

Année Universitaire : 2010-2011

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et
Techniques

Etude phytochimique de *l'Ammi visnaga* et *l'Ammi majus*

Présenté par:

Ouedrhiri Wessal

Encadré par:

- Pr H. GRECHE

-Pr M. ELASRI

Soutenu Le 23 Juin 2011 devant le jury composé de:

- **Mr. H. GRECHEFST-Fés**
- **Mr. M. ELASRI FST-Fés**
- **Mr. A. BOULAHNA FST-Fés**
- **Mme. H.TOUZANI FST-Fés**
- **Mr H. ZAITAN FST-Fés**

Stage effectué à : l'Institut nationale des plantes médicinales et aromatiques

Introduction

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: Ouedrhiri wessal

Année Universitaire : 2010/2011

Titre: étude phytochimique de *l'Ammi visnaga* et *l'Ammi majus*

Résumé

Ce projet a été consacré à l'étude phytochimique de deux plantes épiphytiques marocaines, *l'Ammi visnaga* (5.8% d'humidité 9.6% de la matière minérale 94% de la matière organique), et *l'Ammi majus*, (9.8% d'humidité 12.4% de la matière minérale 87.6% de la matière organique).

Les extraits éthanoliques des deux plantes préparés au soxhlet sont passés par la chromatographie liquide sur colonne de gel de silice où on a pu isoler le 4H-Furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-2,2,3,3-tetraméthyl, le Myristicin, tout en passant par des techniques d'analyses comme la CCM et la CPG/SM.

Une activité antioxydante a été détectée chez *l'Ammi visnaga* en son extrait éthanolique (84.91% à 250µg/ml).

Révélation d'activité antibactérienne dans *l'Ammi visnaga* contre les *Micrococcus luteus* équivalente à celle de l'antibiotique.



Dédicace

*Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici
toute ma gratitude pour leur soutien tout au long
de mes études. A ma sœur et mon frère, toute
ma famille et tous mes amis
et mes collègues*

Remerciements

Le travail présenté a été effectué au sein du laboratoire contrôle de qualité de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate ,sous l'encadrement des professeurs : Pr. Hassane GRECHE , Pr Mohammed ELASRI . Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude et mes vifs remerciements d'avoir accepté de m'encadrer durant ce travail. Leur soutien scientifique, leurs remarques et critiques, leur modestie m'ont aidé à mener à bien ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Monsieur Abderrahim SAIDI l'Ingénieur en Technologie des matières organiques, l'Ingénieur Mryem Elboudkhili pour leur aide et leur disponibilité durant ce travail.

Introduction

Je tiens à remercier Monsieur Pr. **OUAZZANI CHAHDI Fouad**, responsable du master « Chimie des molécules bioactives » pour m'avoir autorisé à m'inscrire dans ce master afin de suivre mes études. Je tiens aussi à remercier tous les enseignants de la formation pour les efforts précieux et considérables qu'ils ont accomplis pour assurer notre formation universitaire.

Mes remerciements vont aussi, à Pr. **A. BOULAHNA**, à Pr. **H.TOUZANI** et à **H. ZAITAN** qui ont bien voulu accepter de juger ce mémoire et d'examiner ce travail de recherche. Je leur exprime mes très vifs remerciements et mon profond respect.

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui m'ont apporté leurs savoirs faire, leurs aides techniques, leurs expériences, nécessaires pour la réalisation et le développement de ce travail. Enfin je tiens à remercier toutes les personnes intéressées par mon travail et tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près, à réaliser ce travail.

La plupart des populations des pays en voie de développement ont recourt presque exclusivement à la médecine traditionnelle pour ses besoins de santé primaire. Hors que la multiplicité des composés dans les plantes leurs confère un effet thérapeutique aussi qu'un effet nuisible.

Introduction

La mise en évidence de chaque substance est rendu possible par l'étude phytochimique qui fait appel à plusieurs méthodes de séparation de purification et d'analyse et vise à identifier les groupes de constituants chimiques présentant un intérêt pharmacologique, en l'occurrence les stérols, les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les composés quinoniques, les saponosides et les alcaloïdes.

L'institut national des plantes médicinales et aromatiques est une plateforme qui assure le développement de cette étude par le traitement de plusieurs plantes en se basant sur leur effet curatif.

Ce travail a été consacré pour l'étude de deux plantes épidémiques marocaines, *l'Ammi visnaga* et *l'Ammi majus* qui présentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et qui possèdent un très large éventail d'activités biologiques :antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire.

Ce rapport comprendra donc 3 chapitres :

Le premier Chapitre propose une mise au point bibliographique sur les méthodes d'extraction, les techniques d'analyses moléculaires, l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne, et une introduction au règne végétale présentant les plantes étudiées.

Le deuxième Chapitre rassemble le matériel et les méthodes exploités.

Enfin, dans le troisième et le dernier Chapitre nous nous consacrerons à la discussion des résultats obtenus.

I- Description des plantes étudiées

1-*Ammi visnaga* :

1.1 Classification botanique ou taxonomique :

Organes reproducteurs :

- Type d'inflorescence : ombelle d'ombellules
- Répartition des sexes : hermaphrodite
- Type de pollinisation : entomogame
- Période de floraison : juillet à septembre

Graine:

- Type de fruit : akène
- Mode de dissémination : barochore

Habitat et répartition :

- Habitat type : friches annuelles, nitrophiles, thermophiles, estivales, mésohydriques
- Aire de répartition: méditerranéenne

<u>Règne</u>	<u><i>Plantae</i></u>
<u>Division</u>	<u><i>Magnoliophyta</i></u>
<u>Classe</u>	<u><i>Magnoliopsida</i></u>
<u>Ordre</u>	<u><i>Apiales</i></u>
<u>Famille</u>	<u><i>Apiaceae</i></u>
<u>Genre</u>	<u><i>Ammi</i></u>



Figure 1: Echantillon de *A. visnaga*

1.2 Utilisations médicinales traditionnelles

L'Ammi visnaga a été utilisée pour le traitement de divers pathologies dont on cite : Les calculs rénaux ; L'asthme ; Bronchite, Lithontripique (médicaments qu'on

a crus propres à dissoudre la Pierre dans la vessie . Diurétique, Coqueluche (une infection respiratoire bactérienne peu ou pas fébrile de l'arbre respiratoire inférieur)
 Les problèmes circulatoires, Vasodilatation des vaisseaux sanguins, et la congestion de la glande prostate

1.3 Action pharmacologique et toxicité

L'Ammi visnaga a effet spasmolytique sur la musculature des bronches, les intestins, les voies biliaires, le coronaire navire, comme il permet d'entraîner les urines grâce à son effet diurétique.

La Khelline qui est un des principe actif de *l'Ammi visnaga* permet le traitement de l'insuffisance coronarienne, l'angine de la poitrine, des bronches, l'asthme, le psoriasis, aussi la suppression de petite calculs rénaux.[1]

L'extrait de *l'Ammi visnaga* aussi a un effet sur la corrosion de l'acier SX 316 dans une solution acide par formation de complexe de fer khellin.[2]

1.4Composition chimique :

L'*A. visnaga* renferme plusieurs familles chimiques marquantes [3], on cite :

Furanochromones :2-4%(khellin 0.3-1.2 ; visnagin 0.05-0.3) Le khellol et ses glucosides ,Le khellenin ,Le khellinol ,L'ammiol et ses glucosides ,Le visammiol
 Le khellinone ,visnaginone

Pyranocoumarines : (visnagans) :0.2-0.5% composé de visnadin, samidin et dhydrosamidin.

Furanocoumarines : traces de xanthotoxine et ammoidin

Flavonoïdes : 0.02-0.03% composé de quercetine ,isorhamnetin et ses trisulfates

Volatiles : camphor, carvone, terpineol, terpinen-4-ol, linalol, cis et trans les oxyde de linalol

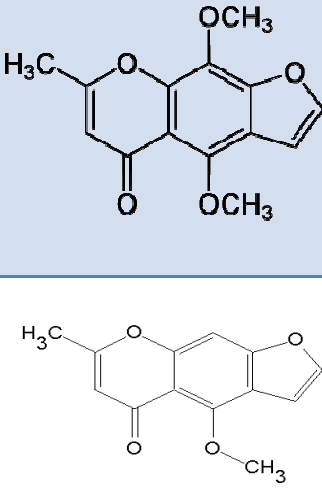
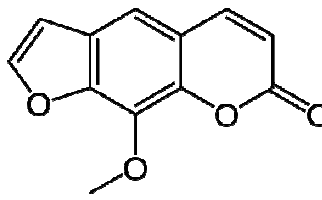
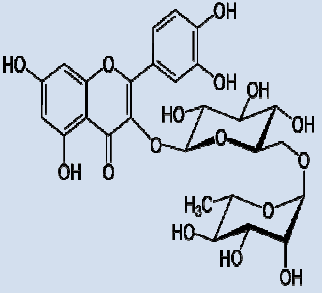
Protéines: 14%

Le tableau : 2 présente les molécules à effet pharmacologique intéressant [3].

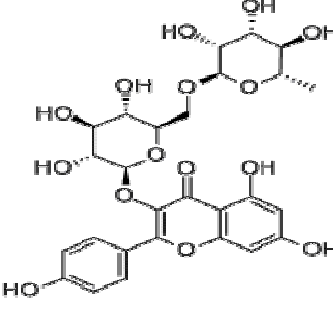
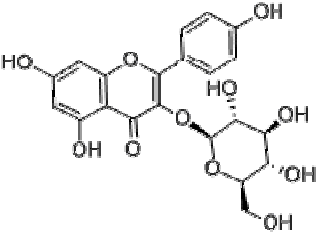
Tableau 1:composition chimique de l'Ammi visnaga

La famille chimique	Définition	Type de composé	Les molécules

Bibliographie

<p>Furanochromones (Coumarine)</p>	<p>La coumarine est une substance naturelle <u>organique aromatique</u> connue dans la nomenclature internationale comme 2H-1-benzopyrane-2-one</p>	<p>1) Khellin 2) Visnagin</p>	
<p>Pyranocoumarines</p>	<p>Ils sont le résultat de la fusion d'une coumarine et d'un noyau de pyrane</p>	<p>3) Visnadin</p>	
<p>Furanocoumarines</p>	<p>Sont des agents <u>toxiques photosensibles</u>. Ils sont le résultat de la fusion d'une coumarine et d'un noyau de furane.</p>	<p>4) xanthoxine ou ammoidin</p>	
<p>Flavonoïdes sulfates</p>	<p>Dérivés de flavonoïdes</p>	<p>quercitrine3-rutinosides</p>	

Bibliographie

		kaempferol 3- rutinosides	
		quercitrine 3- glucosides	
		kaempferol 3- glucosides	

2-*Ammi majus* :

2.1 Classification botanique ou taxonomique :

Organes reproducteurs :

- Type d'inflorescence : ombelle d'ombellules
- Répartition des sexes : hermaphrodite
- Type de pollinisation : entomogame
- Période de floraison : juillet à septembre

Graine :

- Type de fruit : akène
- Mode de dissémination : barochore

Habitat et répartition :

Bibliographie

- Habitat type : annuelles commensales des cultures acidophiles
- Aire de répartition : méditerranéen

<u>Règne</u>	<i>Plantae</i>
<u>Division</u>	<i>Magnoliophyta</i>
<u>Classe</u>	<i>Magnoliopsida</i>
<u>Ordre</u>	<i>Apiales</i>
<u>Famille</u>	<i>Apiaceae</i>
<u>Genre</u>	<i>Ammi</i>



Figure 2: échantillon de l'*Ammi majus*

2.2

Utilisations médicinales traditionnelles

L'*Ammi majus* est l'une des plus importantes plantes en Egypte, et il existe une industrie pour l'isolement de ses principes actifs. Les végétaux cultivés localement en Egypte sont utilisés en médecine traditionnelle pour la production de xanthotoxine, la drogue la plus puissante pour le traitement de leucodermie (vitiligo) qui est l'un des médicaments les plus importants économiquement de l'Egypte. [4]

2.3 Action pharmacologique et toxicité

La grande teneur en coumarine de l'*Ammi majus* est toxique pour les bovins et les ovins. Il se retrouve souvent sous forme de contaminant dans les fruits d'*Ammi visnaga* qui sont de plus généralisé à l'usage thérapeutique.

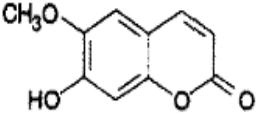
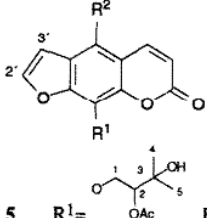
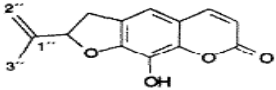
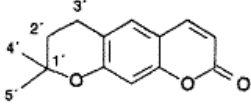
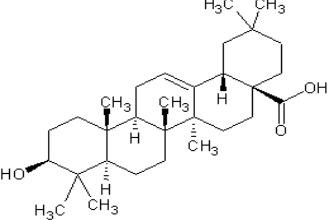
2.4 Composition chimique

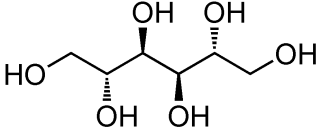
Le tableau 2 rassemble les molécules les plus marquantes de l'*Ammi majus* [5]

Tableau 2: Composition de l'*Ammi majus*

La famille chimique	Définition	Type de composé	Les molécules
Glucoside	un <u>hétéroside</u> dérivé du <u>glucose</u> .	1) Isoarnottinin 2) 7-O-B-D-glucoside de isoarnottinin 3) 4'-O-B-D-glucoside de isoarnottinin	<p> 1 R¹ = H, R² = H 2 R¹ = β-D-glucosyl, R² = H 3 R¹ = H, R² = β-D-glucosyl </p>

Bibliographie

<p>Coumarine</p>		<p>scopoletine</p>	
<p>Psoralène(furanocoumarine)</p>	<p>Le psoralène est un composé chimique naturel de la famille des <u>furocoumarines</u>. Sa structure est donc celle des <u>coumarines</u> à laquelle est fusionné un cycle de <u>furane</u></p>	<p>5) 8-(2''-acetoxy-3''-hydroxy-3''-methylbutoxy)psoralène 6) 5methoxy-8-hydroxypsoralène</p>	 <p>5 R¹= , R² = H 6 R¹= OH, R² = OCH₃</p>
		<p>7) apiumetin</p>	 <p style="text-align: center;">7</p>
		<p>8) dihydroxanthyletin</p>	 <p style="text-align: center;">8</p>
<p>Acide gras</p>		<p>11) acide oleanolique</p>	

Alcool		12) mannitol	
---------------	--	--------------	-------------------------------------------------------------------------------------

II-Extraction liquide solide:

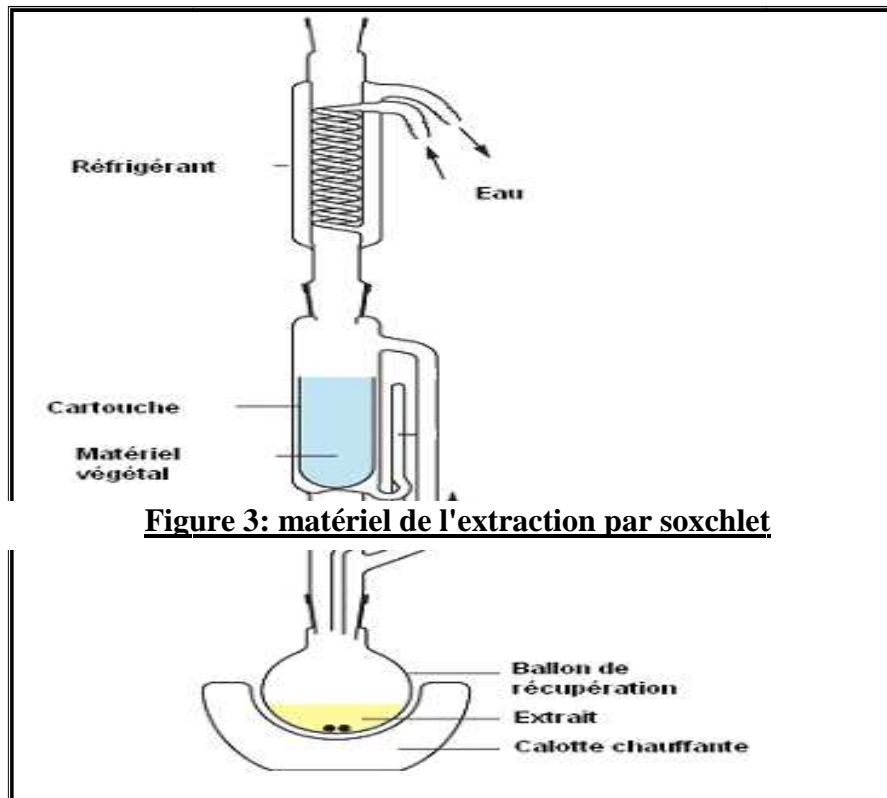
Principe :

Le principe de la méthode d'extraction liquide solide consiste à mettre en contact le matériel végétal et un solvant capable d'entraîner les substances cristallines ou liquides dénommées soluté ; ce qui génère une solution ou un extrait (solvant+soluté).

Les opérations d'extraction solide-liquide regroupent plusieurs méthodes différentes en vue de faire interagir le solvant sur le matériel végétal et dissoudre ses composés solubles.

1. **La percolation** : consiste à laisser couler un solvant (généralement très chaud) sur un lit de solide finement broyé. La préparation du café relève de cette opération.
2. **La décoction** : est l'opération dans laquelle le solide est plongé dans le solvant liquide mis en ébullition. Il s'agit d'une opération brutale qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et parfois indispensable.
3. **L'infusion** : est une opération similaire à celle de la décoction mais durant laquelle le solvant est chauffé sans être mis en ébullition, suivie du refroidissement du mélange. La préparation du thé est l'exemple type de cette opération.
4. **La macération** : est une immersion du solide dans un solvant à froid. L'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles.
5. **La digestion** : est une macération à chaud. La digestion et la macération sont utilisées particulièrement en pharmacie et en parfumerie. Il s'agit là d'une opération plus rapide que la précédente, ne posant généralement aucun problème de conservation ni de contamination bactérienne.
6. **L'élution [séparation](#)** de deux substances adsorbées par un fluide.
7. **Extraction par soxhlet : (la méthode utilisée)** : L'extraction par soxhlet est une extraction lente mais elle a l'avantage d'être complète. L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide liquide. Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est porté à ébullition et la

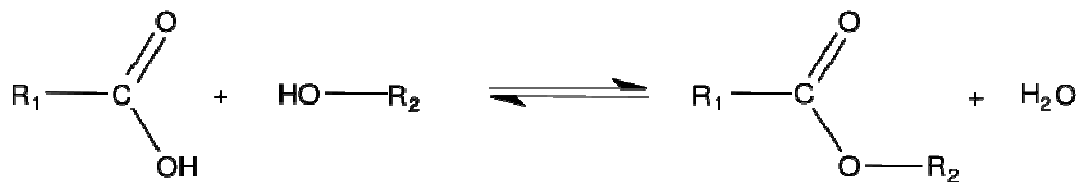
fraction condensée au niveau du condenseur se met en contact, par simple effet de gravitation, avec le matériel solide à extraire. Ce dernier se trouve dans une cartouche de papier épais dans le réservoir à siphon. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure toute la période de remplissage du réservoir, puis quand le solvant atteint le niveau maximal, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant les substances dissoutes. Le cycle se répète jusqu'à la décoloration du solvant au niveau du réservoir à siphon.



III -

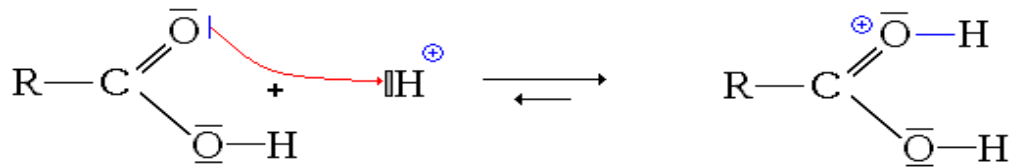
Estérification :

Réaction au cours de laquelle un groupe alcool (-OH) est condensé à un groupe acide carboxylique (-COOH) avec élimination d'une molécule d'eau (H₂O), ce qui forme une liaison ester (-COOC-).

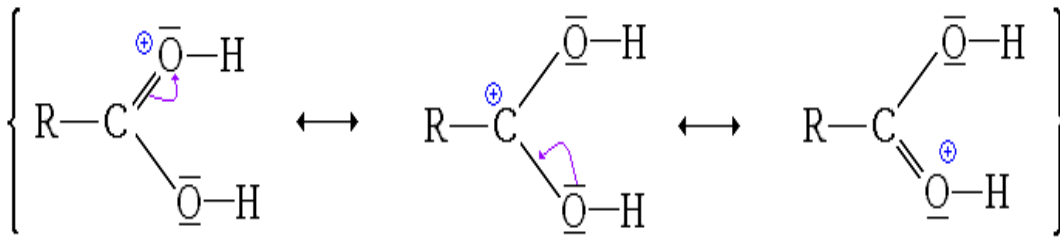


Mécanisme de l'estérification :

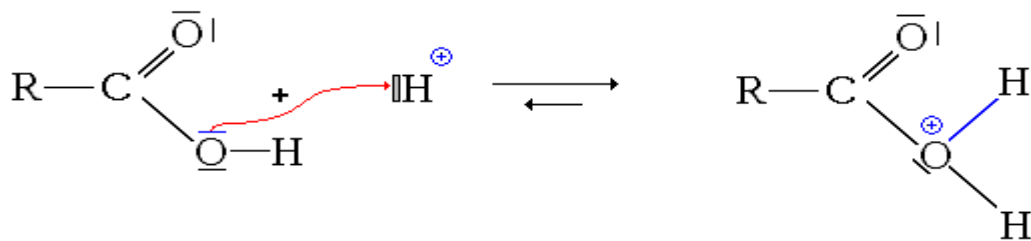
- Protonation du groupe carbonyle



- Ici, l'ion formé est stabilisé par mésomérie :



- Protonation du groupe hydroxyle



IV-L'activité antioxydante :

1-généralités sur l'effet antioxydant

L'effet antioxydant d'un produit est son pouvoir d'éliminer toute source d'agression pour l'organisme provoquée par des dérivés d'oxygène.

En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène comme l'oxygène singulet O, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, le radical superoxyde O₂, les peroxydes alkyles ROOH, et les radicaux hydroxyles HO, peroxydes ROO et alkoxydes RO; peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition; et provoquent avant d'être neutralisés des lésions sur tous les éléments qu'ils côtoient.[6]

2-Antioxydants :

Un antioxydant se définit comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat. [7]

Une source particulière d'antioxydants naturels: la plante

- Les flavonoïdes
- Les xanthones
- Les coumarines
- Les caroténoïdes
- Dérivés d'acides phénoliques et divers composés phénoliques
- Les tanins
- Les lignanes

3-Méthode d'étude des antioxydants

- *Tests les moins fréquemment cités dans la littérature*
Le β -carotène comme indicateur d'oxydation

Le β -carotène (figure 2) est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation. L'absorbance du β -carotène est mesurée à 470 nm avec et sans antioxydant (3).

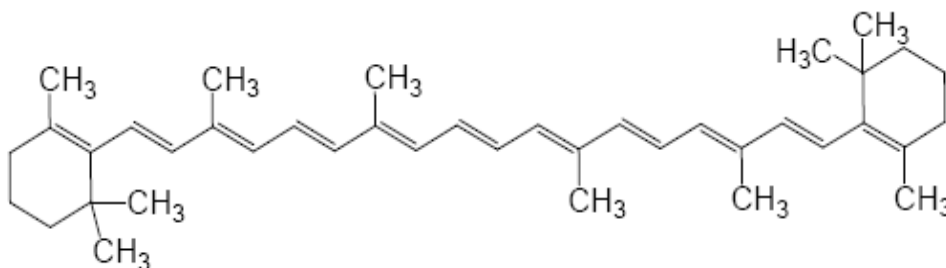


Figure 4: structure du bêta carotène

Dosage des TBARS

Ce test dose les TBARS, "thiobarbituric acid reactive substances". Il permet de quantifier la peroxydation lipidique, dans le plasma, dans les aliments, en mesurant la libération du malondialdéhyde, MDA (figure 3), un des produits majeurs de dégradation des lipides [8].

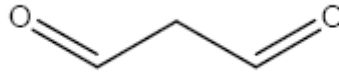


Figure 5: Structure du malondialdéhyde MDA

➤ *Tests les plus utilisés*

Test de réduction du radical-cation $ABTS^{+\circ}$ ou TEAC

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation $ABTS^{+\circ}$, acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (figure 4), qui présente une bande d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm. Le radical est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le dioxyde de manganèse (MnO_2) [9], la metmyoglobine, le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) ou le persulfate de potassium. Le composé à tester est ajouté au radical pré-formé et, 1 minute après, l'absorbance résiduelle du radical $ABTS^{+\circ}$ est mesurée à 734 nm. L'activité des composés est alors exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1 mM du composé testé. Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace.[10]

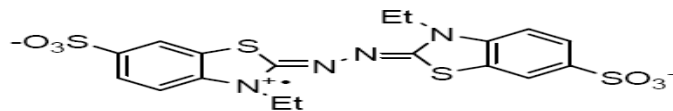


Figure 6: structure du radicale-cation $ABTS^{+\circ}$

Test de capture des radicaux peroxydes : TRAP et ORAC

L'AAPH, 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure, est un générateur hydrophile de radicaux libres (figure). Deux tests utilisent l'AAPH : TRAP et ORAC.

-le test **TRAP (total radical trapping antioxidant potential)**, l'AAPH est solubilisé en milieu aqueux avec l'antioxydant et un indicateur qui devient luminescent lorsqu'il est oxydé à 37°C, comme le luminol. La capacité des antioxydants à bloquer l'oxydation de l'indicateur est comparée à celle du Trolox donnant une valeur TRAP. Ce test est utilisé pour déterminer la capacité antioxydante du plasma et du sérum sanguin [11].

-Le test **ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)** est applicable aux solutions biologiques comme le plasma sanguin et des extraits de fruits et légumes [12].

- La révélation de l'activité antioxydant pour les extraits méthanoliques des plantes étudiées et faite grâce à un spectromètre suivant la réaction de la réduction de **diphényl picryl-hydrayl**.



Figure 8: photo décrit le changement de la couleur du DPPH

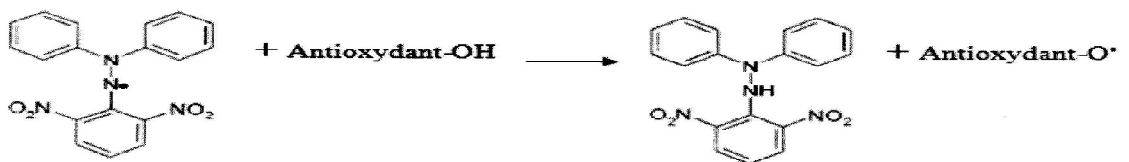


Figure 9: la réaction de réduction du DPPH par un antioxydant

V -

Techniques de purification et d'analyse moléculaire

1-Chromatographie

La chromatographie est une technique analytique qui permet de séparer les constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. On distingue deux types de chromatographie: sur colonne et planaire.

1.1 Pour la chromatographie sur colonne :

- Une colonne est remplie avec une phase stationnaire ou fixe.
- Une phase mobile, ou solvant organique (ou mélange de solvants) ou éluant, est introduite au sommet de la colonne et entraîne les constituants (ou solutés) du mélange.
- Le solvant entraîne les molécules de solutés. Il existe une série de transferts entre les 2 phases.
- Les constituants du mélange migrent avec des vitesses différentes. Ils sont élués (déplacés) et recueillis séparément

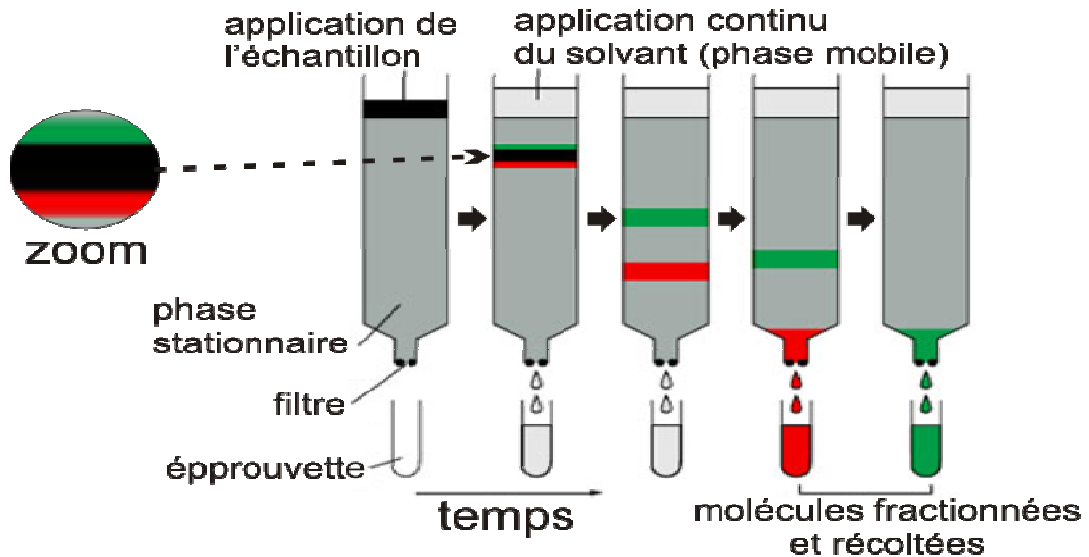


Figure 10: schéma de la purification par chromatographie sur colonne

1.2-Pour la chromatographie planaire :

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.

Après avoir déposé l'échantillon sur la plaque et la placée dans une cuve étanche remplie avec quelques millilitres du solvant, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, et chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant.

Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

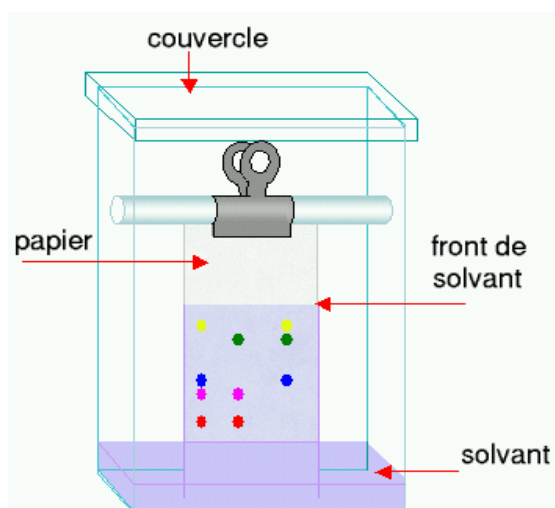


Figure 11: schéma de la CCM

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes : absorption UV, fluorescence, iode, atomisation par des solutions de réactifs spécifiques.

Il existe de nombreux types de chromatographie ; on peut notamment les classer selon les interactions développées par la phase stationnaire et aussi suivant la nature de la phase mobile.

La phase stationnaire

Tableau 3: les principe de séparation en chromatographie

Phase stationnaire	principe de séparation	caractéristiques de la phase stationnaire	principe de la fixation et de l'élution
Liquide	partage	liquide fixé sur un support inerte (papier, silice...)	distribution des composants du mélange à séparer dans les deux phases liquides selon leur coefficient de partage
Solide	adsorption	adsorbant solide polaire	phénomène de surface : formation de liaisons spécifiques entre les composants et la surface adsorbante
	adsorption (phase inverse)	molécules hydrophobes greffées sur de la silice	interactions hydrophobes et élution par diminution de la polarité de la phase mobile
	échange d'ions	résine (polymères d'oses) porteuse de groupements chargés négativement ou positivement	interactions électrostatiques avec les composants de charge opposée
	exclusion (filtration sur gel)	solide poreux	les composants de diamètre supérieur à celui des billes du support sont "exclus" et ceux de diamètre inférieur y diffusent et sont freinés
	affinité	support sur lequel est greffée une molécule (le ligand) spécifiquement reconnue par un des composants de l'échantillon à analyser	déplacement de l'équilibre de liaison [molécule - ligand greffé] en faveur de l'équilibre [molécule - tierce molécule]

La phase mobile:

- la [chromatographie sur couche mince](#) (CCM) ;
- la [chromatographie en phase gazeuse](#) (CPG) également appelée CPV (chromatographie en phase vapeur) : Elle s'applique principalement aux composés susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Le mélange vaporisé pénètre la *colonne* qui renferme une substance active solide ou liquide appelée *phase stationnaire*, l'élution s'effectue l'aide d'un *gaz porteur* (ou *gaz vecteur*). Les

différentes molécules du mélange sortent séparées après des durées distinctes qui expriment leur affinité à la phase stationnaire.

- la [chromatographie en phase liquide](#) (CPL) ;
- la [chromatographie en phase liquide à haute performance](#) (CLHP ou HPLC en anglais) : C'est une chromatographie de phase stationnaire de fine granulométrie, le haut débit de la phase mobile induit une haute pression qui permet une séparation très rapide, l'HPLC a un appareillage très sophistiqué muni d'un injecteur, une pompe qui stabilise la pression, un détecteur, ce qui permet de choisir les conditions opératoires adéquates qui mènent à une bonne séparation
- la [chromatographie en phase supercritique](#) (CPS) : C'est une chromatographie considérée comme intermédiaire entre CPG et CPL, la phase mobile est un fluide supercritique de faible viscosité (compression à basse température), la CPS recouvre la CCM, la CPL, la CPG et la HPLC.

2- Spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus. Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduite dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. L'ensemble de ces ions constituent le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire. Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse :

- l'électro-spray ou l'ionisation par électro nébulisation (ESI)
- l'ionisation par impact électronique (IE)
- l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)
- le Fast Atom Bombardment (FAB)



Figure 12: schéma de la spectrométrie de masse

Couplage CG/MS

Le couplage entre la chromatographie en phase gazeuse (CG) et la spectrométrie de masse (SM) permet d'analyser les composés sans piégeage intermédiaire après la CG.

Cette méthode est considérée comme l'un des outils d'investigation analytique les plus puissants en identification qualitative et quantitative.

Le composé séparé par la CG suit une ionisation par SM, pour qu'il soit identifié par la suite en interprétant les spectres résultants.[15]

4-Résonance magnétique nucléaire(RMN) :

Cette technique utilise les propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique dont le principe consiste à utiliser un champ magnétique pour orienter les "spins" nucléaires des atomes, à exciter ces spins par une onde radio à la fréquence de résonance, ce qui fait basculer certains spins, après l'excitation, les spins reviennent à leur état initial, mais ceci n'est pas instantané : cette relaxation dépend d'une composante appelée spin-réseau (interaction des spins avec les autres atomes) et d'une composante spin-spin (interaction entre les spins). Le spin nucléaire se définit comme la résultante des moments cinétiques (= rotation sur eux-mêmes) des nucléons d'un atome. A ce spin nucléaire est associé un nombre quantique I. La RMN concerne essentiellement les noyaux avec un nombre de spin = 1/2 (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P). Cette méthode permet, à condition de disposer d'une substance parfaitement pure et en quantité suffisante, d'aboutir à la détermination complète des structures avec en particulier la stéréochimie des liaisons entre atomes. Il est possible d'utiliser

la RMN du proton (^1H -RMN), celle du carbone (^{13}C -RMN) ou celle du phosphore (^{31}P -RMN). La faible abondance du ^{13}C dans la nature (1% environ) fait que la RMN du carbone est peu sensible.[16]

- **RMN monodimensionnelle (RMN – 1D)**

- RMN proton (^1H)

Le spectre RMN du proton est une méthode puissante utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Il fournit de nombreuses informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.

Le signal d'un proton est donc caractérisé par son déplacement chimique δ (exprimé en ppm de la valeur du champ magnétique), qui dépend essentiellement de la nature de l'atome qui le porte (carbone, azote ou oxygène le plus souvent) et des autres substituants portés par ce dernier et les atomes adjacents : la présence de substituants comme des $-\text{OH}$, $=\text{O}$, ou celle de liaisons insaturées ($\text{C}=\text{C}$) affectent de façon caractéristique la valeur du déplacement chimique. Par ailleurs, les protons portés par un même carbone ou des atomes adjacents vont présenter des couplages, qui vont se traduire par une multiplicité du signal : le couplage avec un autre proton se traduit par la formation d'un doublet (avec deux protons d'un triplet etc.) et la largeur de ce doublet (exprimée en Hertz) dépend de la valeur des angles dièdres entre les liaisons C-H. La mesure des constantes de couplage permet donc de définir à la fois le nombre des voisins et la stéréochimie de la molécule.[17]

- RMN carbone (^{13}C): DEPT 135° et Jmod

Dans cette expérience, chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique provoque une crête distincte sur un spectre. Généralement, cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. L'analyse se base sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires. La différence majeure entre le DEPT 135° et le Jmod, réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le Jmod alors qu'ils ne le sont pas avec le DEPT.

• RMN bidimensionnelles (RMN – 2D)

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage.

• Corrélations homonucléaires

-COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^2J et ^3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

-NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$): cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

• Corrélations hétéro-nucléaires

- HSQC ($^1\text{J}_{\text{H-C}}$): cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

- HMBC ($^2\text{J}_{\text{H-C}}, ^3\text{J}_{\text{H-C}}$): cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance $^2\text{J}_{\text{H-C}}, ^3\text{J}_{\text{H-C}}$, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

5-Emission atomique avec atomisation par plasma à couplage inductif.

Composition minérale des plantes

La méthode à l'eau régale a pour principe la mise en solution de l'échantillon dans un mélange d'acide chlorhydrique et nitrique, selon le mode opératoire suivant : on pèse 0.15g de la matière minérale, on y ajoute 2 à 3 ml de l'eau régale ($\frac{1}{4}$ HNO_3 , $\frac{3}{4}$ HCL), on porte sur une plaque chauffante et on laisse évaporer à sec. Puis on ajoute 25 à 30 ml de l'acide chlorhydrique (2 M), jusqu'à dissolution totale. Ensuite on passe à l'analyse par l'ICP-AES.

Principe de l'ICP-AES :

La spectrométrie d'émission atomique de plasma d'argon à couplage inductif (ICP-AES) est une technique multi-élémentaire, qui permet de doser simultanément de nombreux éléments. Le principe de l'analyse par ICP-AES est le suivant :

L'échantillon liquide est, dans un premier temps, nébulisé puis séché à l'aide d'un nébulisateur ultrasonique, puis transmis vers le plasma, qui est un gaz d'argon, partiellement ionisé et macroscopiquement neutre. Il est formé par l'action d'un fort champ magnétique sur des particules chargées à l'intérieur d'un courant d'argon, le courant haute fréquence dans les

spires qui entourent le tube de quartz ou passe l'argon, produit un champ magnétique à haute fréquence.

L'échantillon subit dans le plasma les différentes étapes de décomposition, d'atomisation, d'ionisation, les atomes et ions générés sont alors excités. Chaque élément émet alors des photons, lors de son retour vers les niveaux d'énergie fondamentaux, de longueur d'onde caractéristique dont le flux est proportionnel à la concentration de l'élément dans l'échantillon. Elles sont transformées en signaux électroniques qui sont convertis en informations pour l'analyse.[18]

VI-Activité antibactérienne :

Dans le cadre d'améliorer l'activité pharmacologique des plantes, des tests antibactérienne ont été effectués.

Quatre souches ont été choisi pour effectuer le test, en utilisant la méthode de diffusion sur disques, ou méthode de Vincent ; appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme [19].

1. Bactéries

Salmonella spp : Salmonelles non typhiques ou non paratyphiques. Bacille à coloration de Gram négative, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Salmonella*. Ce genre comporte 2 espèces (*S. enterica* et *S.bongori*) Les salmonelles sont l'une des principales causes des syndromes gastroentéritiques dans les pays industrialisés. Ces syndromes sont dus essentiellement à des toxiinfections alimentaires survenant parfois en collectivités. La contamination humaine se fait le plus souvent par la consommation d'aliments contaminés

Escherichia coli : l'*E. coli* fait partie de la famille des entérobactéries, souvent utilisée comme indicateur de la qualité des eaux, elle présente un hôte normal de l'intestin des mammifères c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou septicémie.

Micrococcus luteus : ils font partie de famille des *Micrococcaceae*, *M. luteus* est une bactérie du sol, des poussières, de l'eau et de l'air et fait partie de la flore naturelle de la peau des mammifères. Cette bactérie pourrait être un pathogène émergent engendrant des maladies nosocomiales chez des patients immunodéprimés. *M. luteus* contamine aussi la bouche, la muqueuse, de l'oropharynx et des voies respiratoires supérieures humaines.

Bibliographie

Staphylococcus aureus : ils font partie de la famille des *Micrococcaceae*, présentant une forme arrondie (coccus) et mis en évidence par la coloration gram plus. Les staphylocoques sont des bactéries qui colonisent très largement la peau et les muqueuses. Ils sont responsables d'infections diverses, mais également d'intoxications et d'infections urinaires.

2. Antibiogramme

Un antibiogramme est une méthode d'analyse qui a pour but de déterminer la concentration d'inhibition de la croissance bactérienne face à un ou plusieurs antibiotiques.

Elle peut se faire en milieu liquide (dans une culture bactérienne liquide) ou en milieu solide (sur une boîte de pétri gélosée) en ajoutant une concentration connue d'antibiotique.

2^{eme} chapitre :
Matériel et méthodes

Matériel et méthode :

I-Matériel végétal :

- 1. La récolte :** Les graines ont été récoltées de la région de Taounate
- 2. La conservation :** Les graines ont été conservées à l'air ambiant.
- 3. le broyage :** les graines de *Ammi visnaga* ont été broyées à l'aide d'un broyeur.
- 4. Détermination de l'humidité :** une quantité bien déterminée est prise pour qu'elle soit mise dans l'étuve à 100°C, en la vérifiant chaque 30 min jusqu'à obtention d'un poids stable.

II-Préparation des extraits

1. protocole d'extraction :

Extraction par soxhlet

a- L'extraction :

On a utilisé :

- 300g de la matière végétale
- 2L d'acétate d'éthyle(1^{ère} extraction)
- 2L d'éthanol (2^{ème} extraction)

b-préparation de l'extrait brut

On filtre l'extrait à l'aide d'un papier filtre. La mesure du volume du filtrat obtenu est nécessaire pour calculer le rendement par volume. La solution est mise dans le ballon de poids connu, l'acétate d'éthyle ,l'éthanol sont éliminés du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rota-vapeur (BÜCHI) sous une température de 40°C, pour éviter toute dégradation de composés existants dans l'extrait, permettant ainsi d'obtenir les extraits caractérisés par une couleur marron foncée, plus au moins fluide, qui est considéré comme étant l'extrait brut.

c- Conservation de l'extrait

L'extrait obtenu est gratté du ballon et récupéré dans un bécher et mis dans un réfrigérateur de 15°C pour qu'il soit analysé par la suite en utilisant la chromatographie sur colonne.

2-Détermination des rendements

La différence de poids du ballon avant et après l'évaporation permet de mesurer le poids de l'extrait. Le rendement est le rapport entre l'extrait obtenu sur le volume mesurer

après l'extraction par le soxhlet. On exprime le rendement par le poids de l'extrait en g par 100 ml de solvant

III-Tests effectués :

1-Estérification :

Dans un ballon de 100ml, on a introduit 10ml de méthanol, 2.5ml d'acide sulfurique, puis on a chauffé à 140°C pendant 30 minutes, par la suite on a ajouté un mélange formé de 9g de l'extrait brute et de 30ml du méthanol pendant 1 heure.

2-Humidité :

Le contenu en humidité des plantes a été déterminé par séchage à l'étuve pendant 6h à 100°C. Considérons que :

$$H\% = [(poids \alpha - poids \beta) / poids \alpha] * 100$$

Avec :

α : Poids de l'échantillon avant séchage;

β : Poids de l'échantillon après séchage;

H% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

3-Matière minérale :

Environ 20g de chaque plante broyée, placée dans un creuset thermorésistant, ce dernier est introduit dans un four <Furnace 30400> à 550°C durant 5 heures.

La fraction de la matière minérale est donnée par la relation :

$$MM(\%) = (m/E) * 100$$

Avec :

-MM : Matière minérale

-E : Masse de la matière végétale, est égale à 20g

-m : Masse de l'échantillon sortie du four

4- Matière organique

La matière organique est déterminée par la différence entre la matière sèche (H%) et la matière minérale.

$$MO(\%) = (\%H - MM) / E * 100$$

Avec :

-MO : Matière organique

- %H : Humidité de l'échantillon

- MM : Matière minérale

- E : Masse de la matière végétale

5-Test d'effet antioxydant :

a. La préparation de la solution de DPPH :

Le DPPH 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (C₁₈H₁₂N₅O₆ ; Mr : 394.33), est solubilisé dans le méthanol absolu pour en avoir une solution de 0.3 mM. On procède comme suivant :

On solubilise une quantité de 12mg de DPPH dans 100ml du méthanol. Le mélange est laissé en agitation pendant 1h 30min dans un flacon brune et à température ambiante pour éviter la dégradation de ce radical.

La solution de DPPH est conservée au réfrigérateur à une température de 4C°.

b. La préparation de l'extrait :

Pour évaluer l'activité antioxydante par le test de DPPH, on dissoudre les échantillons dans le méthanol.

Une solution mère est préparée pour les douze extraits des plantes étudiées avec une concentration de 10mg/ml. Différent concentration de 200µl, 100µl, 50µl et de 20µl ont été faite afin de déterminer l'IC50 (la concentration correspondant à 50% de la réduction du radicale libre de DPPH) pour chaque plante.

c. Protocol expérimentale :

Pour chaque extrait on fait deux essais pour avoir le moyen :

- Test de blanc :

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 0,05ml de la solution de l'extrait préparé (pour chaque plantes), puis on ajoute 1,95ml du méthanol (on doit avoir 2ml de la solution expérimentale), on utilise le vortex pour homogénéiser le mélange, les solutions sont mises dans un cuve de quartz pour mesurer leurs absorbances à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 517nm (domaine visible).

- Test contrôle :

Le control négatif correspond à l'absorbance de DPPH avec le méthanol, il consiste à mettre dans un tube stérile 0,4ml de DPPH et 1,60ml du méthanol.

- Test des échantillons :

Dans des tubes secs et stériles, on ajoute 1 ml du méthanol, ensuite on introduit les différentes concentrations 200µl, 100µl, 50µl et 20µl de la solution des extraits méthanoliques préparés, ensuite le volume correspondant du méthanol pour avoir le 1.6ml de solution et pour terminer le 2ml on ajoute 0,4ml de DPPH.

On utilise le vortex pour homogénéiser le mélange, les mélanges sont laissés à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm.



Figure 13: appareil de spectrométrie

d. Expression des résultats :

La valeur IC50 pour chaque échantillon, définie comme la concentration de l'échantillon conduit à une réduction de 50% de la concentration initiale DPPH, a été calculée à partir de la courbe de régression non linéaire de la concentration des extraits ($\mu\text{g/ml}$) en fonction du pourcentage de l'activité antioxydant. L'activité antioxydant des extraits est donnée par la relation :

$$\% \text{L'activité antiradicalaire} = [A_{\text{contrôle}} - (A_{\text{test}} - A_{\text{blanc}})] / A_{\text{contrôle}} \times 100$$

Avec : $A_{\text{contrôle}}$ = Absorbance du contrôle ;

A_{test} = Absorbance de l'échantillon ;

A_{blanc} = Absorbance du blanc

Une partie de l'extrait est reprise pour le diagnostic avec le CCM analytique. et par la suite a la CPL et la RMN.

IV- Techniques de purification et d'identification :

1-Analyse des composés chimique par CCM (chromatographie sur couche mince)

Pour que la composition chimique de l'extrait soit déterminée, on va séparer les différents composés chimiques par chromatographie sur colonne, alors pour déterminer le solvant adéquat pour réaliser cette séparation on fait appel à la CCM (TLC sheets –SIL G for TLC, Layer 0.20mm silica gel 60) qui nous permettra d'atteindre notre but.

Les extraits sont soumis à une chromatographie analytique sur couches minces de polyamide DC6 (Macherey Na gel, 516 Duren) Sur des plaques en verres (20x20 cm). Les systèmes solvants utilisés sont : acétate d'éthyle /hexane (0/10) ;(2/8) ;(4/6) ;(5/5) ;(6/4) ;(8/2) ;(10/0) ;

Le système acétate d'éthyle /hexane qui nous a donné la meilleure séparation a été utilisé. Le chromatogramme obtenu est d'abord observé au visible à l'UV 254 nm et à 365nm.

2-Séparation des différents composés par chromatographie sur colonne

- *Ammi visnaga* :

Matériel et méthodes

Sur une colonne (NS29.2/32) on a introduit 150g de silice (gel de silice 60(0.040-0.063mm),on imbiber la silice par le système de solvant obtenu par CCM jusqu'à détermination de la fraction nécessaire pour faire l'éluion, par la suite on a ajouté 8g de l'extrait brute adsorbé sur 10g de la silice, pour lancer à la fin l'éluion par ajout du solvant.

○ *Ammi majus* :

On a suivi la même procédure avec 200g de la silice et 6g de l'extrait brute adsorbé sur 10g de la silice.

L'éluion s'est passée avec différentes fractions de système de solvant en passant par des polarités croissantes, tout en contrôlant par la CCM.

Les fractions obtenues après séparation et considérés comme pures suivant les résultats de la CCM, ont été concentrés pour qu'ils subissent des analyses d'identification par la RMN et la CGMS.

V-Activité antibactérienne :

1-Préparation des extraits :

Une macération par hexane suivi de méthanol s'est effectuée par :

50g des plantes sèches broyées ;

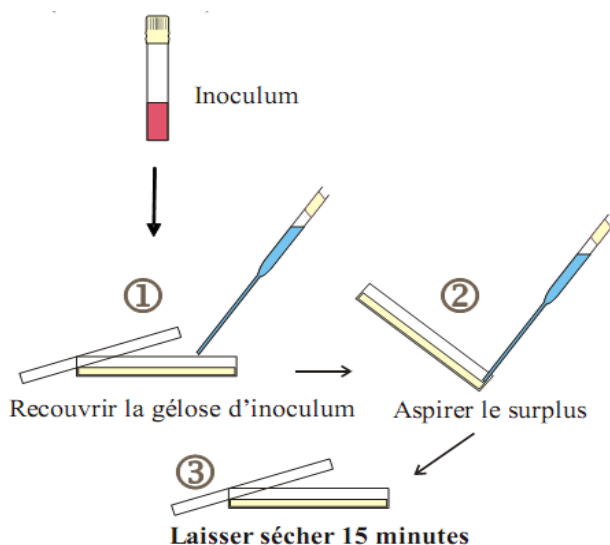
500ml du solvant ;

L'extrait brut a été obtenu par la même méthode sur page(29).

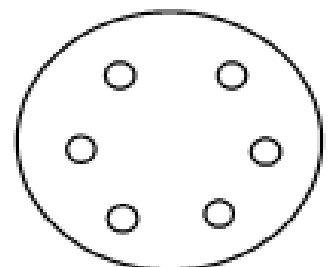
2-Méthode de l'antibiogramme :

Dans des boites de pétri on a préparé des milieux de culture LB de concentration 10mg/ml gélosés, par la suite on a effectué une stérilisation pour éliminer tout germe pathogène qui peut influencer la culture de la bactérie visée.

Par la méthode d'inondation les boites ont étéensemencée par les 4 souches étudiées à l'aide d'une suspension bactérienne, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre sont été déposés à la surface de la gélose, imprégné par les quatre extraits solubilisés dans le DMSO .un antibiotique spécifique est utilisé comme témoin positif pour chaque souche.



Après incubation à 37°C, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en m



Dépôt des disques du papier filtre et d'antibiotiques

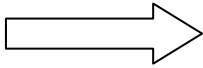


Figure 14: méthode d'ensemencement par inondation

3^{ème} chapitre :
Résultats et discussion

Résultats et discussion :

1)-Extraction par soxhlet :

Le tableau 4 montre les rendements d'extraction d'*Ammi visnaga* et *Ammi majus* obtenus par Soxhlet en utilisant différents solvants. Il apparait que les rendements sont presque identiques soit pour les plantes, soit pour les solvants.

Tableau 1: Rendement de l'extraction par soxhlet

Les plantes	Solvant utilisé	Le rendement (%)
<i>Ammi visnaga</i>	Acétate d'éthyle	1,05
	Ethanol	0,98
<i>Ammi majus</i>	Acétate d'éthyle	0,97
	Ethanol	1,05

2)-Humidité

L'humidité des graines d'*A. majus* et *A. visnaga* déterminée par étude gravimétrique est exprimé au niveau du tableau 5. Il en ressort que la teneur en eau dans l'*A. majus* (9,8%) est supérieure à celle d' *A. visnaga*.

Tableau 2:la teneur en eau déterminée dans les graines chez les deux espèces étudiées

	<i>Ammi visnaga</i>	<i>Ammi majus</i>
Humidité en %	5.8	9.8

3)-Matière minérale :

Les résultats du Tableau 6 révèlent que la fraction minérale au niveau des graines d'*Ammi majus* est beaucoup plus importante que celle chez l'espèce *visnaga*. Ce résultat confirme l'Utilisation traditionnelle de l'*Ammi majus* dans le traitement contre le traumatisme des Os.

Tableau 3: la teneur en matière minérale des graines d'*Ammi visnaga* et *Ammi majus*

	<i>Ammi visnaga</i>	<i>Ammi majus</i>
Matière minérale en %	9.6	12.4

L'analyse de la matière minérale par l'ICP-AES a révélé une teneur importante en phosphore, en potassium et en soufre (tableau: 7). Hors, l'*Ammi visnaga* signale toujours un pourcentage supérieur a celui de l'*Ammi majus* qui atteint la valeur double pour le soufre.

Résultats et discussion

Tableau 4: Dosage chimique par ICP des trois éléments majoritaires de la matière minérale de l'A. Visnaga et de l'A. majus

	Phosphore (P)	Potassium (K)	Soufre (S)
<i>Ammi visnaga</i>	251.157 mg/l	1 664.65 mg/l	144.969 mg/l
<i>Ammi majus</i>	207.457 mg/l	807.2803 mg/l	89.261 mg/l

4)-Matière organique :

Le tableau 8 exprime le pourcentage de la matière organique trouvée dans les graines des deux espèces étudiées. La matière organique trouvée au niveau d'*Ammi visnaga* (94%) est supérieure à celle d'*Ammi majus* (87,6%).

Tableau 5: Teneurs en matière organique au niveau de l'A. majus et A. visnaga

	<i>Ammi visnaga</i>	<i>Ammi majus</i>
Matière organique en %	94	87.6

5)-Estérification :

- *L'Ammi visnaga* :

Les analyses de CGSM du produit de l'estérification de l'extrait de l'acétate d'éthyle nous a permet d'identifier trois composés majoritaires.

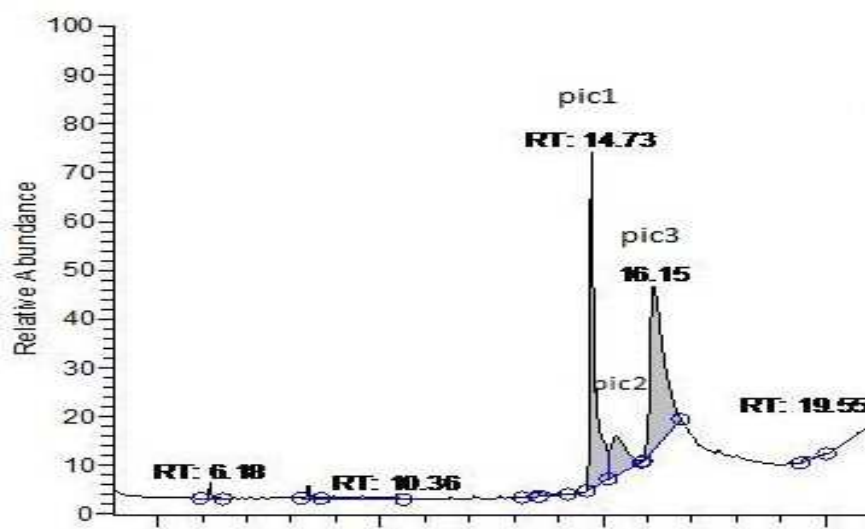
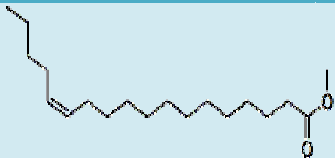



Figure 15: Chromatographe obtenu par analyse CGSM des ester de l'A.v

Tableau 6: molécules détectées dans la fraction estérifiée et leurs caractéristiques

pic	RT	%	Molécule	Structure	Masse moléculaire g/mol

Résultats et discussion

1	14.73	47.94	Acide 13-Octadecenoïque, methyl ester, (Z)		296.49
2	15.27	13.38	(C ₂₁ H ₃₂ O ₂)	NI	316.485
3	16.15	38,67	Khellin (C ₁₄ H ₁₂ O ₅)		260.2421

Le 1^{er} pic : le pic le plus abondant correspond au composé 1 (47,94%), présente l'acide méthyle 13-Octadecenoïque, ester, (Z) :

Les constituants vasodilateur *d'Ammi visnaga*, visnadin, samidin, dihydrosamidin et khellin sont des exemples frappants d'esters khellactone naturel. [20],

La purification d'une fraction considérable de la khellin a été possible par l'acétate d'éthyle, comme par l'éther de pétrole [21]

L'Ammi majus :

Les analyses de CGSM du produit de l'estérification de l'extrait de l'acétate d'éthyle nous a permet d'identifier quatre composés majoritaires

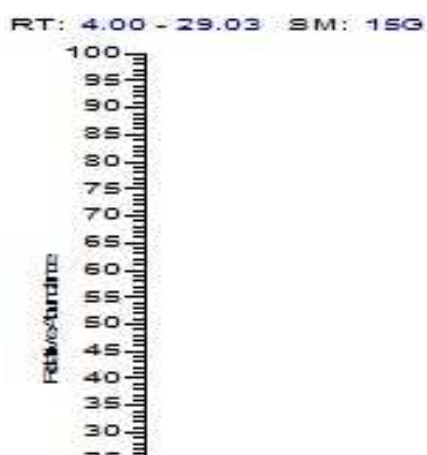
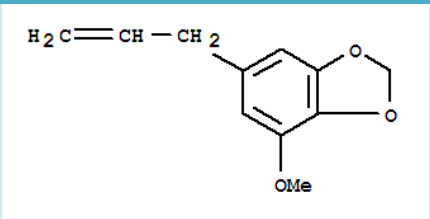


Figure 16: Chromatographe obtenu par analyse CGSM des esters de *l'A.majus*



Résultats et discussion

Tableau 7: molécules détectées dans la fraction estérifiée et leurs caractéristiques

pic	RT	%	Molécule	Structure	Masse moléculaire g/mol
1	8,97	16.90	1,3-Benzodioxole, 4-methoxy-6-(2-propenyl)- Ou la myrstinine $C_{11}H_{12}O_3$		192
2	14,75	48.11	OCTADECADIENOIC ACID METHYL ESTER ($C_{19}H_{34}O_2$)	Mélangé d'isomère	294
					294

Le chromatogramme a révélé 3 composés, pour le majoritaire (43,48%) la base de données a suggéré 3 esters isomères de formule brute $C_{19}H_{34}O_2$,

Une analyse du composé non estérifié révélera l'ester présent qu'il soit naturel ou formé par l'estérification effectuée.

6)-Effet antioxydant :

L'effet antioxydant le plus marquant a été trouvé dans l'extrait éthanolique de *l'Ammi visnaga*. Le tableau 6 et la figure 1 montrent la variation de l'effet antioxydant de l'extrait éthanolique des graines d'*Ammi visnaga* en fonction de la concentration.

L'activité antioxydante trouvée chez *l'Ammi visnaga* traduit la grande teneur de cette dernière en polyphénols, et ceci est confirmé par plusieurs travaux (78,7% à 200 $\mu\text{g/ml}$ de l'extrait butanolique) [22] et qui montrent que l'*A.v* contient des coumarines, flavonoïdes et leurs dérivés.

Tableau 8: Activité antioxydante chez *l'Ammi visnaga* à différentes concentrations

Concentration $\mu\text{g/ml}$	Effet antioxydant en %
250	84,91
100	69,91
50	45,78
20	12,06

Résultats et discussion

12,5

9

L'effet antioxydant maximal (84,91%) est obtenu à la concentration de 250 µg/mL de l'extrait éthanolique de *l'Ammi visnaga*.

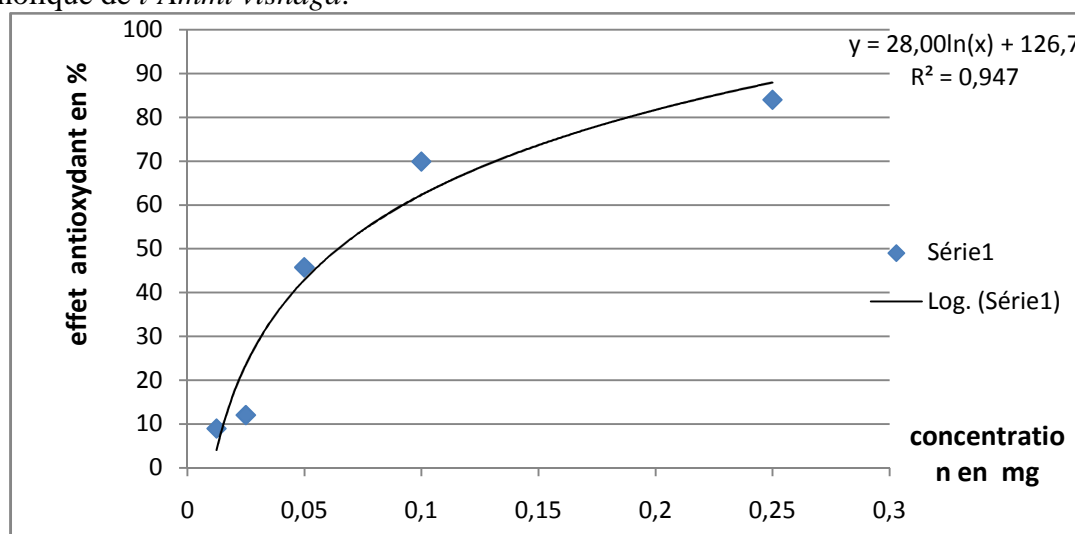


Figure 17: la variation de l'effet antioxydant en fonction de la concentration

L'extrait d'acétate d'éthyle de *l'Ammi visnaga* et de *l'Ammi majus*, et l'extrait éthanolique de cette dernière ont donné un effet antioxydant qui ne dépasse pas 30%.

La composition chimique de *l'Ammi majus* qui renferme une diversité de polyphénols, n'était pas mise en évidence par les solvants utilisés, d'autre solvant plus polaire seront indispensable pour révéler cette activité antioxydante.

7) Chromatographie analytique :

L'analyse par CCM de l'extrait éthanolique de *l'Ammi visnaga* par le système de solvant (acétate d'éthyle/hexane) respectivement (10/0) ;(6/4) ;(5/5) ;(4/6) ;(2/8) ;(0/10) a donné :

La figure : 18 présente les CCM effectuées, de la gauche a droite, acétate d'éthyle pur ; le système d'acétate d'éthyle /hexane (6/4) ;(5/5) ;(4/6) ;(2/8) et l'hexane pur. La bonne séparation a été obtenue par le système (4/6) (acétate d'éthyle/hexane).celui utilisé pour éluer au niveau de la colonne.

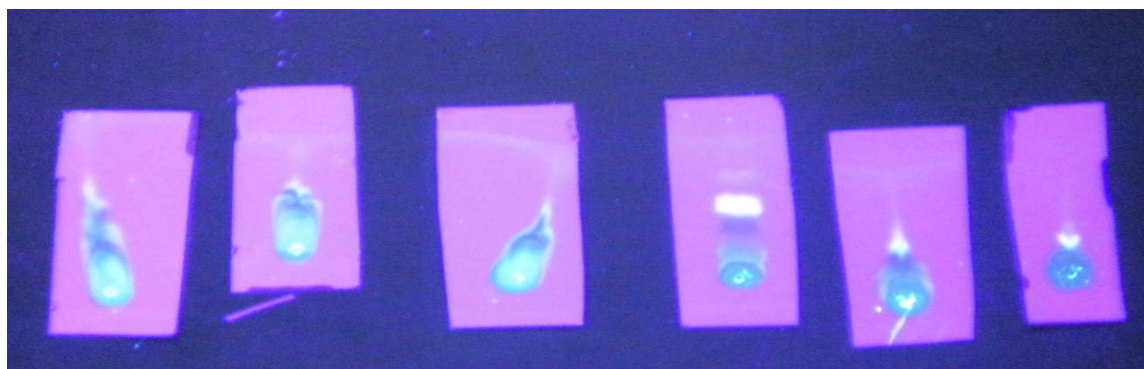


Figure 18: résultat de CCM de la fraction éthanolique de *l'Ammi visnaga*

Résultats et discussion

L'analyse par CCM de l'extrait éthanolique de *Ammi majus* par le système de solvant (acétate d'éthyle/hexane) respectivement (10/0);(8/2);(6/4);(5/5);(4/6);(2/8);(0/10) a donné :

A la gauche de la figure(19) on constate la mauvaise élution de l'hexane, le solvant le moins polaire, suivi par les systèmes d'hexane /acétate d'éthyle (8/2), (6/4), (5/5), (4/6), (2/8), et l'acétate d'éthyle pur ;marquant une forte élution à mauvaise séparation

La bonne séparation a été obtenue par le mélange (6/4) (acétate d'éthyle/hexane).celui utilisé pour éluer au niveau de la colonne.

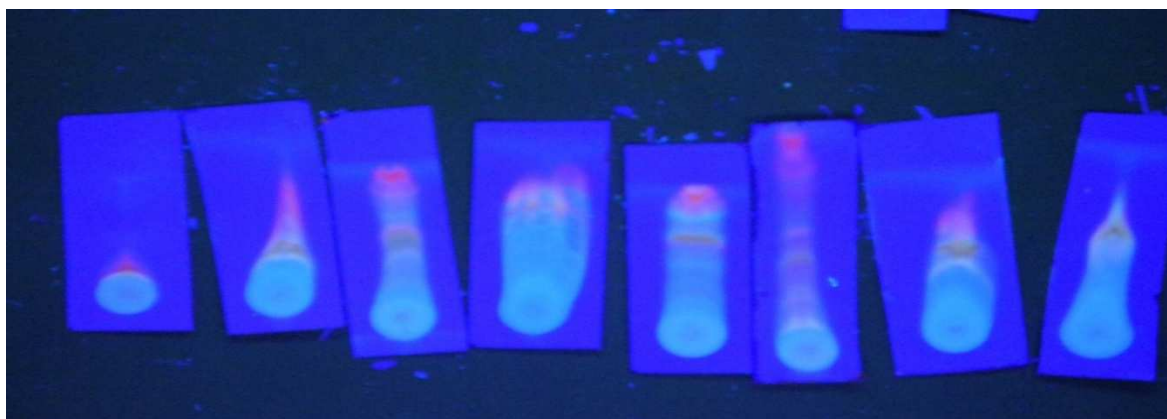


Figure 19 : résultat de CCM de la fraction éthanolique de *Ammi majus*

8)-Chromatographie sur colonne :

8-1 *Ammi visnaga*

la chromatographie



sur colonne de

Figure 20: photo de la CPL de l'*A. visnaga* au debut de la manipulation

l'extrait éthanolique de
a permis de purifier 5



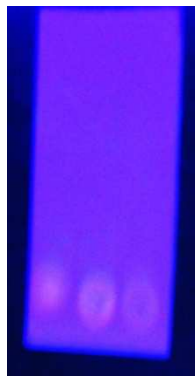
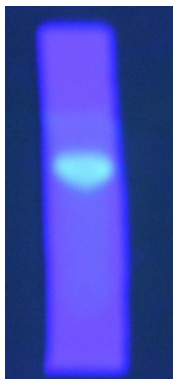
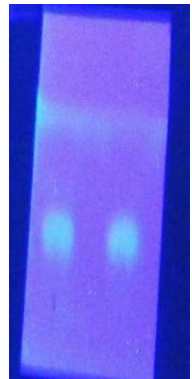


Ammi visnaga nous
composés purs.

Avec une fraction de 4/6 (hexane/acétate d'éthyle) on a pu purifier le composé A, B, C, avec une fraction d'acétone on a purifié le cristal D, et avec une fraction de méthanol on a purifié le précipité E, les deux derniers apparaissent a température ambiante.

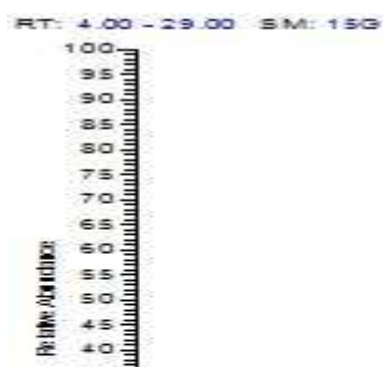
Le tableau 12 présente la CCM de chaque produit avec la masse de chacun.

Résultats et discussion

Tableau 9: CCM des composés purifiés à partir de *l'Ammi visnaga* et leurs masses

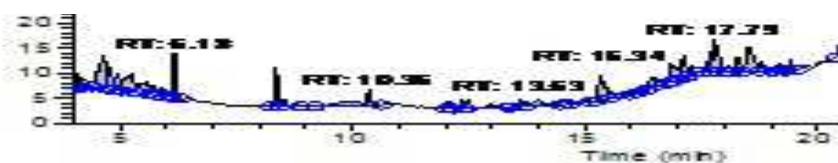
				
A	B	C	D	E
146.8mg	24.1mg	43.9mg	40.9mg	16.7mg

L'analyse des trois premiers composés s'est effectuée par CGSM, le résultat était comme suit :



Ce

Figure 21 : Chromatographe obtenu par analyse CGSM du composé A



chromatogramme où aucun composé majoritaire n'apparait montre que le composé A est soit une molécule non volatile ou bien il s'agit d'une substance thermodegradable, d'autres techniques d'analyse sont nécessaires pour déterminer cette structure.

Résultats et discussion

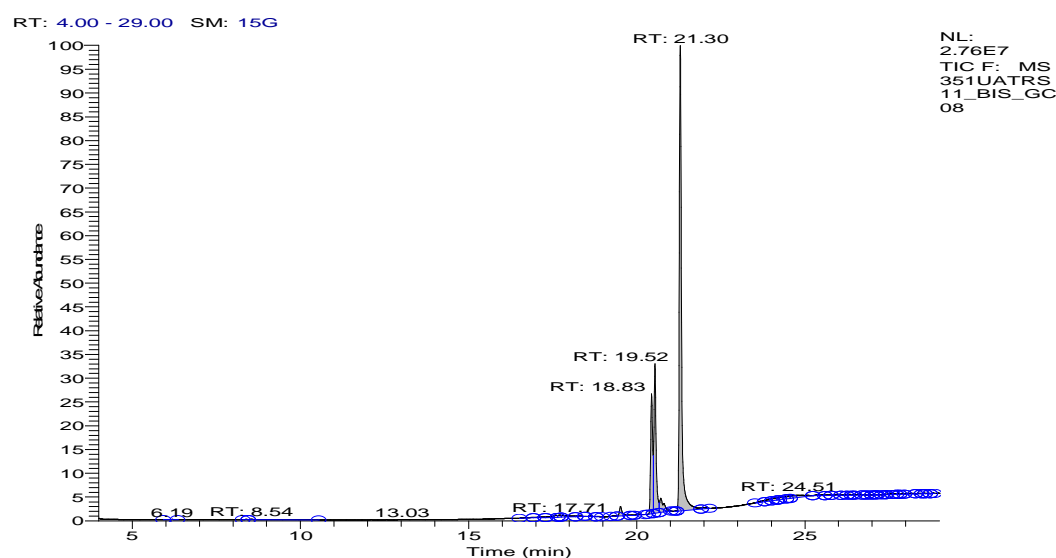


Figure 22 : Chromatogramme obtenu par analyse CG/SM du composé B
Tableau 10 : molécule d'A. visnaga purifiés et leurs critères

pic	RT	%	Molécule	structure	Masse moléculaire g/mol
1	18,83	0,066	NI		
2	19,52	2,45	NI		
3	21,30	97,48	4H-Furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-2,2,3,3-tetramethyl C ₁₅ H ₁₆ O ₃		244
			4H-Furo[3,2-c][1]benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-2,2,3,3-tetramethyl- C ₁₅ H ₁₆ O ₃		

- Le chromatogramme du composé B détecte trois pics correspondants à trois composés : un composé majoritaire dont la fraction dans le mélange atteint 97,84%, ce qui confirme la pureté marquante du produit.
- Deux isomères de formule brute C₁₅H₁₆O₃ ont été suggérés par la bibliothèque pour le pic 3 représentant le composé majoritaire (97.84%)

Résultats et discussion

351UATRS11_BIS_GC08 #2534 RT: 21.30 AV: 1 NL: 1.11E7
T: + c Full ms [50.00-350.00]

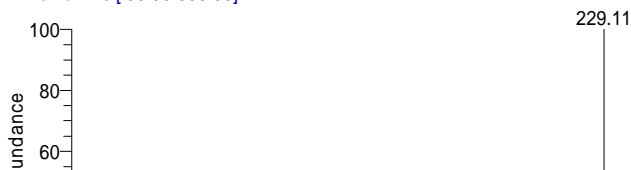
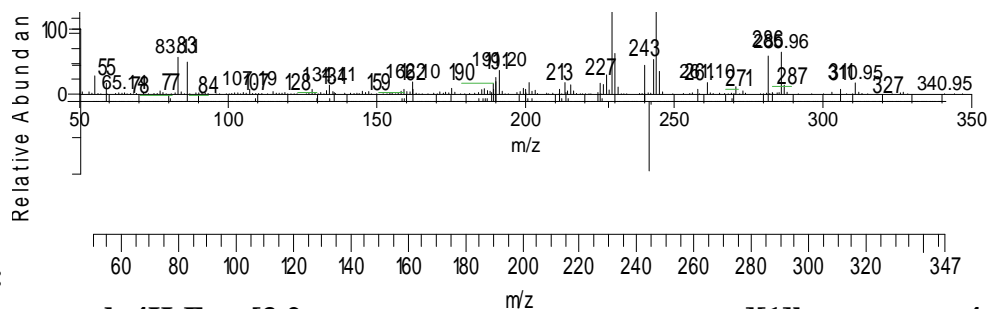


Figure 23: spectre de masse du pic 3



24:

de masse du 4H-Furo[3,2-

dihydro-2,2,3,3-tetramethyl

Figure
spectre
c][1]benzopyran-4-one, 2,3-

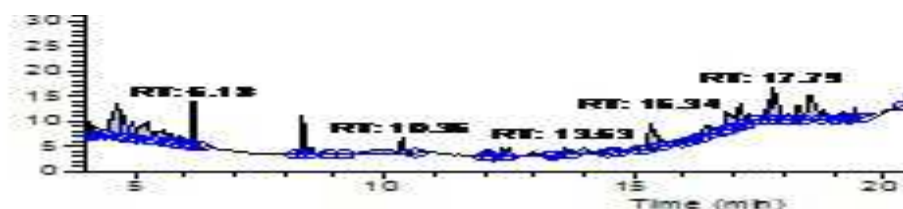
Le spectre de masse correspondant au pic 3, présente une assimilabilité remarquable avec celui des deux isomères, avec un ion moléculaire de 286g/mol.

Le spectre RMN en cours va confirmer plus la structure de molécule purifiée.

RT: 4.00 - 29.00 SM: 15G



Figure 25 : Chromatographe obtenu par analyse CGSM du composé C



L'absence des composé majoritaire sur le chromatogramme montre que le composé C aussi est un composé non volatile ou bien il s'agit d'une substance thermodegradable, d'autres techniques d'analyse sont nécessaires pour déterminer cette structure.

8-2 Ammi majus

Résultats et discussion



la

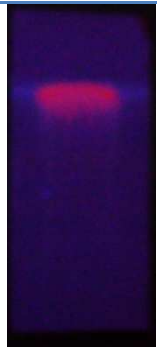
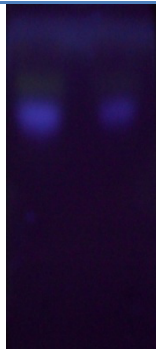




Figure 26 : photo de la CPL de l'*A. majus* au début de la manipulation

chromatographie  sur colonne de l'extrait éthanolique de *l'Ammi visnaga* nous a permis de purifier 6 composés purs.

Avec une fraction de 6/4(hexane/acétate d'éthyle) on a pu purifier le composé F, G,H, avec une fraction d'acétone on a purifié le précipité I ,et avec une fraction de méthanol on a purifié les précipités J et K, les deux apparaissent a température ambiante

Le tableau 14 présente la CCM de chaque produit avec la masse de chacun.

Tableau 11 : CCM des composés purifiés à partir de *l'Ammi majus* et leurs masses

					
F	G	H	I	J	K
478.6mg	243.4mg	134.1mg	129.2mg	247.5mg	20.5mg

L'analyse des six composés s'est effectuée par CGSM, le résultat était comme suit :

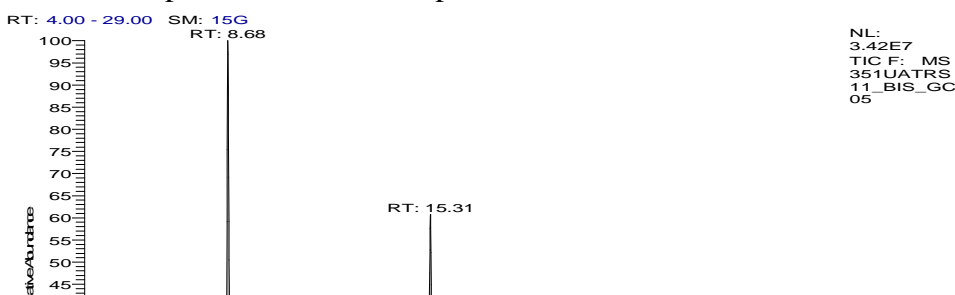
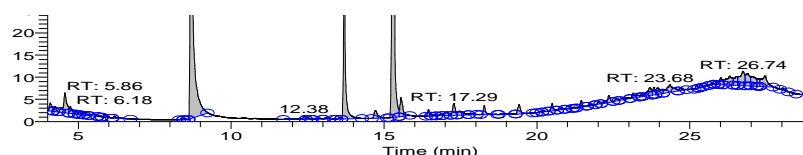
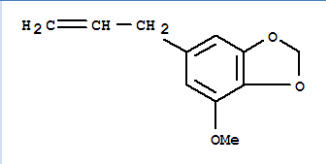
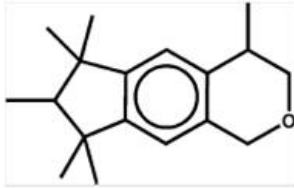
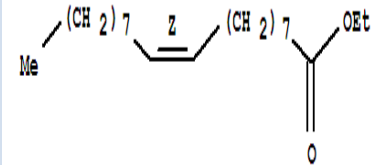


Figure 27 : Chromatographe obtenu par analyse CGSM du composé F



Résultats et discussion

Tableau 12 : molécule d'*A. visnaga* purifiés et leurs critères

pic	RT	%	Molécule	Structure	Masse moléculaire g/mol
1	8,68	60,84	1,3-Benzodioxole, 4-methoxy-6-(2-propenyl)- Ou le myristicin		192
2	12.83	0,72	Galaxolide		258.4
3	15,31	38,43	Oleate d' Ethyl		310.51

Le chromatogramme a détecté trois pics correspondant à trois molécules, le premier pic représente le composé majoritaire à 60.84%, la bibliographie a fourni le myristicin comme suggestion, le myristicin qui est un composé naturel, poison produit par les noix de muscade, induit la norotoxicité [23].

vu la seule tache détecté au niveau de la CCM et les pourcentages des deux composés majoritaires la myristicin (60,84%) et l'oléate d'éthyle(38,43), et leurs spectre de masse ;on se met en face de deux hypothèses :

-Les deux composés sont superposés au niveau de la plaque.

-Un des deux composé n'absorbe pas a l'UV et doit être pulvériser par un produit spécifique.

En se basant sur la bibliographie, les RF de chaque composé sont très proches, RF miricitine :0.81[24], Rf d'oleat d'éthyle :0.7[25] ce qui renforce la première hypothèse .

Résultats et discussion

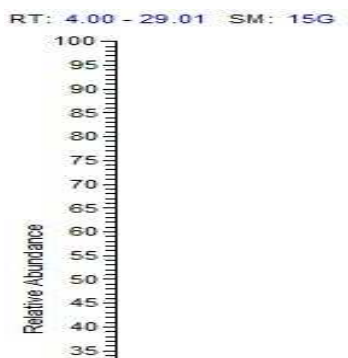


Figure 28 : Chromatogramme obtenu par analyse CGSM du composé G

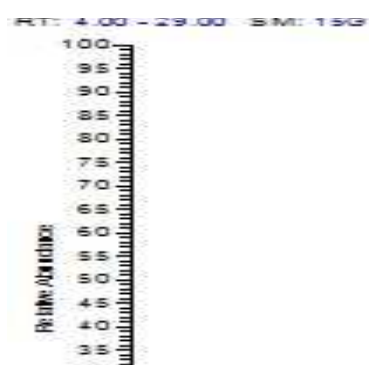


Figure 29 : Chromatogramme obtenu par analyse CGSM du composé H

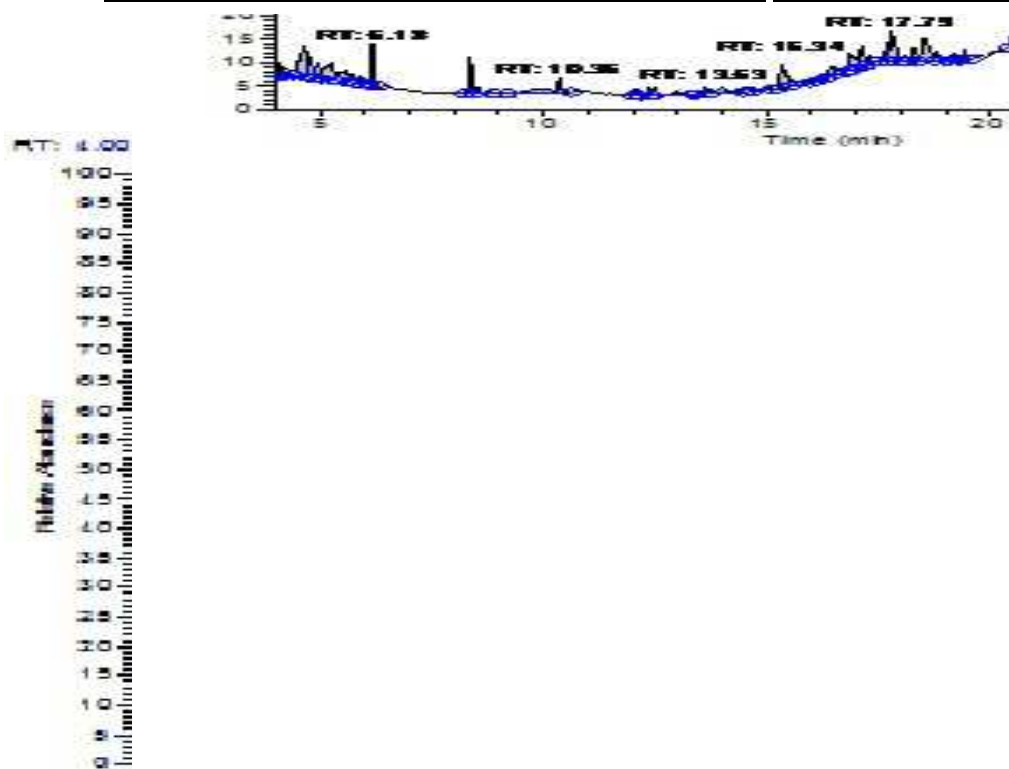


Figure 30 : Chromatogramme obtenu par analyse CGSM du composé I



Figure 31 : Chromatographe obtenu par analyse CGSM du composé J

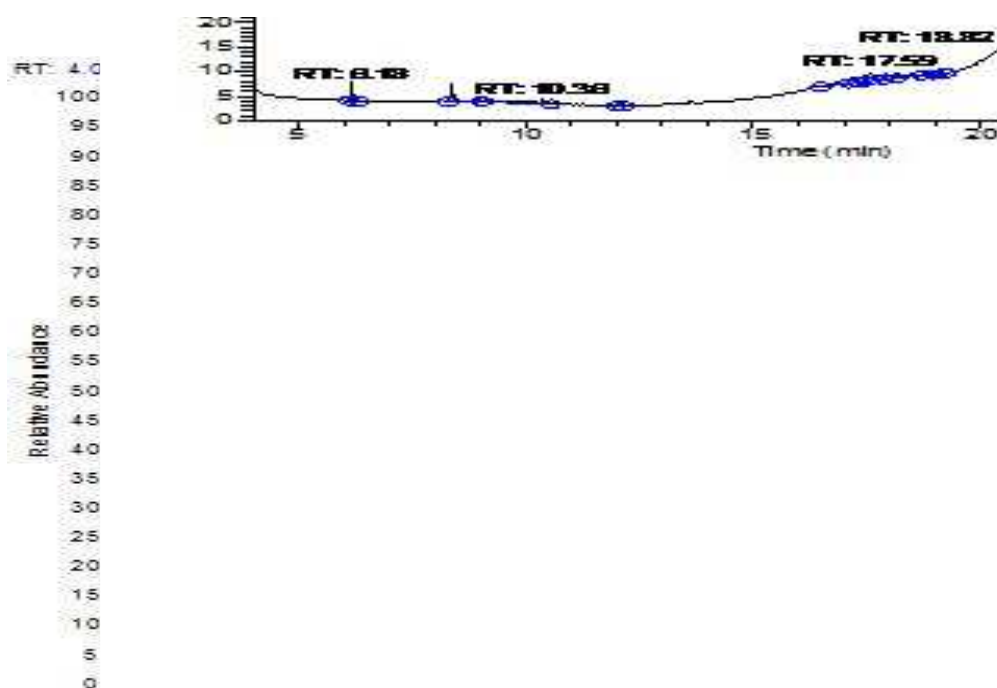


Figure 32 : Chromatographe obtenu par analyse CGSM du composé K

Les chromatogrammes des composés G, H, I, J, K ne présente aucun composé majoritaire ce qui signifie que ses composés sont non volatiles ou bien il s'agit de substances thermodegradable, d'autres techniques d'analyse sont nécessaires pour déterminer cette structure.

9)- RMN

Le spectre de la molécule E :

RMN du proton :

Doublet a 6.9 ppm (cycle aromatique)

$J^3=1.8$ (2 hydrogène couplés en méta)

Résultats et discussion

Doublet à 4ppm (vinyle monosubstitué)

Singulet à 4.026 (méthyle déblindé par un Oxygène)

RMN du C :

Signal à 20ppm (CH₃ lié à un éthène)

Signal à 60ppm (méthyle deblindé par un oxygène)

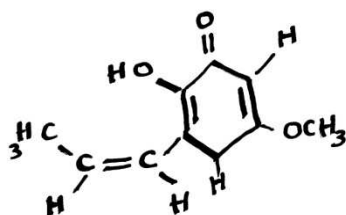
Signal à 95.5ppm et à 105.88ppm (2carbone d'un vinyle)

Signal à 110.69ppm (CH aromatique)

Signal à 146.95ppm (C-OH aromatique)

Signal à 177.01ppm (C=O)

La molécule obtenue :

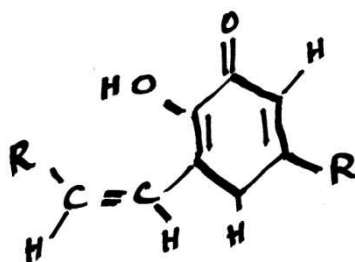


Pour la molécule F la

déterminée par la technique de RMN seulement.

structure totale n'a pas pu être

La molécule obtenue est la suivante :



10)-Activité

L'activité

antibactérienne :

antimicrobienne des extraits

héliques et méthanoliques de *l'A. visnaga* et *l'A. majus* contre les microorganismes examinés dans la présente étude et leur puissance ont été évalués qualitativement par la présence ou l'absence de zones d'inhibition et de diamètre de la zone (tableau 16). Les résultats ont montré que l'extrait hélique de *l'A. visnaga* n'a pas d'effet inhibiteur sur *Micrococcus leutus*.

Tableau 13 : zone inhibitrice des différentes souches vis-à-vis les extrait de *l'A. visnaga* et *l'A. majus*

Souche	Extrait (10µg/ml)	Zone d'inhibition par extrait (mm)	Antibiotique	Zone d'inhibition par antibiotique (mm)
<i>E. coli</i>	Hexane (A.V)	0	Chloramphénicol (30µg/ml)	17
	MeOH (A.V)	0		
	Hexane (A.M)	0		
	MeOH (A.M)	0		
<i>Salmonella</i>	Hexane (A.V)	0	Chloramphénicol (30µg/ml)	15
	MeOH (A.V)	0		

Résultats et discussion

	Hexane (A.M)	0		
	MeOH (A.M)	0		
<i>Staphylococcus</i>	Hexane (A.V)	0	Chloramphénicol (30µg/ml)	8
	MeOH (A.V)	0		
	Hexane(A.M)	0		
	MeOH (A. M)	0		
<i>Micrococcus luteus</i>	Hexane (A.Vv)	13	Chloramphénicol (30µg/ml)	40
	MeOH (A.V)	0		
	Hexane(A. M)	0		
	MeOH (A.M)	0		
<i>Basillus subtilis</i>	Hexane (A.V)	0	Pénicilline (10µg/ml)	30
	MeOH (A.V)	0		
	Hexane(A.M)	0		
	MeOH (A. M)	0		

La zone d'inhibition de l'extrait hexanique de *l'A. visnaga* a une concentration égale à 10 µg/ml atteint 13mm pour les *micrococcus* ; celle de l'antibiotique à une concentration de 30µg atteint 40mm.

Le pourcentage d'inhibition qui atteint 97.5% montre l'efficacité antibactérienne de l'extrait hexanique de *l'A. visnaga*. Cette activité a été mise en évidence aussi par son huile essentielle [26]

La présence de l'activité antibactérienne dans l'extrait hexanique très apolaire, confirme la faible polarité de la substance responsable.

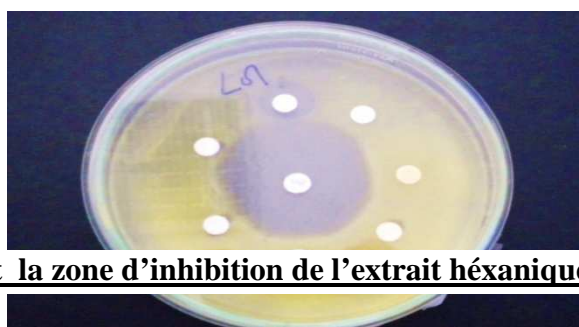


Figure 33 : photo décrit la zone d'inhibition de l'extrait hexanique de *l'A. visnaga* sur les *Micrococcus*

Conclusion et perspectives

L'objet de notre étude est porté sur l'étude phytochimique de deux espèces épiphytiques marocaines (*Ammi visnaga*, *Ammi majus*) de la région de Taounate, utilisés pour le traitement de plusieurs pathologies.

Au cours de notre étude on a pu isoler des métabolites secondaires majoritaires, la khellin responsable permet le traitement de l'insuffisance coronarienne, l'asthme, et psoriasis, la Myristicin poison induisant la neurotoxicité. des esters naturels et synthétisés

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectrométrie de masse (SM), la chromatographie à phase gazeuse couplée au spectrométrie de masse (CGSM) et la spectroscopie de résonance magnétique (RMN).

Une étude de l'activité antibactérienne a été effectuée pour évaluer le pouvoir antimicrobien de nos plantes vis-à-vis des souches souvent ayant des effets nuisibles sur la santé de l'homme.

Références bibliographiques

- [1] Grazyna Zgorka et al *Determination of furanochromones and pyranocoumarins in drugs and Ammi visnaga fruits by combined solid-phase extraction–high- performance liquid chromatography and thin-layer chromatography–high-performance liquid chromatography*, *Journal of chromatography* 1998.
- [2] A.Y. El-Etre, Khillah .extract as inhibitor for acid corrosion of SX 316 steel, *elsevier* 2005
- [3] F. M. Hammouda, et al. *A Guide to Medicinal Plants in North Africa* 2005
- [4] Jean-Paul Ortonne, *Psoralen Therapy in Vitiligo volume 7 Number 2* 1989
- [5] M. HANI A. ELGAMAL et al, *COUMARINS AND COUMARIN GLUCOSIDES THE FRUITS OF AMMI MAJUS FROM Phytochemistry, VoL 34, No. 3, pp. 819-823, 1993 .*
- [6] Michelline Marie Regina KANSOLE, *ETUDE ETHNOBOTANIQUE, PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DE QUELQUES LAMIACEAE DU BURKINA FASO : CAS DE LEUCAS MARTINICENSIS (Jacquin) R. Brown, HOSLUNDIA OPPOSITA Vahl ET ORTHOSIPHON PALLIDUS Royle ex Benth.* doctorat 2009
- [7] Colette EKOUMOU. *ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE DE 5 RECETTES TRADITIONNELLES UTILISEES DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS URINAIRES ET DE LA CYSTITE.* 2003
- [8] Goupy et al *Antioxidant composition and activity of barley (Hordeum vulgare) and malt extracts and isolated phenolic compounds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 1625-1634 (1999)*
- [9] [Botsoglou et al., 1994](#) N.A. Botsoglou, D.J. Fletouris, G.E. Papageorgiou, V.N. Vassilopoulos, A.J. Mantis and A.G. Trakatellis, Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42** (1994), pp. 1931–1937.
- [10] [Miller et al., 1996](#) N.J. Miller, J. Sampson, L.P. Candeias, P.M. Bramley and C.A. Rice-Evans, Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, *FEBS Letters* **384** (1996), pp. 240–242.
- [11] Elise PORTES , *Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle*
- [12] Scartezzini, P et al, *Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. Journal of Ethnopharmacology, 71, 23-43 (2000)*
- [13] Prior, R et al *Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51, 3273-3279 (2003)*
- [14] Benzie, I et al, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239, 70-76 (1996)*
- [15] Abdelhak Mansouri, et I, *Institut National de Protection des Vegetaux, Avenue Pasteur, BP 80 El Harrach Alger, Algeria, Section of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, School of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54006 Thessaloniki, Greece* 25 February 2004
- [16]- [Sánchez-Moreno](#), et al, *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture 76, pp. 270–276. 1998.*
- [17] Patrick aprino, *couplage chromatographie avec spectrometrie de masse.*
- [18] Latifou LAGNIKA, *ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DE SUBSTANCES NATURELLES ISOLEES DE PLANTES BENINOISES*
- [19] René lafont *Multimédia - Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie, juin 2008*
- [20] mryem bricha, *composition chimique et activité antalgique de quelque plantes utilisés au maroc mastér ,2008*

Références bibliographiques

- [21] Mogode Debete Judith Etude phytochimique et pharmacologique da cassia nigricans Vahl (*Caesalpiniaceae*) pour le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de doctorat 2005
- [22] J.Lemmichet *al* *REVISED ABSOLUTE CONFIGURATIONS OF NATURAL KHELLACTONE ESTERS*, Pergamon Press. Printed in Great Britain.1969.
- [23] Jean louis pousset ,*les plantes médicinales africaines, tome 2 page 26*
- [24] Reguia Bencheraiet, *Flavonols and Antioxidant Activity of Ammi vi snaga L. (Apiaceae) record of natrural product 2010.*
- [25] U.stein *et al* ,*nutmeg,myristicin,poisoning,report in fatalcase and series recorded by poison information centre.*
- [26] A. LAMARTI *et al*, *ÉTUDE DES ARYLPROPÈNES EXTRAITS DEL'HUILE ESSENTIELLE DES FRUITS DE*

