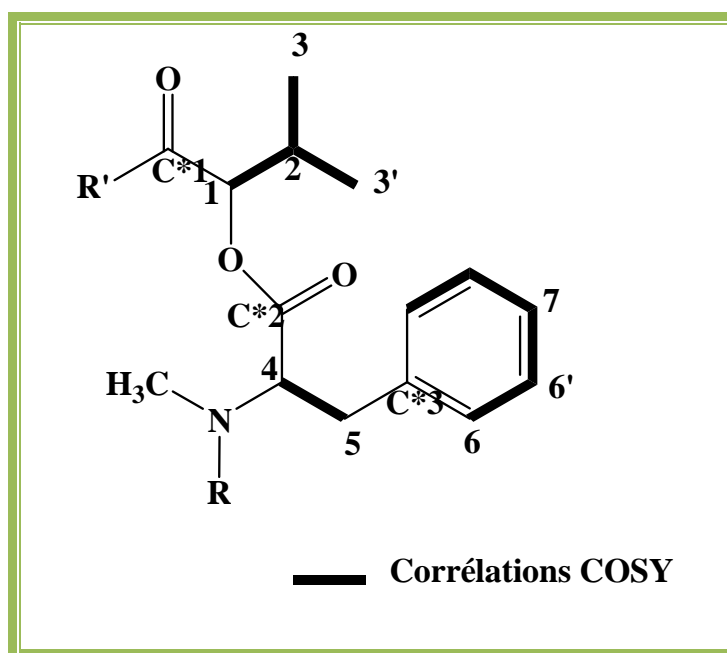
Position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	COSY	$\delta_H$ (Yuh-Chi Kuo et al., [16])
1	74.60	4.84 (d, $J = 8.9$ Hz)	H-2, H-3, H-3'	4.89 (1H, d, $J=8.5$ Hz, $\alpha$ -CH)
2	29.42	1.78 (m, 1H)	H-3, H-3', H-1	1.97 (1H, m, $\beta$ -CH)
3	16.43	0.25 (d, $J=6.8$ Hz, 3H)	H-3', H-2, H-1	0.37 (3H, d, $J=6.6$ Hz, $\gamma$ 1-CH <sub>3</sub> )
3'	18.08	0.75 (d, $J=6.6$ Hz, 3H)	H-3, H-2, H-1	0.76 (3H, d, $J=6.6$ Hz, $\gamma$ 2-CH <sub>3</sub> )
4	55.71	5.43 (dd, $J=14.5$ 4.8 Hz, 1H)	H-5	5.51 (1H, dd, $J=11.8$ 4.8 Hz, $\alpha$ -CH, Phe)
5	33.94	3.16 (dd, $J=14.5$ 11.8 Hz, 1H)	H-4	2.93 (1H, dd, $J=14.5$ 11.9 Hz, $\beta$ -CH(H)-Phe)
5'		3.20 (dd, $J=14.4$ 4.8 Hz, 1H)		3.34 (1H, dd, $J=14.5$ 4.9 Hz, $\beta$ -CH(H)-Phe)
6	128.27	7.1 à 7.3 (5H, Ar)	H-6', H-7	7.20 (5H, ar CH, Phe)
6'	128.68	7.1 à 7.3 (5H, Ar)	H-6, H-7	7.20 (5H, ar CH, Phe)
7	136.69	7.1 à 7.3 (5H, Ar)	H-6, H-6'	7.20 (5H, ar CH, Phe)
N-CH <sub>3</sub>	31.31	3.02 (s, 3H)		2.98 (3H, s, N-CH <sub>3</sub> )
C*1	169.27	-		-
C*2	169.24	-		-
C*3	126.52	-		-



**Figure 32** : Le spectre RMN du proton de Beauvericine BN1



**Figure 33** : Le spectre RMN du carbone 13 du Beauvericine BN1



**Figure 34** : Les corrélations COSY dans une subunité de Beauvericine BN1

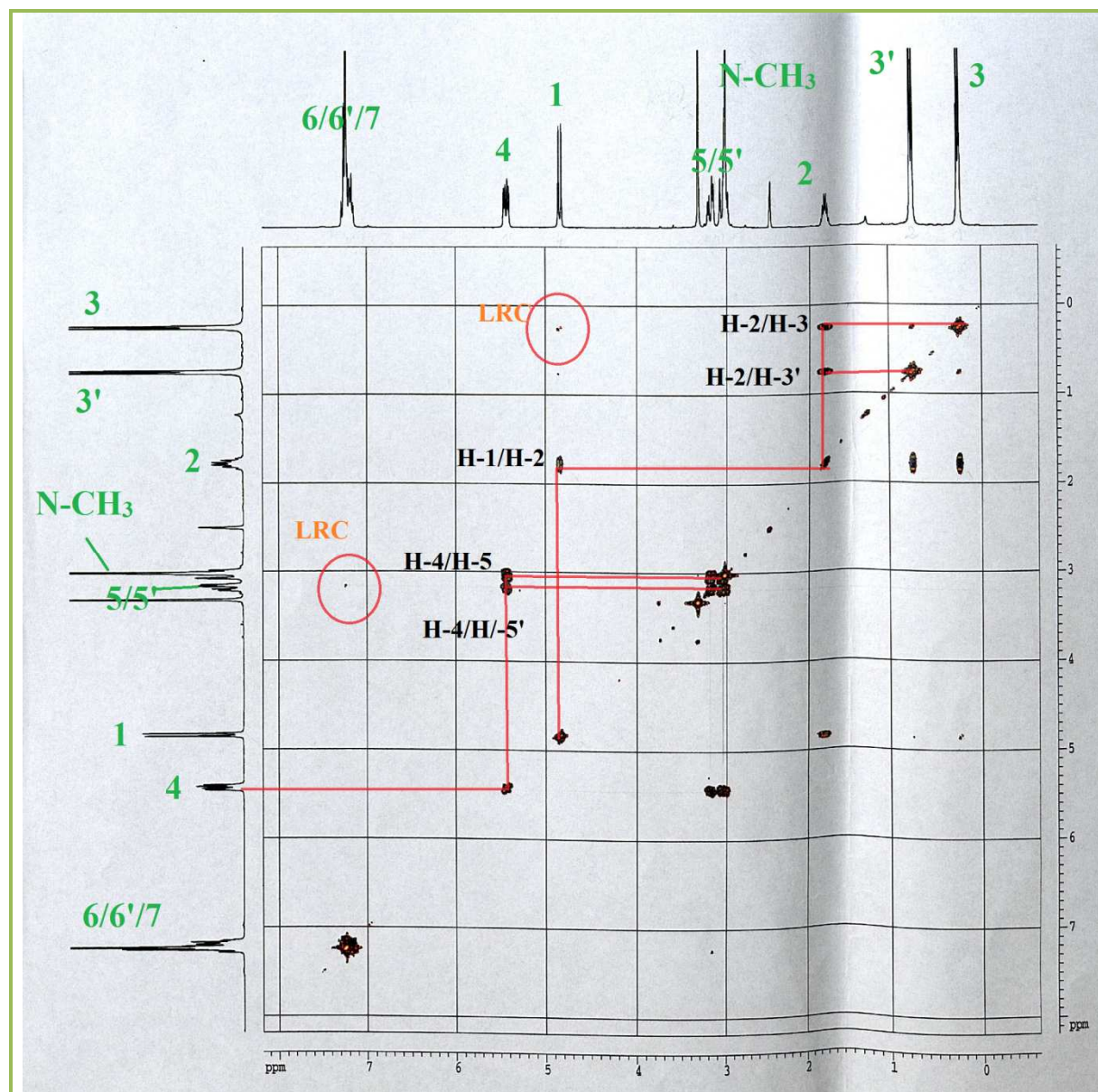
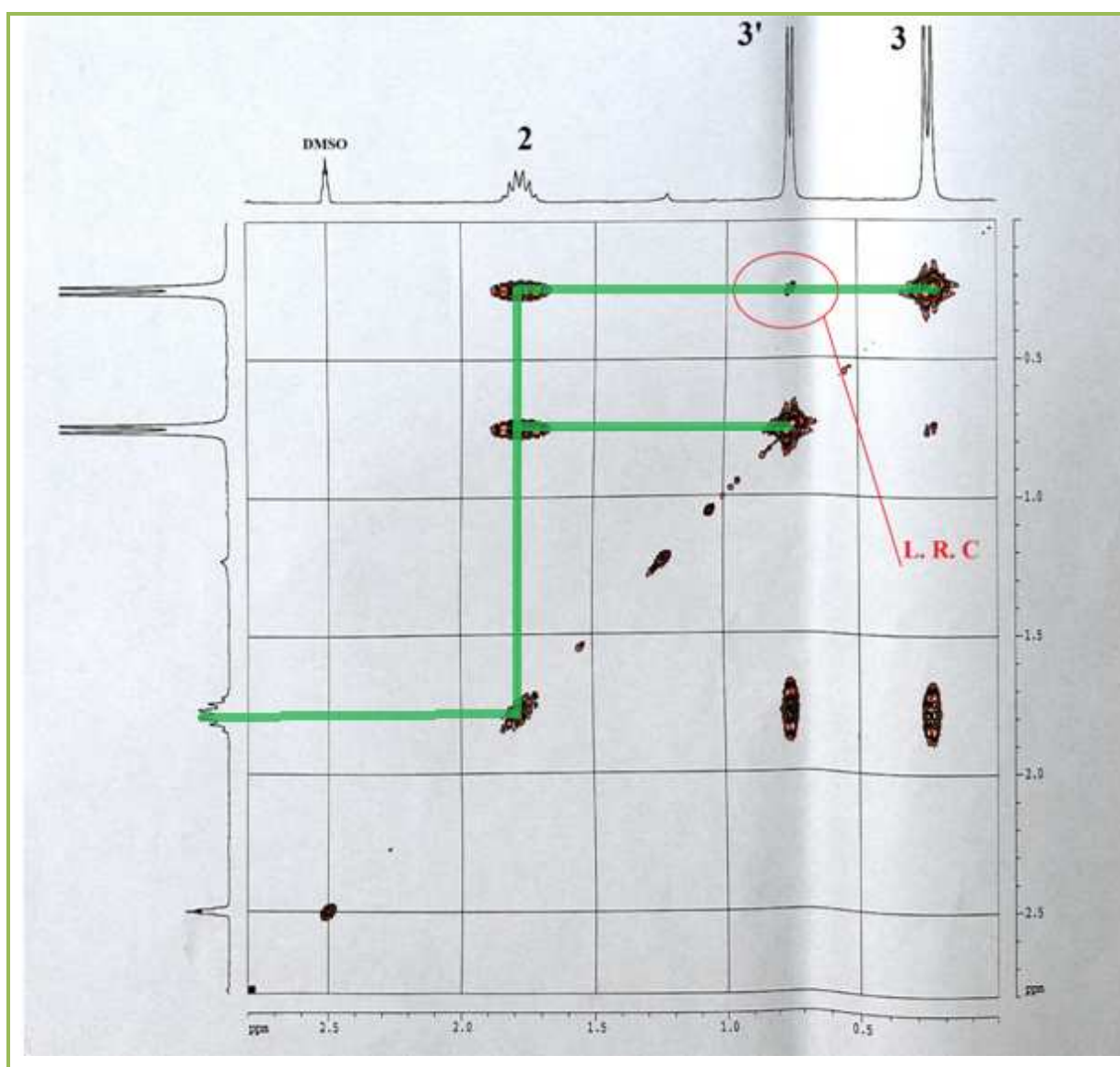
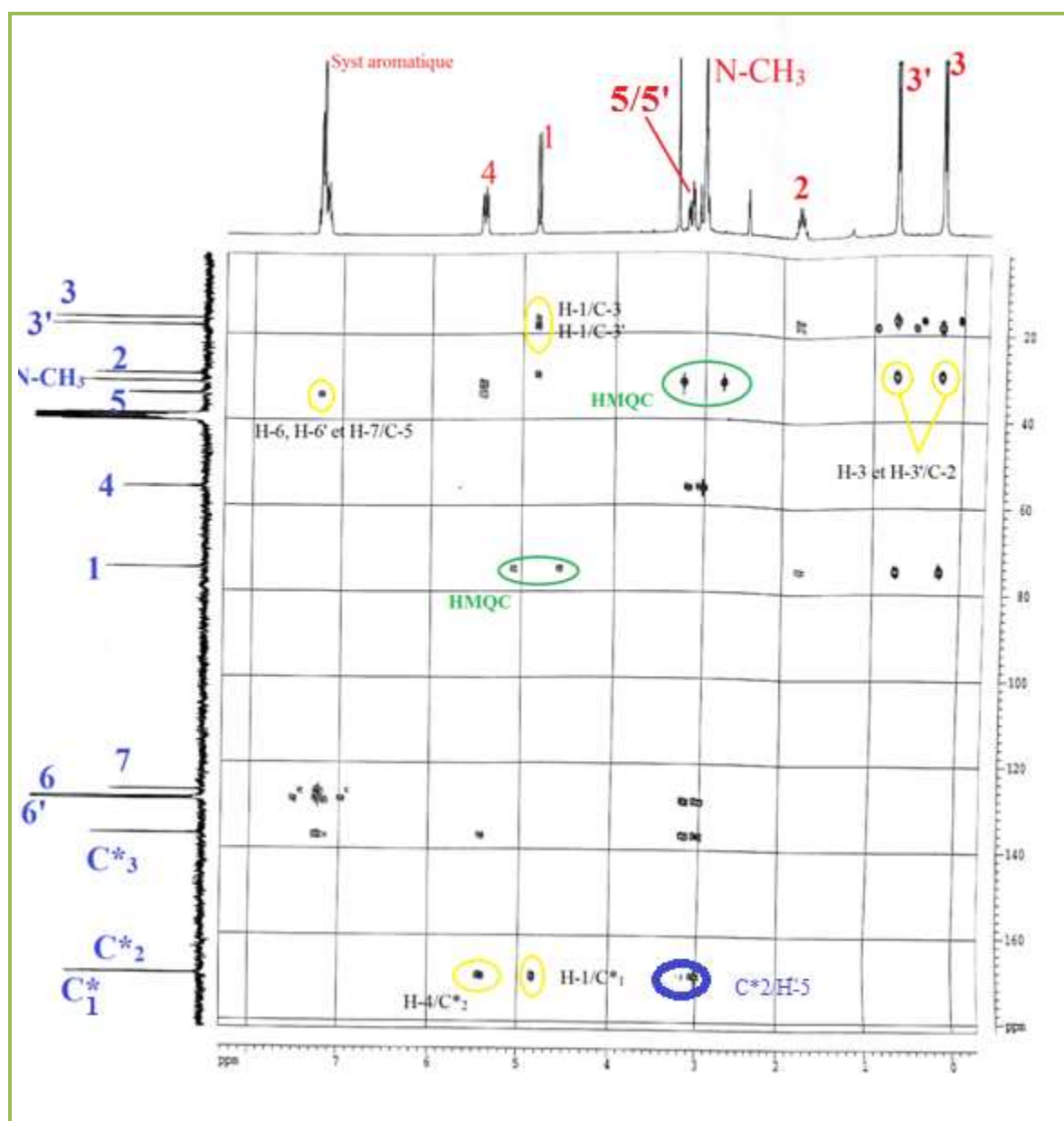


Figure 35 : Le spectre COSY déterminant les systèmes de spin de Beauvericine BN1



**Figure 36** : Extension d'une partie de spectre COSY de Beauvericine BN1



**Figure 37** : Le spectre HMBC de Beauvericine BN1



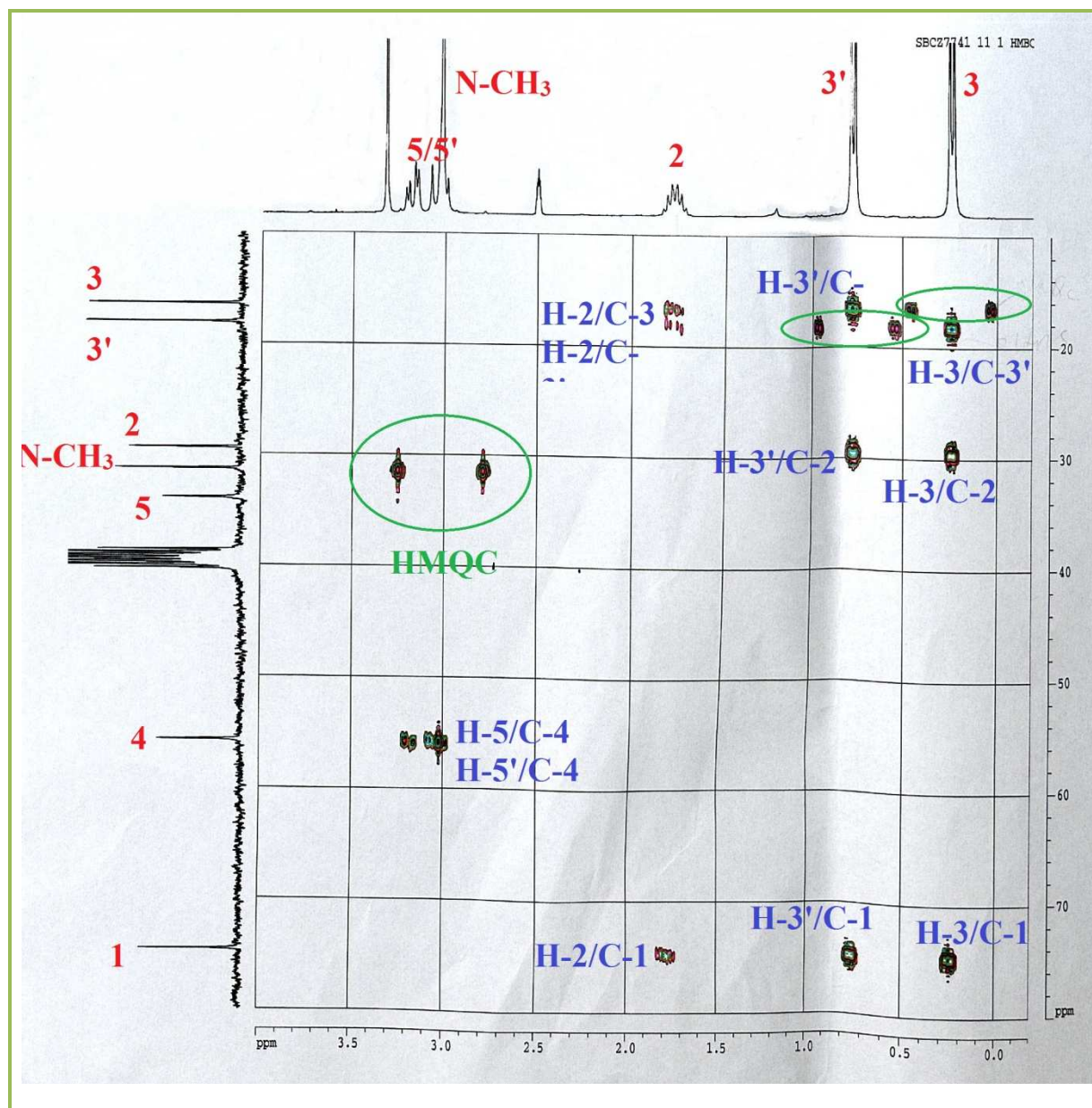


Figure 39 : Les principales corrélations H-C obtenues pour BN1

### III. 2.2. Le Z-Fusapyrone (BN2)

<b>Source biologique</b> <b>Quantité isolée</b> <b>Description physique</b> <b>Formule Moléculaire</b> <b>Poids moléculaire</b> <b>Temps de rétention HPLC</b>	<i>Fusarium begoniae</i> 2.1 mg Cristaux jaunes $C_{10}H_{10}O_4$ 194 g/mol 19.50 min
Structure	
<b>Spectre HPLC</b>	<b>Spectre UV</b>
<b>+ESI-MS</b>	

Ce composé a été isolé de l'extrait AcOEt de *Fusarium begoniae* sous forme de cristaux jaunes. Le spectre UV montre une absorption à  $\lambda_{\max}$  (MeOH) = 242.0 et à 332.0 nm. L'ESI-MS en mode positif a montré un ion moléculaire à  $m/z = 195 [M+H]^+$  indiquant que la masse moléculaire de ce composé est de 194 g/mol. Le spectre de la RMN du proton montre la présence de deux groupements méthyles qui apparaissent sous forme de singulets qui se sont attachés à des doubles liaisons :  $\delta_H$  (CH<sub>3</sub>-10) = 2.10 ppm (s) et  $\delta_H$  (CH<sub>3</sub>-11) = 2.36 ppm (s). Trois protons méthyniques H-4 à  $\delta_H = 7.39$  ppm (dd,  $J = 7.0, 2.0$  Hz), H-5 à  $\delta_H = 6.68$  ppm (d,  $J = 7.0, 2.0$  Hz) et H-8 à  $\delta_H = 6.61$  ppm (s). En plus, on trouve un large pic à  $\delta_H = 12.5$  ppm attribué au groupement -COOH.

Dans le spectre COSY une corrélation a été observée entre H-4 et H-5, la structure du composé a été confirmée par la HMBC, les corrélations de CH<sub>3</sub>-10 à C-2 ( $\delta_C = 165.1$  ppm), à C-3 ( $\delta_C = 128.8$  ppm) et à C-4 ( $\delta_C = 142.1$  ppm) ont été observées. L'attachement de l'acide Z-but-2-énoïque à C-6 a été confirmé à travers les corrélations observées entre CH<sub>3</sub>-11 à C-6 ( $\delta_C = 159.5$  ppm), C-7 ( $\delta_C = 144.3$  ppm) et C-8 ( $\delta_C = 121.1$  ppm).

En additionnant les corrélations de H-4 à C-2 ( $\delta_C = 165.1$  ppm) et C-6 ( $\delta_C = 159.5$  ppm), de H-5 à C-3 ( $\delta_C = 128.8$  ppm), C-6 ( $\delta_C = 159.5$  ppm) et C-7 ( $\delta_C = 144.3$  ppm) et de H-8 à C-6 ( $\delta_C = 159.5$  ppm) et C-7 ( $\delta_C = 144.3$  ppm).

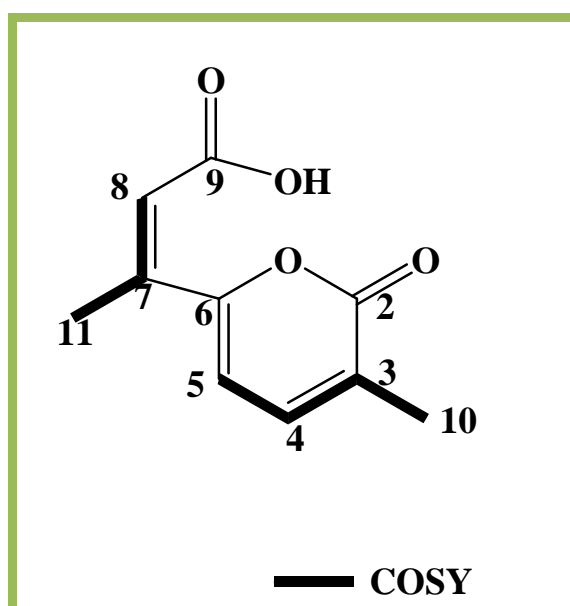
La configuration Z de notre composé a été confirmée sans ambiguïté par la ROSEY expérimentale, une tache existante entre CH<sub>3</sub>-11 et H-8 indique que ces deux derniers sont de même part de la double liaison (stéréochimie). Nous signalons que c'est la première fois qu'un dérivé de la Z-pyrone a été confirmé par la méthode ROSEY expérimentale.

**Tableau 18** : Les déplacements chimiques et les corrélations de Z-Fusapyrone

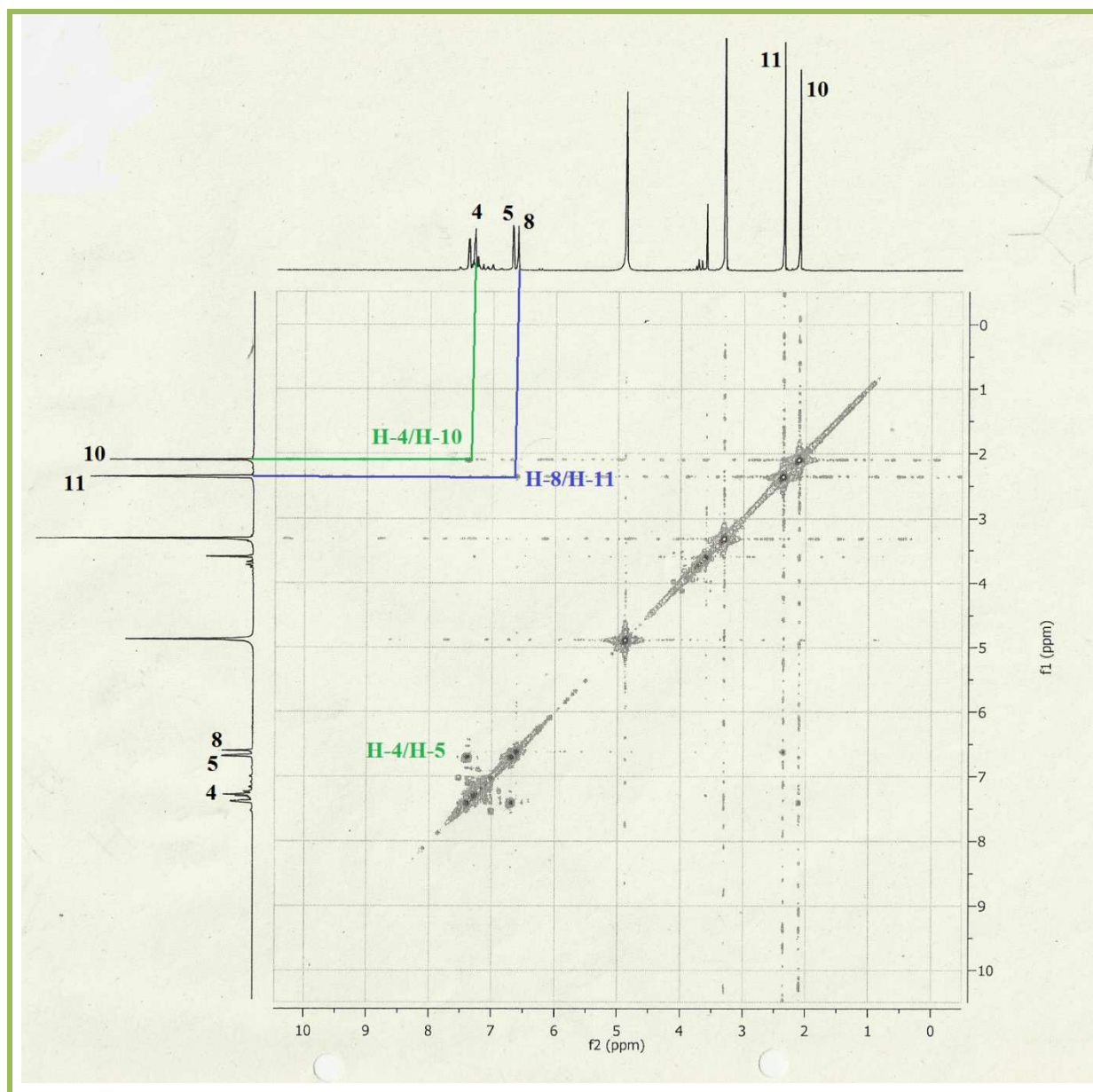
Position	$\delta_C^*$ (ppm)	$\delta_C^\circ$ (ppm)	$\delta_H^*$ (ppm)	$\delta_H^\circ$ (ppm)
2	165.1	162.0		
3	128.8	126.5		
4	142.1	140.0	7.39 (d, $J=7.2$ Hz)	7.37 (d, $J=7.1$ Hz)
5	108.0	106.0	6.68 (d, $J=7.2$ Hz)	6.74 (d, $J=7.1$ Hz)
6	159.5	157.0		
7	144.3	141.5		
8	121.1	119.0	6.61 (s)	6.41 (s)
9	170.4	172.0		
CH <sub>3</sub> -10	17.5	16.6	2.10 (d, $J=0.9$ Hz)	2.10 (s)
CH <sub>3</sub> -11	14.5	12.5	2.36 (d, $J=1.0$ Hz)	2.29 (s)
-COOH				12.50 (s)

\* Mesuré dans CD<sub>3</sub>OD à 500 MHz (<sup>1</sup>H) et 125 MHz (<sup>13</sup>C)

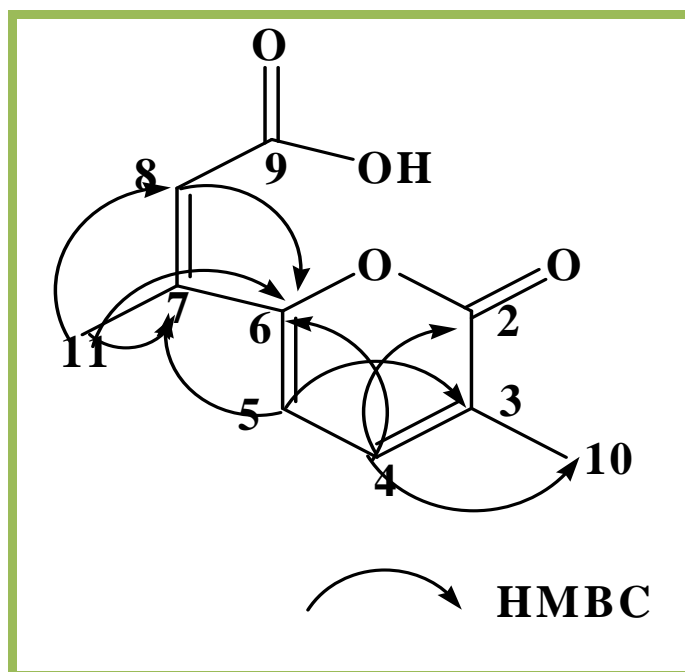
° Mesuré dans DMSO-d<sub>6</sub> à 300 MHz (<sup>1</sup>H) et 75 MHz (<sup>13</sup>C).



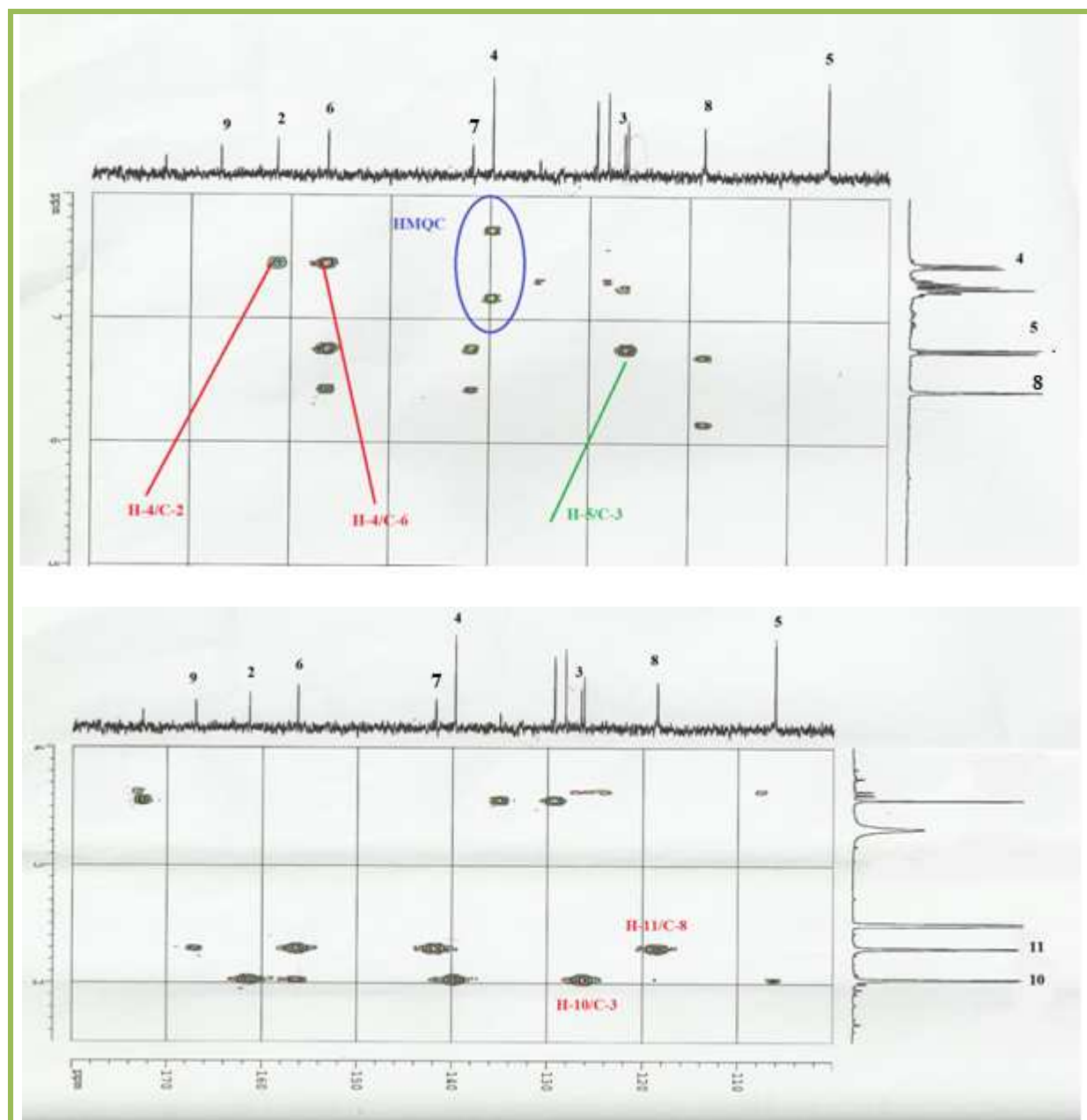
**Figure 40** : Les corrélations COSY de Z-Fusapyrone BN2



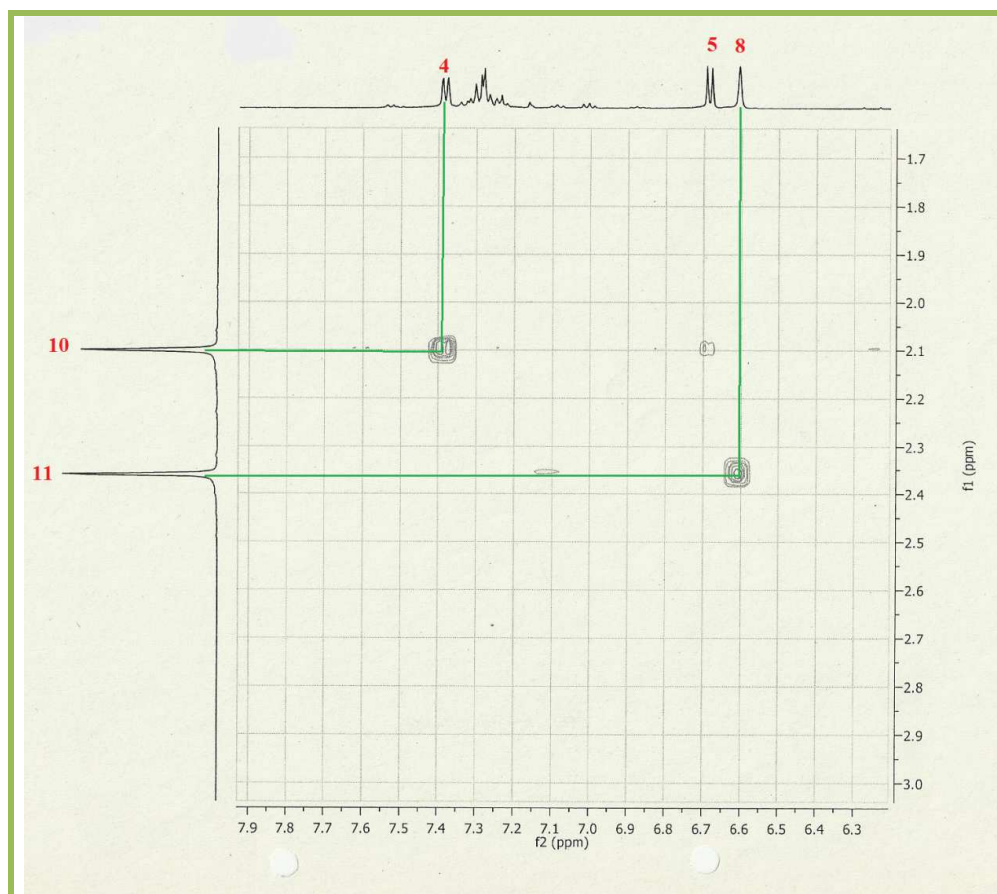
**Figure 41** : Le spectre COSY déterminant les corrélations H-H pour BN2



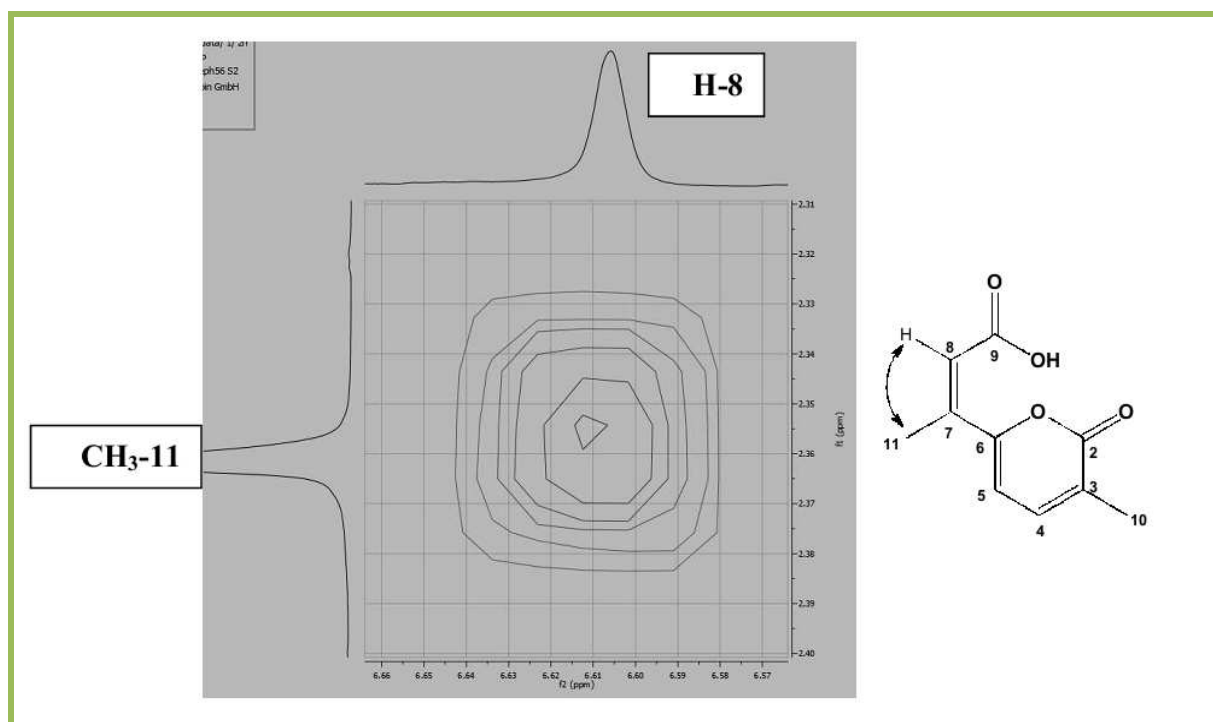
**Figure 42** : Les corrélations HMBC de Z-Fusapyrone BN2



**Figure 43** : Spectre HMBC montrant les corrélations H-C pour BN2



**Figure 44** : Spectre ROSEY de Z-Fuzapyrone BN2

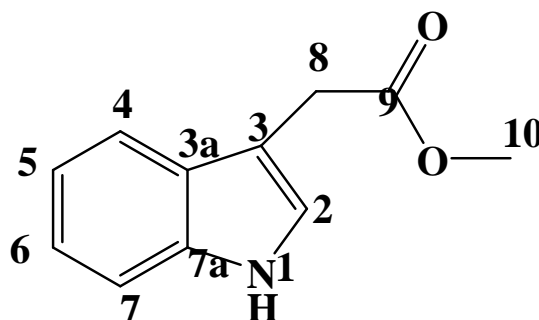


**Figure 45** : Spectre ROSEY: corrélation CH<sub>3</sub>-11/H-8 pour BN2

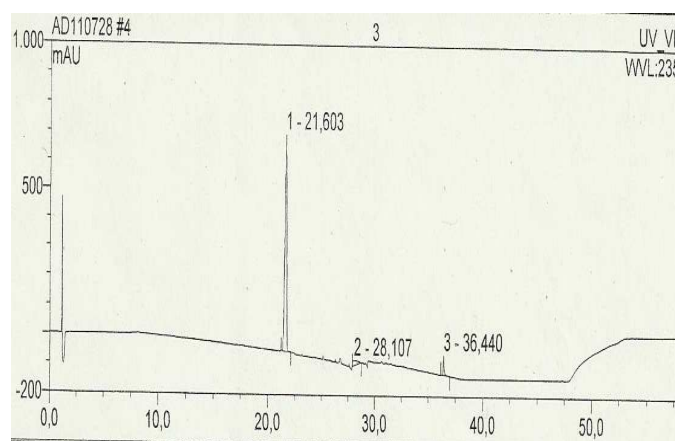
### III. 2.3. L'Indole-3-acétate de méthyle (BN3)

<b>Source biologique</b>	<i>Fusarium begoniae</i>
<b>Quantité isolée</b>	7.5 mg
<b>Description physique</b>	Cristeaux blancs
<b>Formule Moléculaire</b>	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>
<b>Poids moléculaire</b>	189.2 g/mol
<b>Temps de rétention HPLC</b>	21.60 min

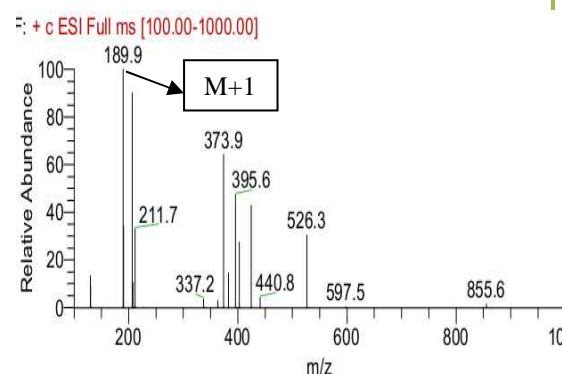
Structure



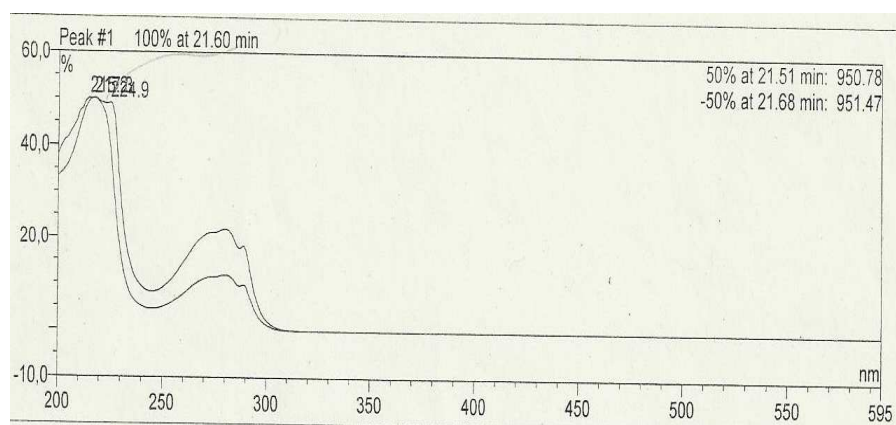
Spectre HPLC



+ESI-SM



Spectre UV



Ce composé a été isolé à partir de l'extrait AcOEt de *Fusarium begoniae* sous forme de cristaux blancs (7.5mg) en utilisant une colonne chromatographique avec le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9 :1. Le spectre UV de ce composé est caractérisé par la présence de deux pics d'absorptions maximales, le premier à 216.7 nm et le deuxième à 279.1 nm. La gamme totale de cette longueur d'onde est caractéristique de la famille des indoles, donc notre composé est un dérivé d'indole.

Le spectre de masse montre la présence d'un pic [M+H]<sup>+</sup> (Electrospray en mode d'ionisation positive) à 189.9 m/z ce qui indique que le poids moléculaire de ce composé est de 189 g/mol correspondant à la formule moléculaire C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>.

L'élucidation de la structure a été basé sur les résultats de l'analyse spectrale de la RMN 1D et 2D y compris la RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, DEPT, COSY, HMBC et HMQC.

Les spectres de la RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C ainsi que DEPT révèlent la présence d'un méthyle à  $\delta_H = 3.68$  ppm attribué au groupement méthoxy en position 10, un méthylène à  $\delta_H = 3.77$  ppm pour CH<sub>2</sub>-8, un méthine oléfinique à  $\delta_H = 7.15$  ppm pour CH-2. Quatre méthines aromatiques à  $\delta_H = 7.51$  ppm (dd,  $J=7.7, 2.1$  Hz), 7.01 ppm (td,  $J=7.9, 1.3$  Hz), 7.10 ppm (td,  $J=7.9, 1.3$  Hz) et à 7.33 ppm (dd,  $J=8.1, 2.1$  Hz) qui sont attribués respectivement aux protons aromatiques H-4, H-5, H-6 et H-7. Trois carbones quaternaires à  $\delta_C = 108.6, 128.5$  et 138.0 ppm qui se sont attribués à C-3, C-3a et à C-7a, un carbonyle de l'ester carboxylique à  $\delta_C = 174.6$  ppm.

Dans le spectre COSY on note la présence d'un système de spin d'un noyau aromatique (le proton CH-2 est corrélé avec le proton N-H). Le spectre HMBC montre les corrélations de H-2 à C-3, à C-3a et à C-7a, de H-4 à C-3, C-6 et à C-7a, de H-5 à C-3a et à C-7, de H-6 à C-4 et à C-7a et de H-7 à C-3a et à C-5. Ultérieurement, le spectre de la HMBC révèle également une corrélation entre les protons du OCH<sub>3</sub>-10 et le carbone C-9.

Le signal singulet à  $\delta_H = 7.15$  ppm indique que le substituant est connectée au C-3 plutôt qu'au C-2 car le déplacement chimique du proton de la position 2 est plus déblindé et ceci est du à l'influence de la délocalisation du doublet libre de l'azote. Les corrélations de CH<sub>2</sub>-8 à C-2, à C-3, à C-3a et à C-9 confirment l'attachement de la fonction ester à la position 3.

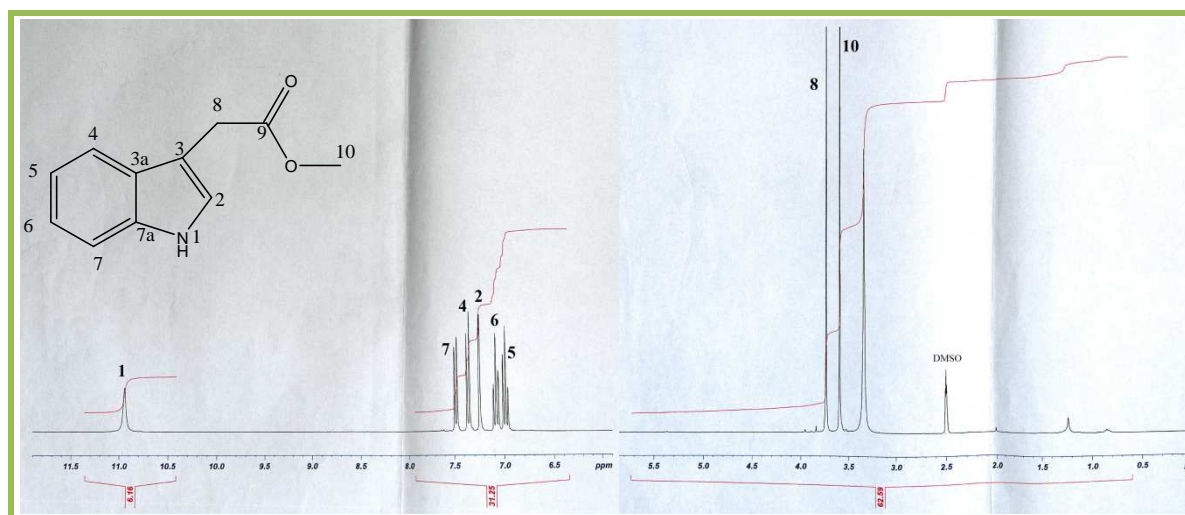
Les données spectrales de l'UV, de la RMN et de la spectrométrie de masse obtenues pour notre composé sont identiques à celles reportées pour l'indole-3-acétate de méthyle précédemment isolé de l'endophyte marin *Penicillium commune* [17].

Les différentes corrélations sont mentionnées dans le tableau qui suit et sur la structure proposée.

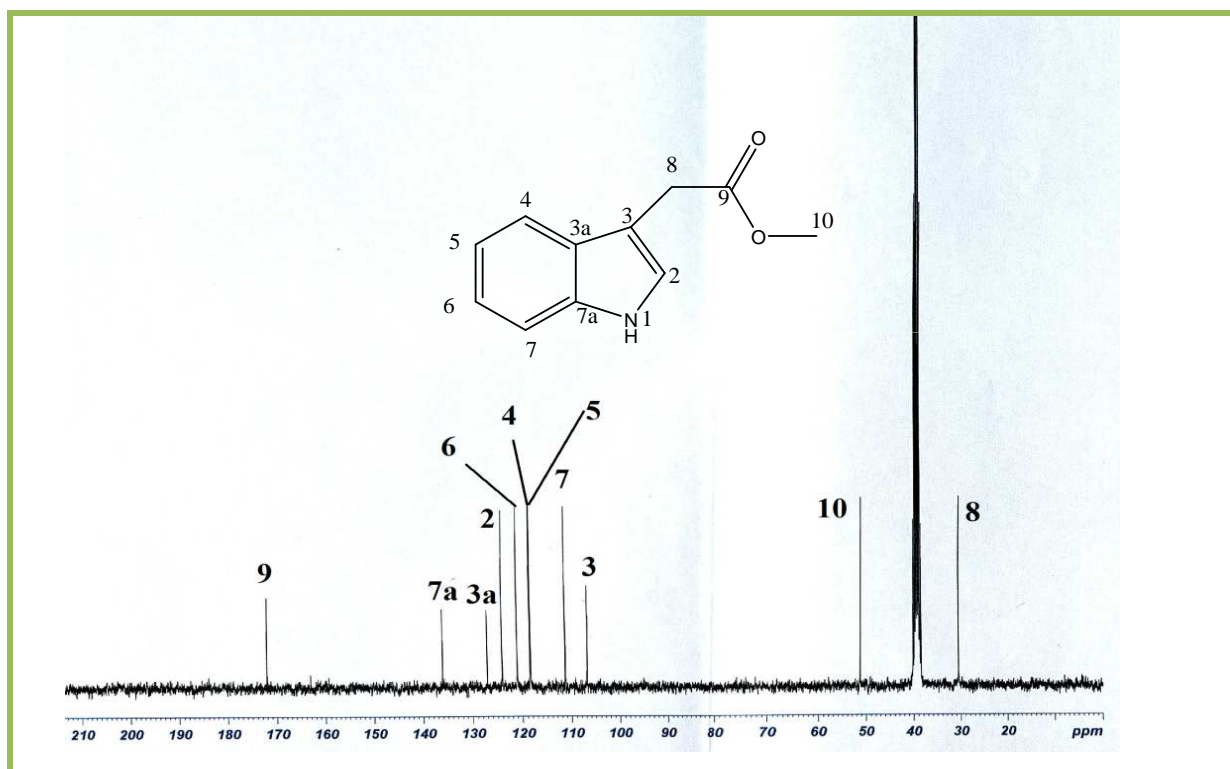
**Tableau 19** : Les déplacements chimiques et les corrélations COSY et HMBC de L'Indole-3-acétate de méthyle

Position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	COSY	HMBC
1		10.95 (s, 1H)	H-2	
2	124.8	7.15 (s)	H-8, H-1	H-8/C-2
3	108.6			H-2/C-3, H-8/C-3, H-7/C-3
3a	128.5			H-2/C-3a, H-8/C-3a, H-5/C-3a, H-7/C-3a, H-4/C-3a, H-6/C-3a
4	119.5	7.51 (dd, $J=7.7$ 2.1 Hz)	H-5	H-5/C-4, H-6/C-4
5	120.1	7.01 (td, $J=7.9$ 1.3 Hz)	H-6, H-4	H-4/C-5, H-6/C-5
6	122.6	7.10 (td, $J=7.9$ 1.3 Hz)	H-7, H-5	H-5/C-6, H-7/C-6, H-4/C-6
7	112.4	7.33 (dd, $J=8.1$ 2.1 Hz)	H-6	H-5/C-7, H-6/C-7
7a	138.0			H-2/C-7a, H-5/C-7a, H-6/C-7a
8	32.0	3.77 (s, 2H)	H-2	H-2/C-8
9	174.6			H-8/C-9
10	52.2	3.68 (s, 3H)		

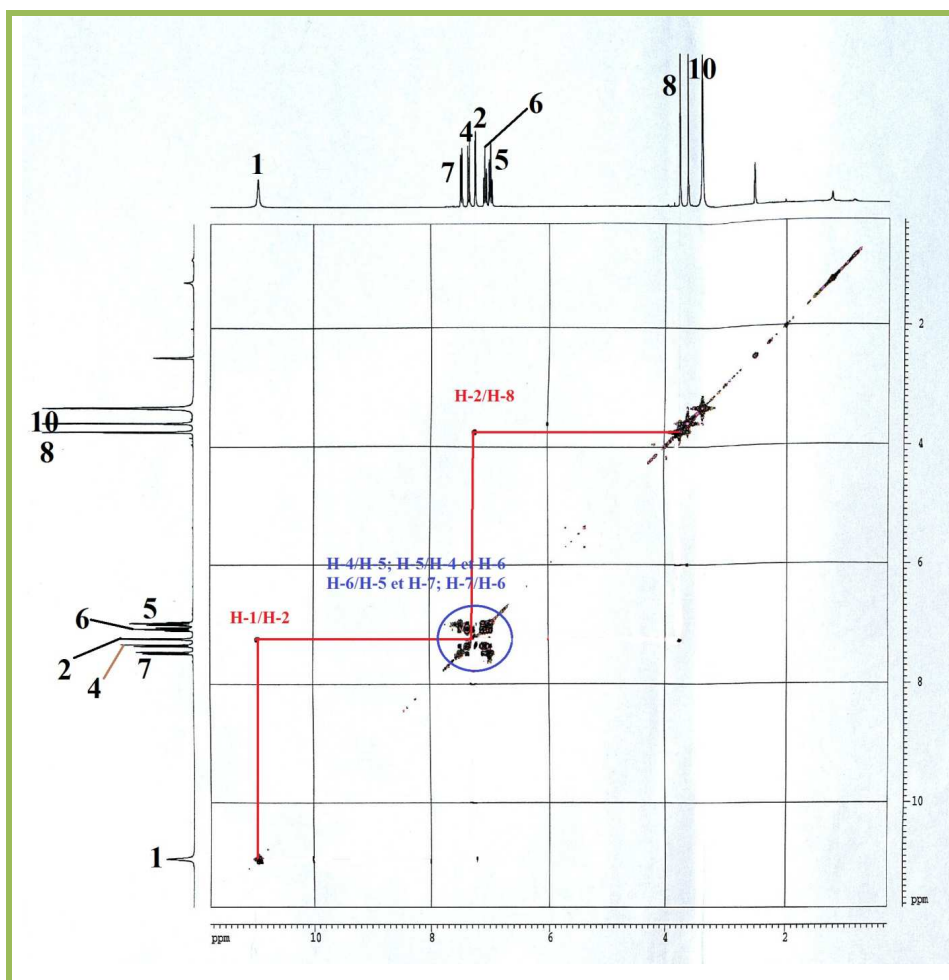
Les mesures ont été faites dans le DMSO- $d_6$  à 600 MHz pour RMN $^1H$  et à 150 MHz pour RMN $^{13}C$ .



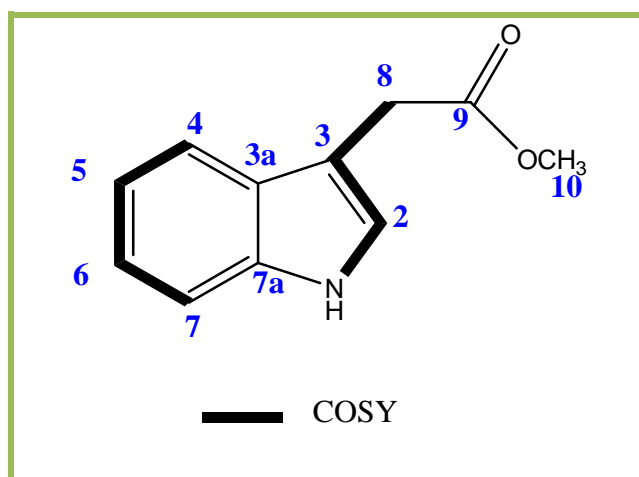
**Figure 46** : Le spectre RMN du proton de l'Indole-3-acétate de méthyle BN3



**Figure 47** : Le spectre RMN du carbone de l'Indole-3-acétate de méthyle BN3



**Figure 48** : Le spectre de la RMN 2D : COSY pour BN3



**Figure 49** : Les corrélations COSY de L'Indole-3-acétate de méthyle BN3

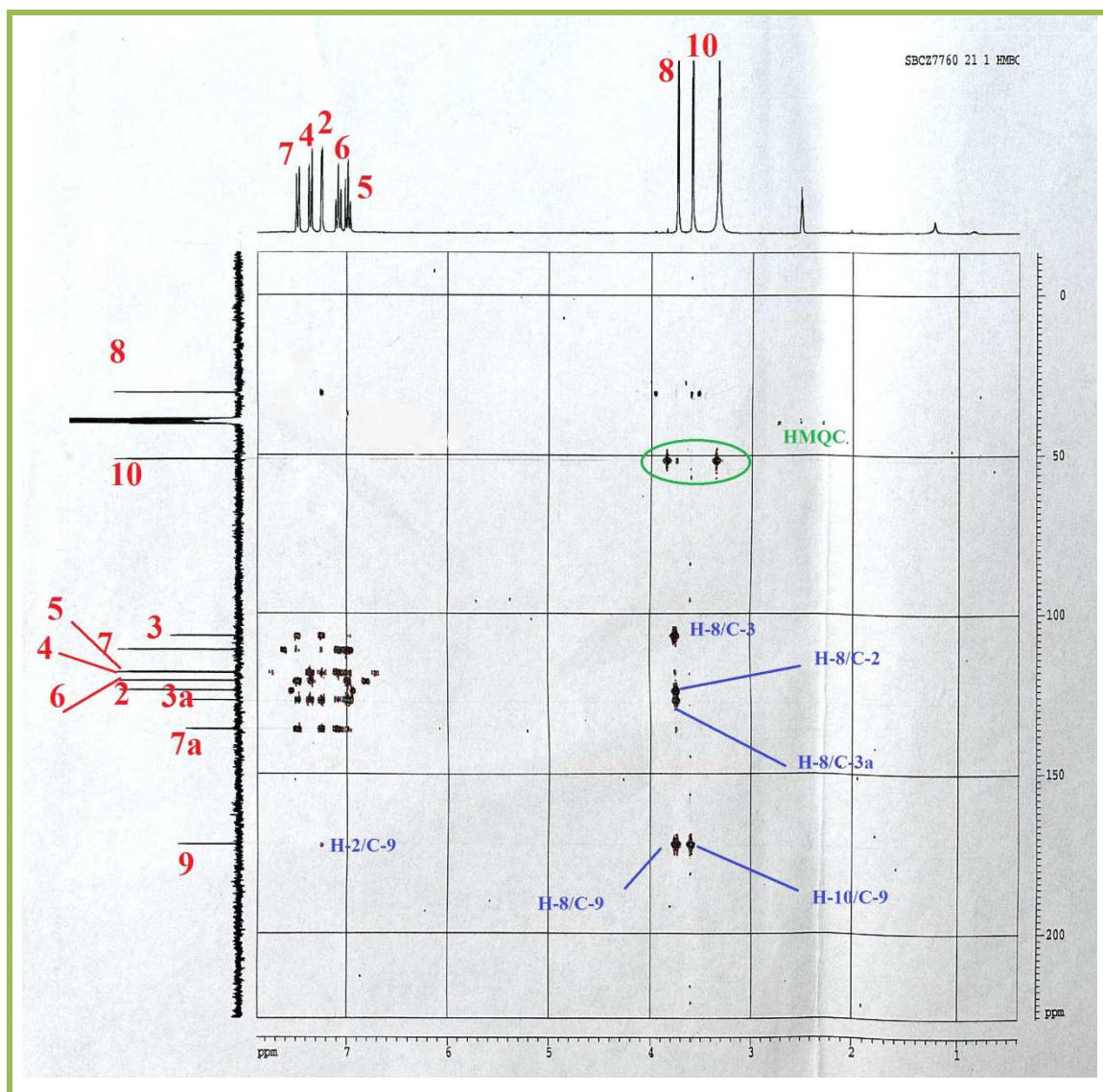
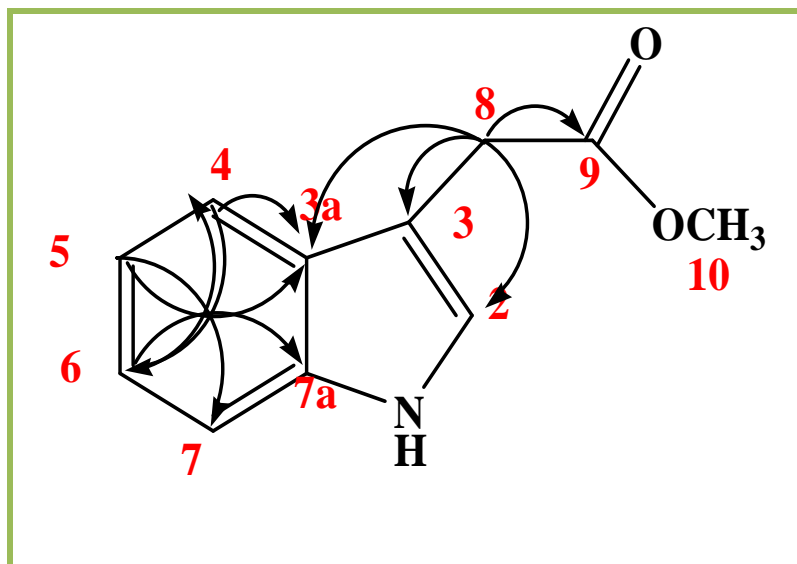
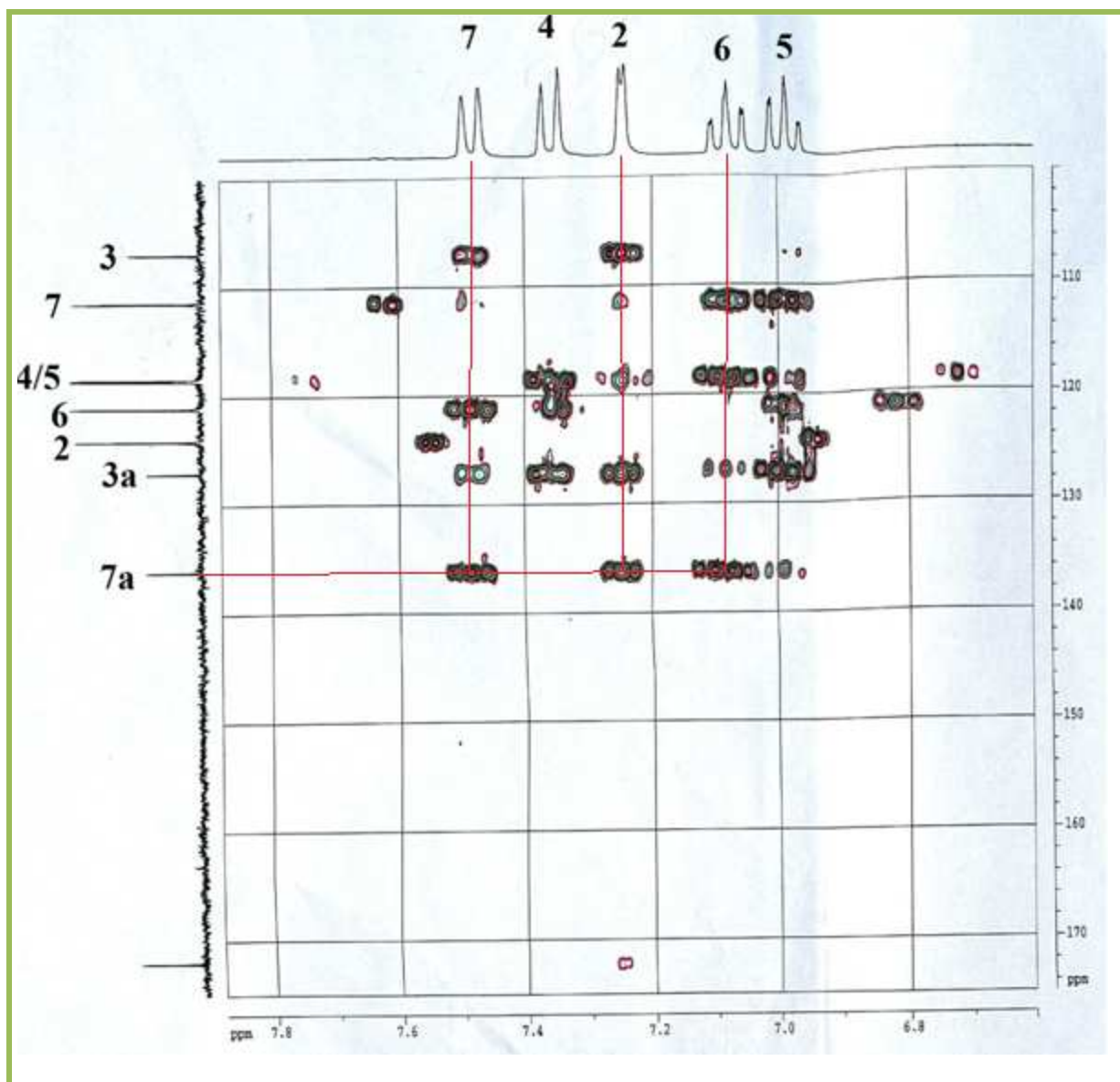


Figure 50 : Le spectre de la RMN 2D : HMBC pour BN3



**Figure 51** : Les différentes corrélations HMBC pour BN3

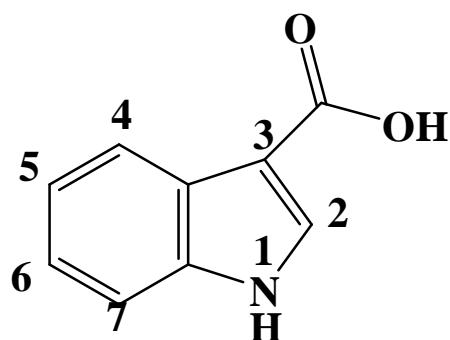


**Figure 52** : Extension d'une partie du spectre HMBC pour BN3

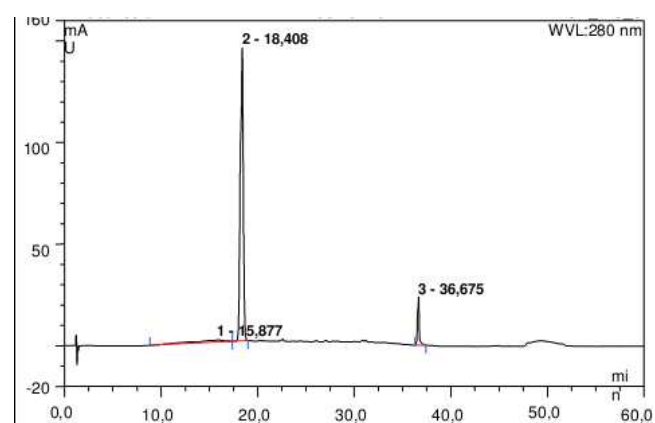
### III. 2.4. Indole-3-acide carboxylique (BN4)

Source biologique	<i>Fusarium begoniae</i>
Quantité isolée	1.7 mg
Description physique	Cristeaux marron
Formule Moléculaire	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>
Poids moléculaire	161g/mol
Temps de rétention HPLC	22.03 min
Solubilité	MeOH, DMSO

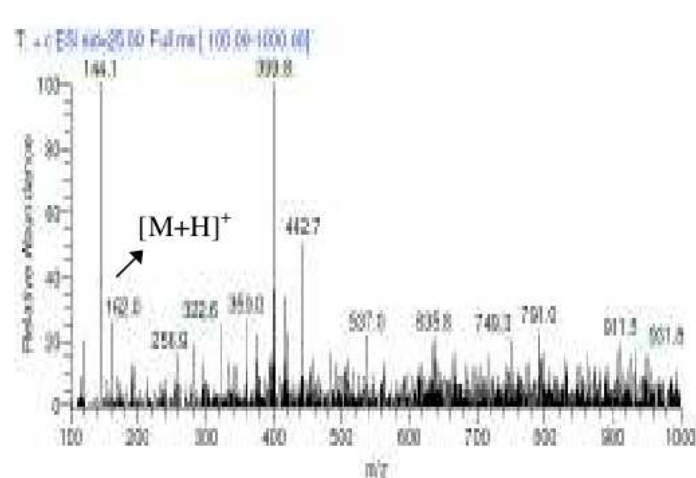
Structure



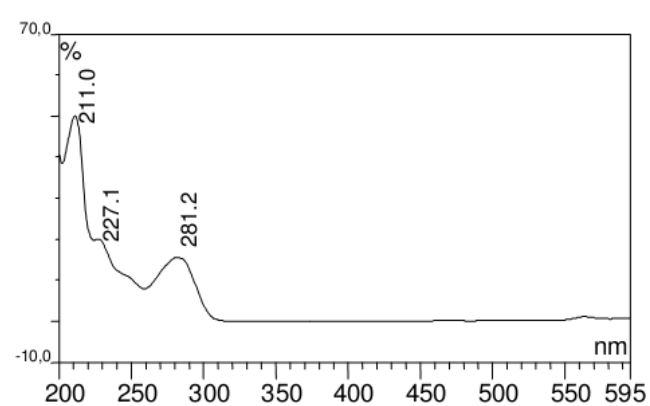
Spectre HPLC



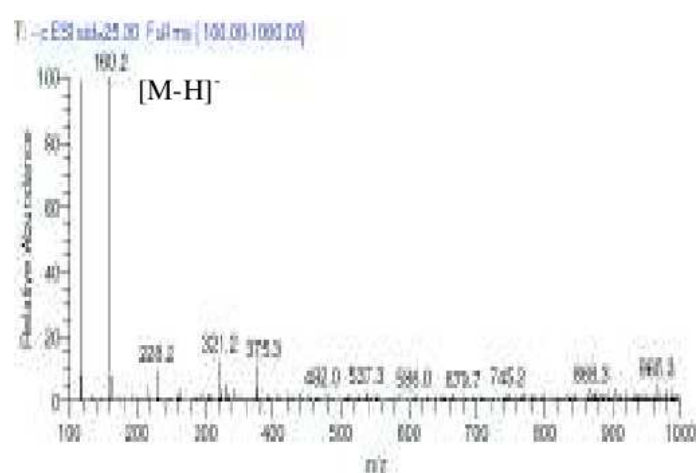
+ESI-MS



Spectre UV



-ESI-MS



Ce produit a été isolé de l'extrait de l'AcOEt sous forme de cristaux marron (1.7 mg). Des absorbances à  $\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH}) = 211.0, 227.1$  et à  $281.2$  nm dans le spectre de l'UV indique la présence d'un dérivé d'indole.

L'ESI-MS en mode d'ionisation positif et négatif montrent des pics moléculaires à  $m/z=162.0$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  et  $m/z=160.2$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  respectivement indiquant que le poids moléculaire est de 161 g/mol, ce qui suggère la formule moléculaire  $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_2$ .

La présence d'une fragmentation à  $m/z=116.0$  qui correspond à  $[\text{M}-\text{COOH}]^-$  dans le spectre de ESI-MS en mode négative montre que le composé contient un squelette d'indole.

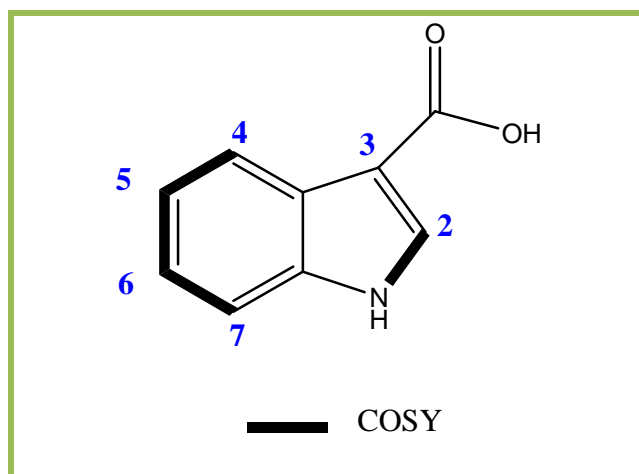
Le spectre de la RMN du proton est similaire à celui du produit que nous avons discuté auparavant (Indole 3-acétate de méthyle) et montre aussi sept protons qui sont inclus en un système ABCD (système aromatique) à  $\delta_{\text{H}} = 8.06$  (ddd,  $J=6.9, 2.2, 0.6$  Hz, H-4),  $7.42$  (ddd,  $J=6.9, 1.2, 0.6$  Hz, H-7),  $7.18$  (dt,  $J=6.9, 2.2$  Hz, H-6),  $7.15$  (dt,  $J=6.9, 1.2$  Hz, H-5) ainsi qu'un proton qui résonne à  $\delta_{\text{H}} = 7.93$  (s, H-2).

Ces résultats spectraux sont identiques à ceux reportés lors de l'extraction de l'acide indol-3-carboxylique du champignon *Botryosphaeria rhodina* isolé de *Bidens pilosa* [18].

**Tableau 20** : Les déplacements chimiques de la RMN<sup>1</sup>H de l'Indole-3-acide carboxylique

Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
1	
2	7.93 (s)
4	8.06 (dd, $J=6.9, 2.2$ Hz)
5	7.15 (dt, $J=6.9, 1.2$ Hz)
6	7.18 (dt, $J=6.9, 2.2$ Hz)
7	7.42 (dd, $J=6.9, 1.2$ Hz)

Mesuré dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) et 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).



**Figure 53** : Les corrélations COSY pour BN4

**III. 2.3. L'Acide 1, 2-Hydroxy-13-(hydroxyméthyl)-3,5,7-triméthyl-2,4-tétradécadiène-1,14-dioïque (BN5)**

Source biologique	<i>Fusarium begoniae</i>
Quantité isolée	19.2 mg
Description physique	Poudre blanche
Formule Moléculaire	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>
Poids moléculaire	342 g/mol
Temps de rétention HPLC	19.99 min
Solvant	DMSO
Structure	
Spectre HPLC	+ESI-MS
Spectre UV	-ESI-MS

Ce composé a été isolé de l'extrait AcOEt de *Fusarium begoniae* sous forme de poudre blanche (19.2 mg). Le spectre UV montre un maximum à  $\lambda_{\text{max}}$  276.0 nm. Le spectre de masse pris par ESI-MS en mode positif montre un pic à 342.8 m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+$  et un pic à 706.5 m/z  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$  (pic de base), le spectre de masse pris en mode négatif montre un pic à 341.2 m/z  $[\text{M}-\text{H}]^-$  et un autre à 683.1 m/z  $[\text{2M}-\text{H}]^-$  indiquant que le poids moléculaire est de 342 g/mol, ce qui correspond à la formule moléculaire  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_6$ .

La RMN du proton montre la présence des protons à 2.39 ppm (H-2 m), à 5.57 ppm (H-13 s), à 3.57 ppm (H-3  $J=8.2$  21.5 Hz dd) et à 3.52 ppm (H-1  $J=5.4$  15.8 Hz dd). On trouve aussi des protons méthylène qui résonnent successivement à 1.06, 1.30, 1.39 et 1.26 ppm sous forme des multiplets correspondants respectivement aux protons de H-7, H-4, H-5 et H-6 ; des signaux à 0.79 ppm ( $J=2.4$  8.9 Hz dd), à 2.15 ppm ( $J=1.2$  d) et à 1.76 ppm ( $J=1.1$  d) correspondant respectivement aux méthyles aliphatiques H-16, H-14 et H-15. Les protons H-8, H-9, H-9' et H-11 résonnent respectivement à 1.63 ppm (m), 1.82 ppm ( $J=8.2$  21.5 dd), 2.06 ppm ( $J=6.2$  19.3 dd) et à 5.72 ppm (s).

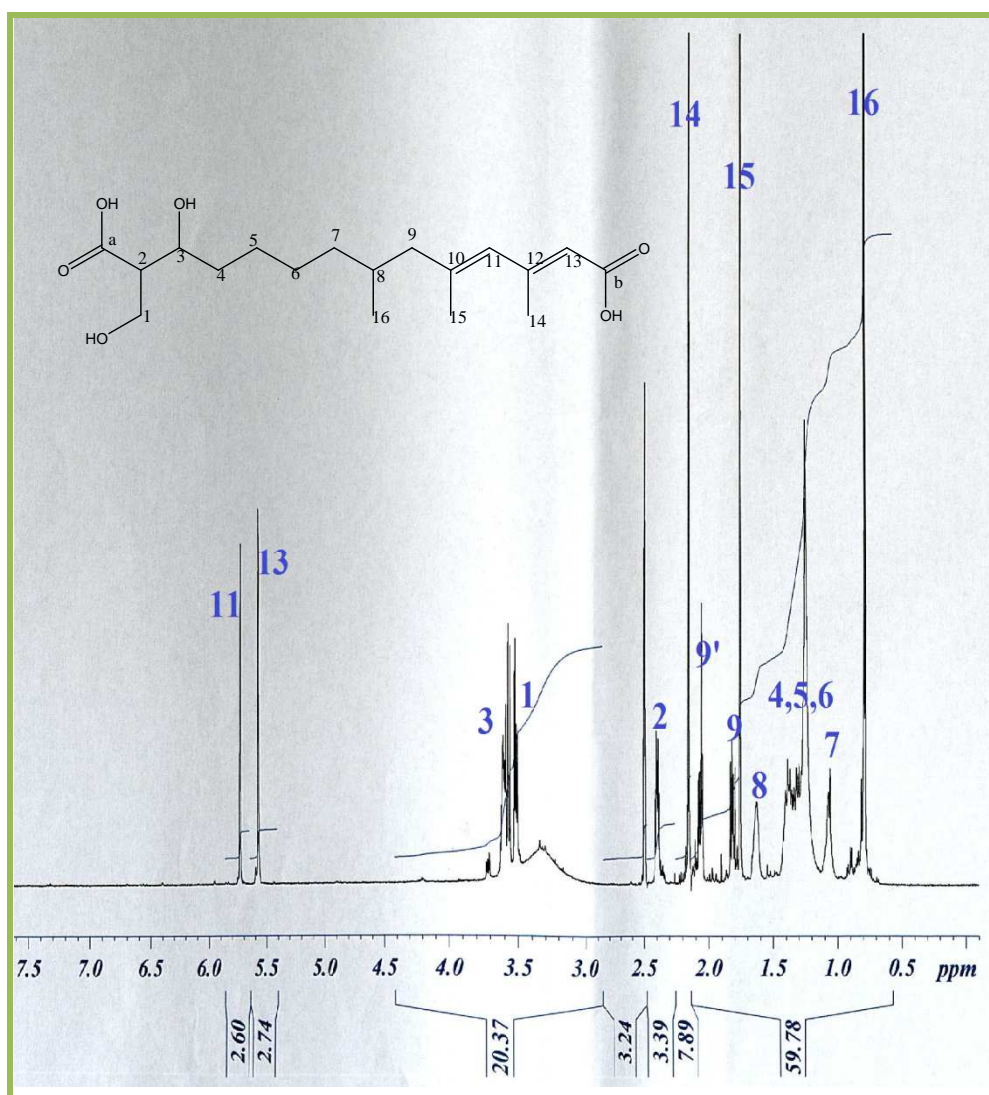
Les systèmes de spin ont été déterminés par le spectre COSY, ainsi le proton H-1 est corrélé aux protons H-2 et H-3 qui est corrélé à son tour aux protons H-4 et H-5 ; le proton H-4 est corrélé aux protons H-5 et H-6, H-6 est corrélé au proton H-7 qui voit à son tour les protons H-8 et H-9 ce dernier voit les protons H-11, H-15 et H-16. Le proton H-11 se corrèle avec les protons H-13, H-14 et H-15 celui-ci voit les protons H-16 et H-13.

L'interprétation du spectre HMBC permet de déterminer comment les unités sont connectées entre elles pour former le composé en question. Ainsi le proton H-1 est corrélé avec les carbones C-2, C-3 et C-a, H-3 est corrélé avec les carbones C-2, C-4 et C-a, le proton H-4 est corrélé aux carbones C-5 et C-3, le H-5 voit le C-6, l'hydrogène H-6 voit le C-7, le proton H-7 est corrélé avec les carbones C-16 C-8 C-6 et C-9. Le proton H-8 se corrèle avec les carbones C-16 et C-7 ainsi que les protons H-9 et H-9' sont corrélés avec les carbones C-16 C-8 C-7 et C-10, le proton H-11 est corrélé avec C-10 C-12 C-13 et C-14, le proton H-13 voit les carbones C-14 et C-b alors que le proton H-14 est corrélé aux C-12 C-13 et C-b.

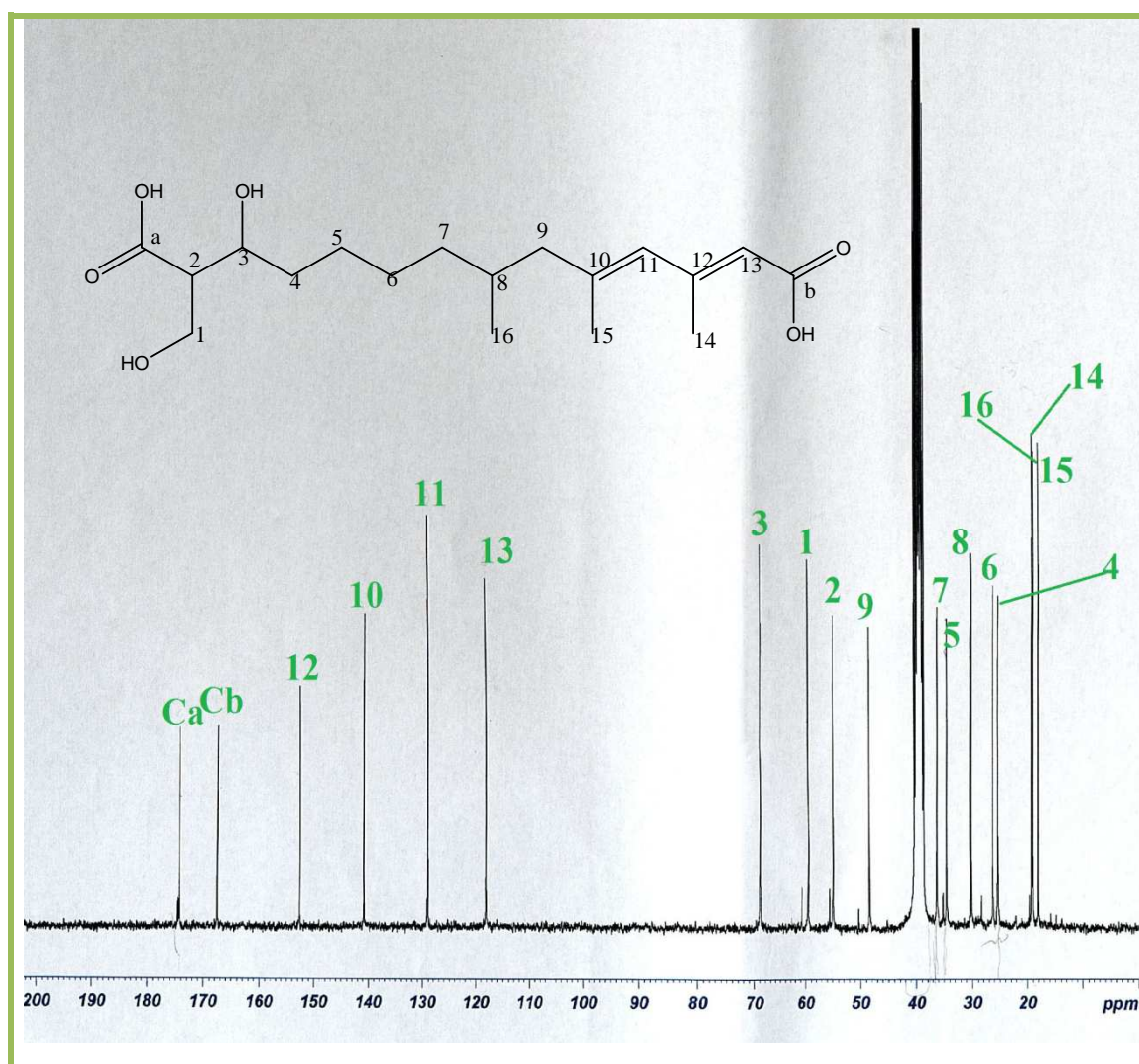
D'après les informations tirées des spectres COSY, HMBC et HMQC nous avons confirmé la connectivité de tous les unités de notre composé ainsi que la stéréo-isomérie Cis entre les protons H-5 et H-7, et entre H-11 et H-13 d'après les corrélations observées sur le spectre ROESY.

**Tableau 21** : Les déplacements chimiques de la RMN<sup>1</sup>H et la RMN<sup>13</sup>C du composé BN5

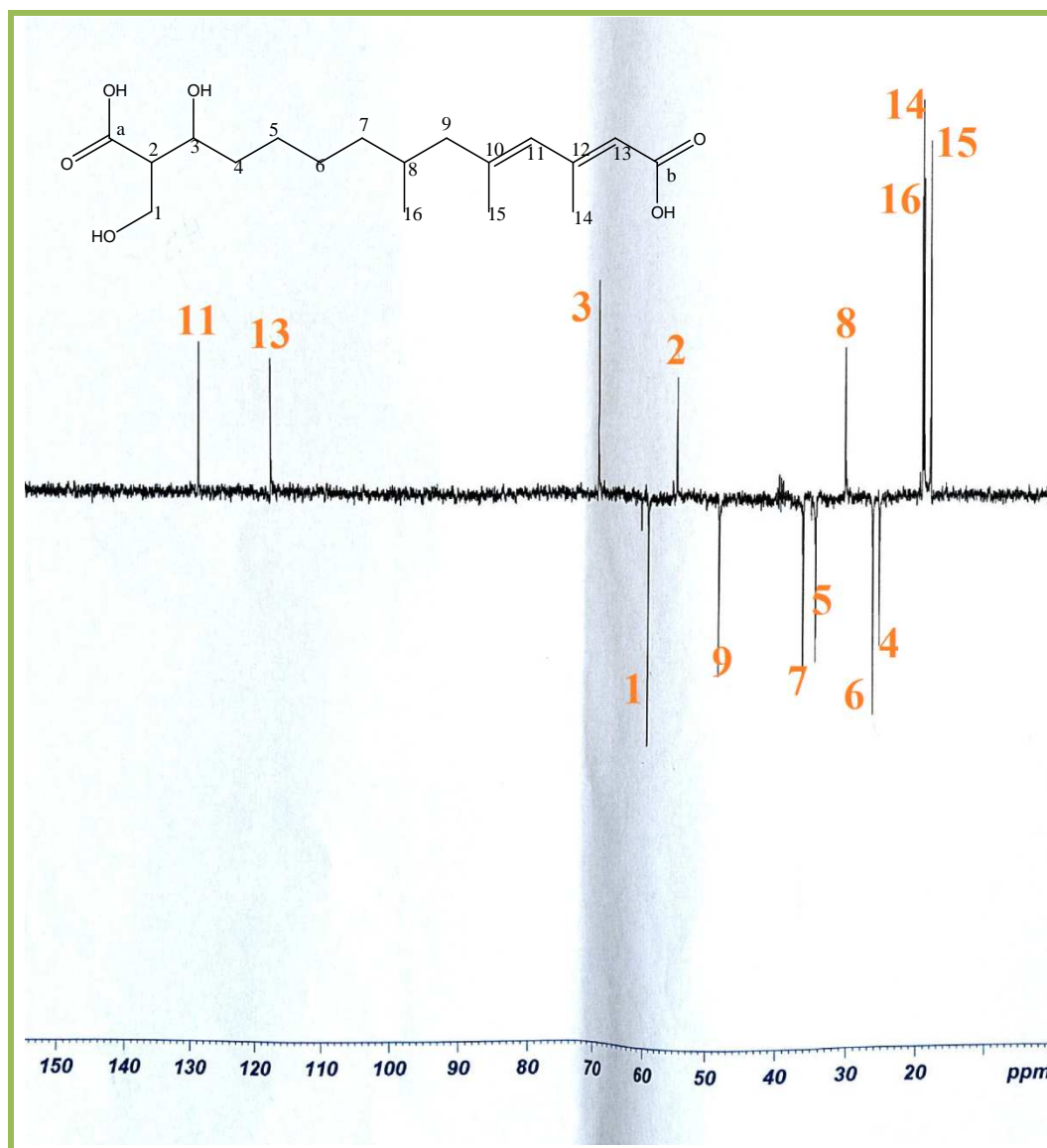
Position	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)
1	59.64	3.52 (dd, $J= 5.44$ 15.84, 2H)
2	54.92	2.39 (m, 1H)
3	68.85	3.57 (dd, $J= 8.25$ 18.76, 1H)
4	25.42	1.30 (m, 2H)
6	26.36	1.26 (m, 2H)
5	34.51	1.39 (m, 2H)
7	38.66	1.06 (m, 2H)
8	30.29	1.63 (m, 1H)
9	48.41	1.82 (dd, $J= 8.24$ 21.55, 1H)
9'	48.41	2.06 (dd, $J= 6.2$ 19.29, 1H)
10	140.80	-
11	129.13	5.72 (s, 1H)
12	152.61	-
13	118.10	5.57 (s, 1H)
16	19.24	0.79 (dd, $J=2.4$ 8.99, 3H)
14	19.06	2.15 (d, $J=1.21$ , 3H)
15	18.10	1.76 (d, $J=1.12$ , 3H)
Ca	174.46	-
Cb	167.63	-



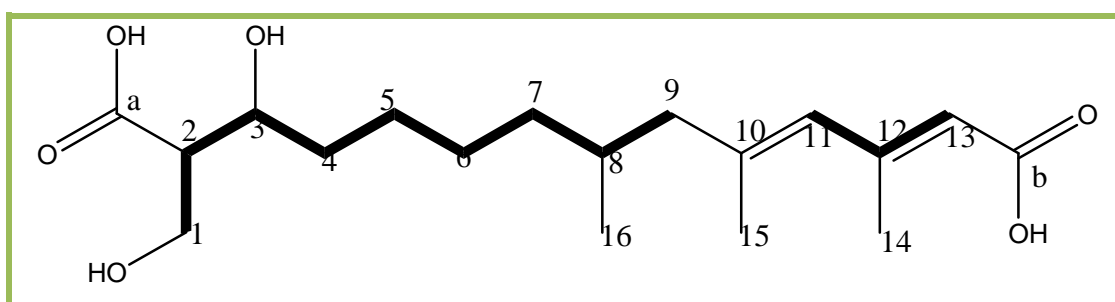
**Figure 54** : Spectre RMN $^1\text{H}$  pour BN5



**Figure 55** : Spectre de la RMN du carbone pour BN5



**Figure 56** : Le spectre RMN 2D : DEPT pour BN5



**Figure 57** : Les corrélations H-H : COSY pour BN5

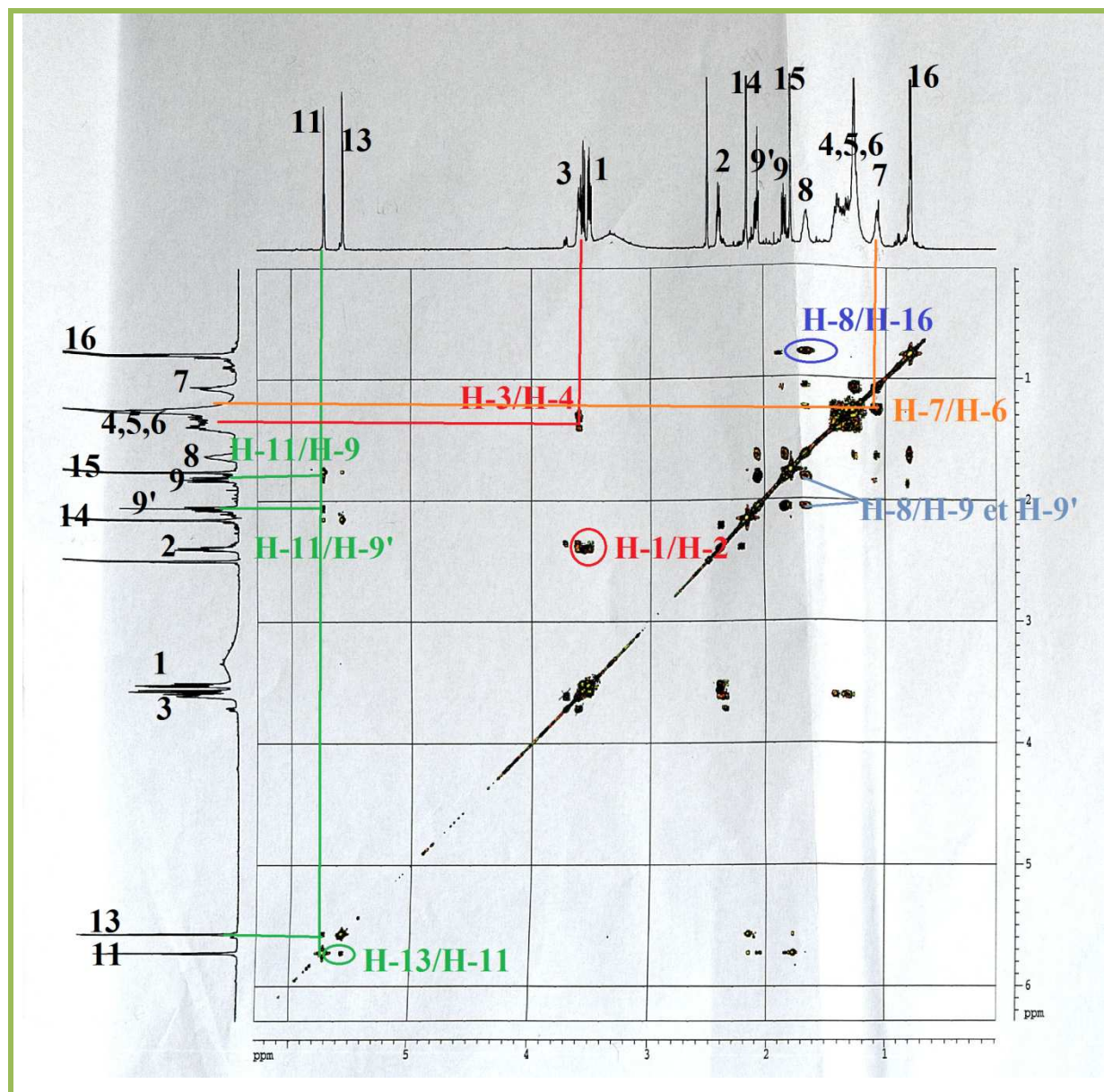


Figure 58 : Le spectre RMN 2D : COSY pour BN5

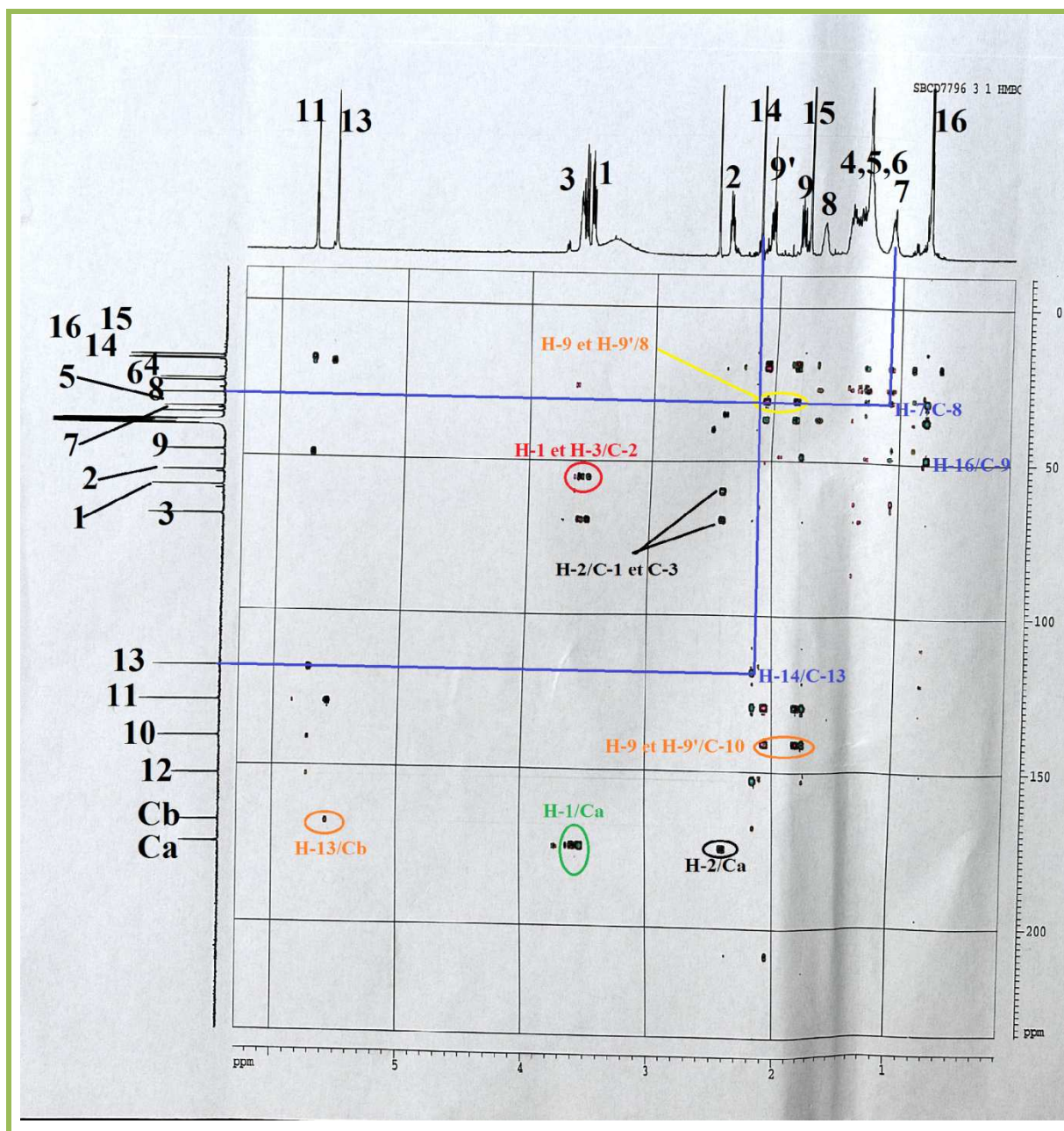
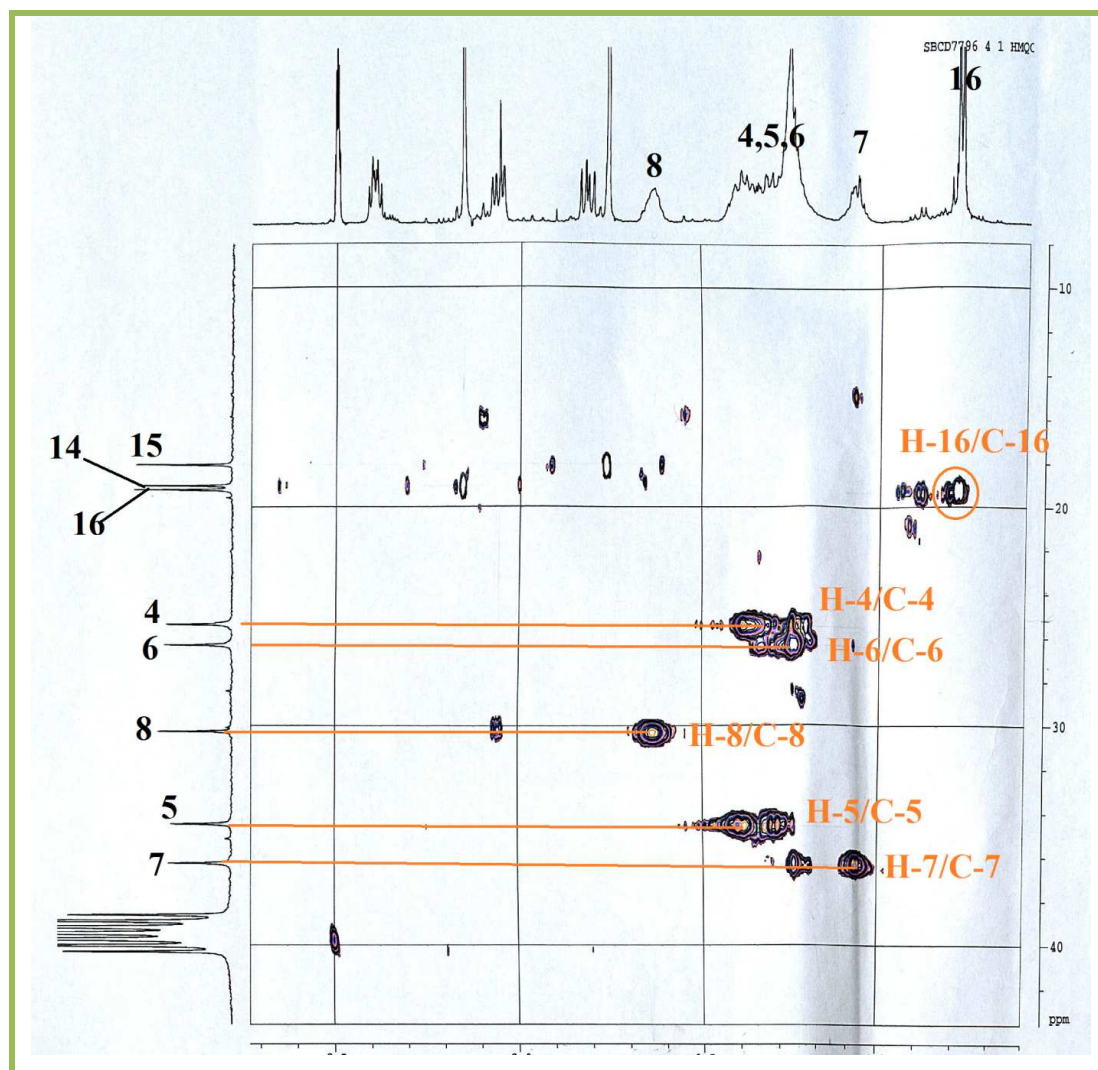
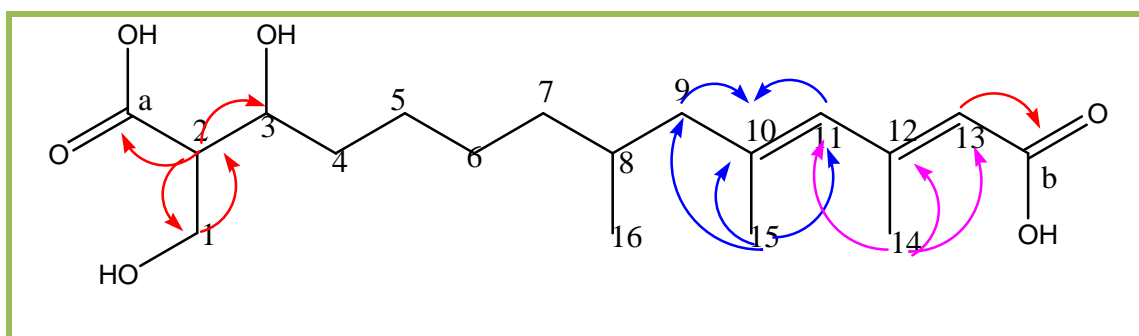


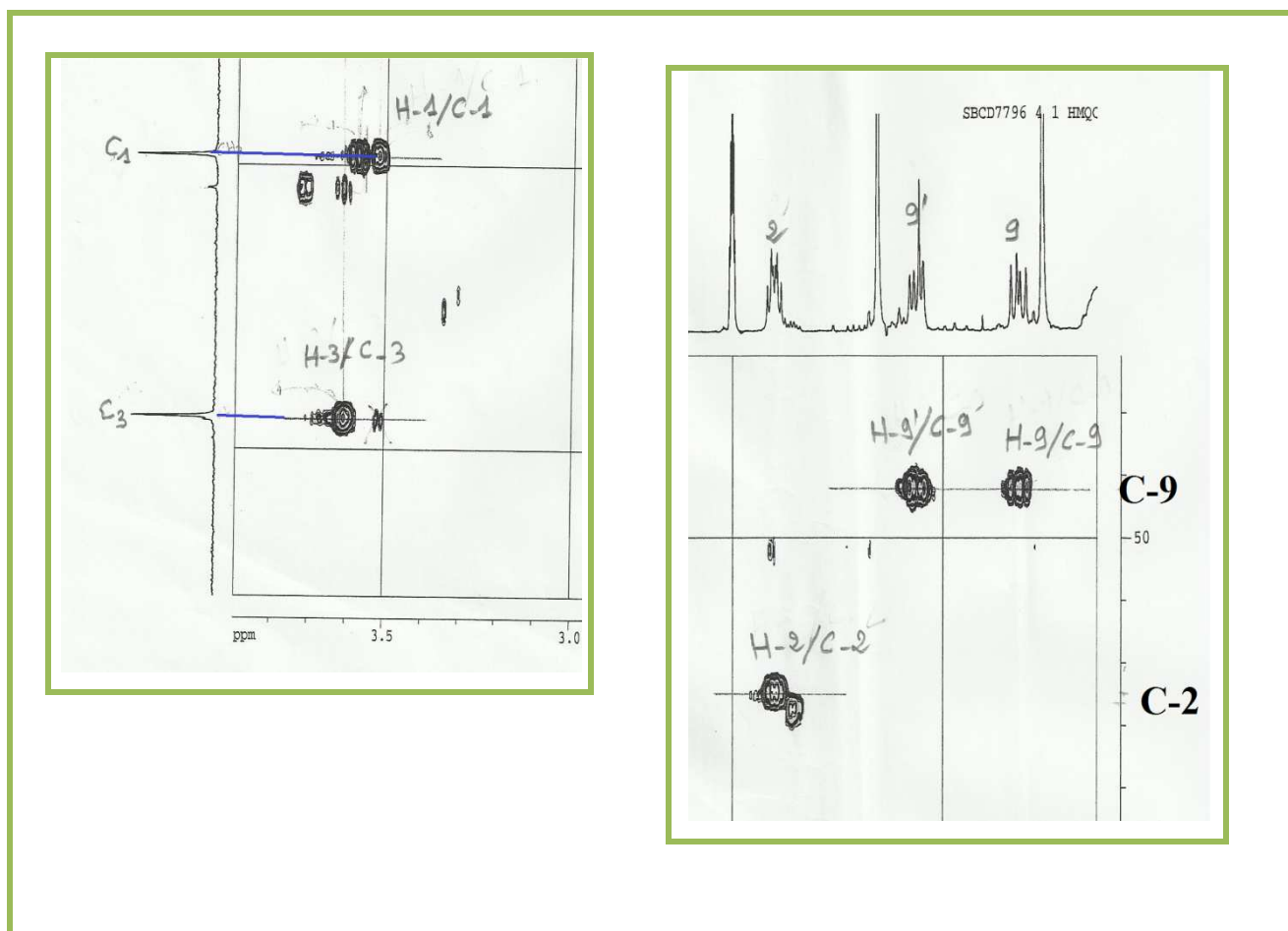
Figure 59 : Le spectre RMN 2D : HMBC pour BN5



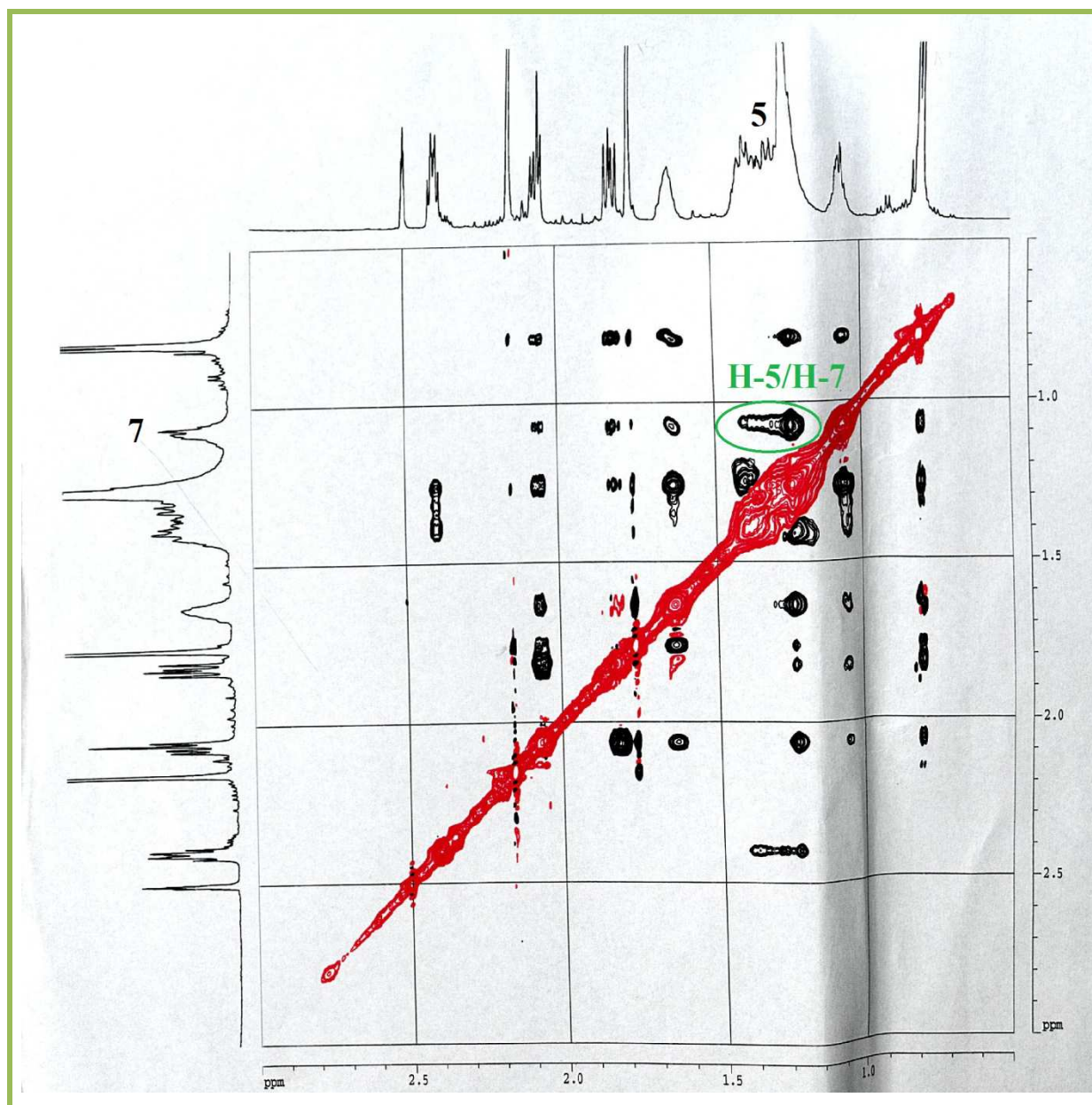
**Figure 60** : Le spectre RMN 2D : HMQC pour BN5



**Figure 61** : Principaux corrélations observés en HMBC pour BN5



**Figure 62** : Extension du spectre HMQC pour BN5 (principales corrélations)



**Figure 63** : Le spectre RMN 2D : ROESY pour BN5

### III. 3. Etude de la cytotoxicité

Les composés isolés ont été testés pour déterminer leur potentiel anticancéreux. La cytotoxicité a été faite in vitro sur la lignée L5178Y des cellules cancéreuses du lymphome de souris.

**Tableau 22** : Pourcentage de la croissance des cellules cancéreuses

Composé testé	Pourcentage de la croissance de L51784Y (Conc 10µg/ml)
Beauvericine	-1.1
Z-Fusapyrone	43.8
L'Indole-3-acétate de méthyle	93
Indole-3-carboxylic acid	96

Nous avons pu constater pour ce test de cytotoxicité que seule le composé Beauvericine isolé du champignon *Fusarium begoniae* a manifesté une activité contre les cellules cancéreuses du lymphome de souris, c'est le composé le plus actif vu sa structure de peptide cyclique. Le Z- Fusapyrone a confirmé une activité cytotoxique faible, par contre les dérivés indoles sont inactifs (la croissance de cellules cancéreuses doit être inférieur à 20 % à la concentration 10 µg/ml).

On signale que la plante marocaine *Aristolochia paucinervis* s'utilise par la population contre le cancer dans la médecine traditionnelle.

## CONCLUSION

Les métabolismes secondaires des plantes aromatiques et médicinales (champignons endophytes) produisent des composés naturels avec une large diversité de structures chimiques qui prouvent des applications convenables dans le domaine de la médecine.

Dans cette partie, nous avons donc isolé des produits naturels à partir des champignons endophytiques des plantes, nous avons élucidé leurs structures à l'aide des méthodes modernes de la RMN et de la spectroscopie de masse ainsi que la détermination de leur potentiel pharmacologique.

Parmi les produits que nous avons isolé le Beauvericine qui possède des propriétés antibiotiques et insecticides [20], et qui a confirmé une activité anticancéreuse qui peut être expliquée par la structure cyclique du peptide et qui peut servir dans le domaine de lutte contre le cancer.

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Strobe G. et al., (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*, *Microbiology*, Vol 142 : 435-440.
- [2]. Varma A., (1999). *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth Promoting Root Endophyte, *Applied and Environment Microbiology*. 65, n° 6 : 2741–2744.
- [3]. Kogel K. H., (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci (PNAS)*, Vol. 102, n° 38 : 13386–13391.
- [4]. Chen X., et al., (2006). “Database of traditional Chinese medicine and its application to studies of mechanism and to prescription validation”, *British Journal of Pharmacology*, Vol. 149 : 1092–103.
- [5]. Morariu A. and Caulet R. P., (2011). Morphine content variation in papaver somniferum L during phenological development, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Iași. *Lucrări științifice*, Vol. 54, n° 1, *seria Agronomie* : 40-43.
- [6]. Orwa C. et al., (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0, World Agroforestry Centre, Kenya: <http://www.worldagroforestry.org>.
- [7]. Melero C. P., Medarde M, and Feliciano A.S, (2000). A Short Review on Cardiotonic Steroids and Their Aminoguanidine Analogues, *Molecules*, Vol 5 : 51-81.
- [8]. Highfield E. S. and Kemper K. J., (1999). White Willow Bark (*Salix alba*), Longwood Herbal Task Force: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>.
- [9]. Newman D. J. and Cragg G. M., (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, *J. Nat. Prod*, Vol 70 : 461-477.
- [10]. Zhang H. W., Song, Y. C., Tan, R. X., (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep*, Vol 23 : 753-771.
- [11]. Kogel K. H., Franken, P., Huckelhoven, R., (2006). Endophyte or parasite--what decides? *Curr Opin Plant Biol*, Vol 9 : 358-363.
- [12]. Jalgaonwala R. E. et al., (2010). Evaluation of Endophytes for their Antimicrobial activity from Indigenous Medicinal Plants belonging to North Maharashtra region India, *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research*, 1(5) : 136-141.
- [13]. Hyde K. D. and Soylong K., (2008). The fungal endophyte dilemma, *Fungal diversity* Vol 33 : 163-173.

- 
- [14]. Debbab A. et al., (2009). Bioactive Metabolites from the Endophytic Fungus *Stemphylium globuliferum* Isolated from *Mentha pulegium*, *J. Nat. Prod.* Vol 72 : 626-631.
- [15]. Ebrahim W., et al., (2012a). Pullularins E and F, two new peptides from the endophytic fungus *Bionectria ochroleuca* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. *Mar Drugs*, 10 (5) : 1081-1091.
- [16]. Kuo Y. C. et al., (2002). Cyclodesipeptide and Dioxomorpholine Derivatives Isolated from the Insect-Body Portion of the Fungus *Cordyceps Cicadae*. *J Chin Med* 13 (4) : 209-219.
- [17]. Yan H. J. et al., (2010). Chemical Constituents of a Marine-Derived Endophytic Fungus *Penicillium commune* G2M, *Molecules*, 15 (5) : 3270-3275.
- [18]. Abdou R., et al., (2010). Botryorhodines A–D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*, 71 (1) : 110-116.
- [19]. Oliveira C. M. et al., (2009). Bioactive metabolites from *Penicillium* Endophytes. *Z. Naturforsch*, Vol 64c : 824-830.
- [20]. Meca G. et al., (2013). Degradation of the minor *Fusarium* mycotoxin *beauvericin* by intracellular enzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Control*, Vol 33 : 352 -358.

## CONCLUSION GENERALE

De tout temps on a utilisé des plantes aromatiques et médicinales avec succès pour se protéger et traiter de nombreuses infections. Cependant, faute de preuve, la communauté scientifique et médicale est aujourd'hui réticente à utiliser ces plantes. Il semble que trois mille ans (et plus) d'usage ne sont pas assez éloquentes.

Le monde scientifique est en train de redécouvrir et de valider le savoir traditionnel des plantes médicinales étant donné la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse ainsi que la résistance de certains germes microbiens face aux médicaments existants. L'utilisation des plantes aromatiques et médicinales qui contiennent des composés bioactifs est en progression. En effet compte tenu de leur meilleure biocompatibilité on observe une demande croissante de produits d'origine naturelle. C'est dans ce contexte que se situe l'objet de notre travail et qui porte sur l'évaluation de l'activité biologique de quelques plantes médicinales marocaines afin de s'en servir et ceci dans divers domaines : environnemental, médical et scientifique.

Dans le premier chapitre nous nous sommes focalisés sur l'étude de trois espèces de menthes : *Mentha pulegium*, *Mentha suaveolens* et *Mentha piperita*, nous avons préparé les huiles essentielles de ces plantes puis nous avons déterminé leur composition chimique par CPG et par CPG-SM, nous avons par la suite testé l'effet de ces huiles essentielles sur deux espèces de Coléoptères ravageurs des denrées alimentaires stockées : *Sytophilus oryzea* et *Rhisopertha dominica* qui causent des dommages économiques importants surtout sur les grains stockées. L'objet de cette étude est de pouvoir contribuer à la mise au point des insecticides à base naturelle appelés Bioinsecticides.

Cette étude a permis de déterminer que le produit majoritaire de *Metha pulegium* est la pulégone, de *Mentha suaveolens* est la piperitenone et pour *Mentha piperita* c'est le linalol. On peut conclure aussi à partir de cette étude, que ce sont les huiles essentielles de *M. pulegium* et de *M. suaveolens* qui ont un effet insecticide intéressant.

Le deuxième chapitre a traité l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et des extraits de la plante marocaine *Cistus ladaniferus* connue par sa richesse en polyphénols qui ont un large spectre d'inhibition contre la croissance bactérienne et ceci pour les Gram positives et les Gram négatives. L'étude de *Cistus ladaniferus* nous a permis de conclure que

l'huile essentielle et les extraits ont une forte activité antibactérienne sur les 14 souches testées.

Nous avons réalisé aussi l'étude de l'activité antioxydante des extraits par divers solvants organiques de *Cistus ladaniferus*, les tests de l'activité antioxydante de cette plante se sont avérés intéressants puisque la plante a montré un pouvoir antioxydant élevé, les résultats ont montré que l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique ont le pouvoir antioxydant le plus intéressant.

Vu que beaucoup de champignons endophytiques synthétisent des produits avec une large diversité de structures chimiques qui sont souhaitées pour des applications spéciales dans le domaine médicale ou agrochimie, nous avons consacré la troisième partie à l'isolement de métabolites secondaires des champignons endophytiques de la plante marocaine *Aristolochia paucinervis*, et à leur purification par les méthodes chromatographiques fiables. Nous avons ensuite élucidé les structures chimiques à l'aide des méthodes d'analyse modernes à savoir la spectrométrie de masse utilisant différents modes d'ionisation et la résonance magnétique nucléaire à 1D et à 2D qui constituent des méthodes robustes tout à fait adaptées à l'analyse des métabolites secondaires. Enfin nous avons testé l'activité cytotoxique des produits isolés.

Les résultats obtenus montrent qu'à partir du champignon *Fusarium begoniae* extrait de la plante marocaine *Aristolochia paucinervis*, nous avons isolé cinq produits naturels : Le Beauvericine, le Z-Fusapyrone, l'Indole-3-acétate de méthyle, l'Indole -3-acide carboxylique et L'Acide 1,2-Hydroxy-13-(hydroxyméthyl)-3,5,7-triméthyl-2,4-tétradécadiène-1,14-dioïque. Les structures de tous ces produits ont été élucidées par les différentes méthodes spectroscopiques.

L'étude de la cytotoxicité des produits obtenus montre que c'est le Beauvericine qui a une activité anticancéreuse.

## RESUME

Actuellement plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire ou sanitaire. La migration vers les produits d'origine naturelle constitue un refuge pour les chercheurs vu leurs avantages incessants. Les plantes aromatiques et médicinales se considèrent comme une richesse abondante de ces produits naturels à propriétés biologiques importantes.

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à déterminer la composition chimique et à évaluer l'activité insecticide de l'huile essentielle de trois espèces de menthes : *Mentha pulegium*, *Mentha suaveolens* et *Mentha piperita*.

Dans un deuxième volet nous avons testé l'activité antibactérienne et antioxydante des produits extraits (huile essentielle, extrait avec solvants organiques à polarité croissante) de *Cistus ladaniferus* plante médicinale très utilisée par la population marocaine et très peu étudiée.

La troisième partie nous l'avons consacré à l'isolement des métabolites secondaires du champignon endophytique *Fusarium begoniae* extrait de la plante marocaine *Aristolochia paucinervis*. Ces métabolites ont été séparés et purifiés par les différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques afin d'élucider leurs structures chimiques. Nous avons aussi testé l'activité anticancéreuse de ces produits isolés vis-à-vis des cellules cancéreuses du lymphome des souris.

Les résultats obtenus ont montré une cohérence entre la composition chimique des plantes aromatiques et médicinales marocaines étudiées qui sont riches en produits naturels et l'activité étudiée ce qui permet de conclure que les PAM étudiées ont un potentiel chimique et biologique important qui leur permettrait d'être exploitées dans des différents domaines : agricole, industriel et pharmaceutique.

**Mots clés** : Plante médicinale ; Huile essentielle ; Bioinsecticide ; Coléoptères ; Pouvoir antibactérien ; DPPH ; Champignons endophytiques ; CPG/SM ; RMN <sup>13</sup>C ; Cytotoxicité.

## ABSTRACT

Nowadays several questions are raised about the safety of chemicals compounds used in medicine and food or health industry. The Migration to natural products is a haven for researchers because they have incessant benefits.

Aromatic and medicinal plants count as richness of these natural products with important biological properties.

In the present work we are interested at determination of chemical composition and to evaluate the insecticidal activity of the essential oil of three species of mints: *Mentha pulegium*, *Mentha suaveolens* and *Mentha piperita*.

In a second part we tested the antibacterial and antioxidant activity of some extracts products (essential oil, extracted with different organic solvents) from *Cistus ladaniferus* medicinal plant widely used by the Moroccan population and little studied.

The third component we have devoted to the extraction of secondary metabolites from endophytic fungus *Fusarium begoniae* isolated from *Aristolochia paucinervis*, we separated and purified by various chromatographic and spectroscopic techniques to elucidate their chemical structures, and finally we tested anti-cancer activity of pure compounds isolated against tumor cells of mouse lymphoma.

The results showed the consistency between the rich chemical composition of the extracts produced from Moroccan medicinal plants and the studied activity.

**Keywords :** Medicinal plant ; Essential oil ; Bioinsecticide ; Coleopterae ; Antibacterial activity ; DPPH ; Endophyts fungus ; CPG/SM ; NMR <sup>13</sup>C ; Cytotoxicity.