

Caractérisation des flavonoïdes des feuilles d'Arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels, Sapotaceae) et étude de leur activité antimicrobienne

Adil EL KABOUSS ^{1a}, Zoubida CHARROUF ¹, Hicham OUMZIL ², Mohamed FAID ², Driss LAMNAOUER ³, Yoko MIYATA ⁴ & Kazumoto MIYAHARA ⁴

(Reçu le 22/05/2000 ; Accepté le 23/10/2000)

مميزات الفلافونويدات المستخلصة من أوراق شجرة الأركان

أربعة فلافونويدات هي الكيرستين و الميرستين و الكيرستين و الميرستين تم عزلها و استخلاصها من أوراق شجرة أركان المغربية (أركانياسبينوزا، فصيلة الصبوتاسيات). هذه الفلافونويدات الأربعة تم فصلها بالطرق الكروماتوغرافية الجاري بها العمل، و التعرف على تركيبتها الكيميائية بواسطة الخاصيات السبكتروسكوبية التالية (الأشعة ما فوق البنفسجية، التحليل الطيفي للمادة، وتقنية الرنين المغناطيسي للكربون ¹³C و الهيدروجين ¹H). وقد أبانت الميرستين و الميرستين عن فعالية ضد جرثومية جد مهمة باتجاه البكتيريا على خلاف الخمائر.

الكلمات المفتاحية : النباتات الطبية - شجرة أركان (أركانياسبينوزا) - الفلافونويدات - التركيبة الكيميائية - نشاط ضد الميكروبات - الصبوتاسيات

Caractérisation des flavonoïdes des feuilles d'Arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels, Sapotaceae) et étude de leur activité antimicrobienne

Quatre flavonoïdes, la quercétine, la myricétine, la quercétrine et la myricétrine ont été isolés à partir des feuilles d'*Argania spinosa* (L.) Skeels, Sapotaceae. Ces composés ont été séparés à l'aide de méthodes chromatographiques usuelles et identifiés sur la base de leurs caractéristiques spectroscopiques (UV, SM, RMN ¹H et ¹³C). La myricétine et la myricétrine ont montré une activité anti-microbienne plus importante contre les bactéries que contre les levures.

Mots clés : Plantes médicinales - *Argania spinosa* - Sapotacea - Flavonoïdes - Éluclidation structurale - Activité anti-microbienne

Chemical and microbiological study of the *Argania spinosa* (L.) Skeels, Sapotaceae flavonoids leaves

Four flavonoids were isolated from the leaves of *Argania spinosa* (L.) Skeels, Sapotaceae. Their chemical structure was elucidated as quercetin, myricetin, quercetrin and myrecitrin, by spectral data (UV, MS, RMN ¹H and ¹³C). Their antimicrobial activity was studied and showed that myricetin and myrecitrin were more active on bacteria than on moulds.

Key words : Medicinal plants - *Argania spinosa* - Sapotacea - Flavonoids - Structure elucidation - Microbial activity

¹ Laboratoire de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bioorganique. Université Mohammed V, Faculté des Sciences B.P 1014, Rabat, Maroc

² Département de Microbiologie Alimentaire et Biotechnologie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. BP 6202-Instituts, 10101 Rabat, Maroc

³ Département de Pharmacie-Toxicologie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. BP 6202-Instituts, 10101 Rabat, Maroc

⁴ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, Nagaotoge-Cho, Hirakata Osaka, 573-01 Japon

^a Auteur correspondant, e-mail : ad20@caramail.com

INTRODUCTION

L'Arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) est un arbre endémique jouant un rôle socio-économique et environnemental très important dans le sud-ouest marocain. Il couvre une superficie de 828 000 ha et constitue la deuxième essence forestière au Maroc après le chêne-vert. L'huile d'argan est utilisée dans l'alimentation humaine et dans la médecine traditionnelle. Le bois sert de combustible, les feuilles et la pulpe du fruit constituent un fourrage pour les camelins et caprins.

Pour contribuer à la préservation de l'Arganeraie, patrimoine forestier, des recherches ont été entreprises pour valoriser les produits de l'arganier (Charrouf *et al.*, 1991 ; 1992 ; 1999 ; Oulad-Ali *et al.*, 1996).

Dans ce travail, on se propose d'étudier l'activité anti-microbienne des flavonoïdes des feuilles de l'arganier.

MATÉRIEL & MÉTHODES

1. Matériel végétal

Les feuilles d'arganier étudiées proviennent de la région d'Agadir au Maroc. Elles ont été récoltées et identifiées en février 1998. Un spécimen a été déposé à l'Institut Scientifique de Rabat sous le n° RAB 62064 .

2. Extraction des flavonoïdes

200 g du matériel végétal ont été extraits par macération à froid dans un mélange méthanol-eau (1:1,v/v). L'extrait hydro-alcoolique a été ensuite évaporé à sec, repris à l'eau et extrait à l'éther. L'extrait éthéré a été chromatographié sur couche mince de gel de polyamide. Après filtration sur gel LH 20, deux flavonols purs ont été isolés : la quercétine ($m < 1\text{mg}$) et la myricétine ($m < 1\text{mg}$).

Par ailleurs, 200 g de poudre de feuilles ont été extraits par percolation au méthanol pour donner après évaporation, un résidu solide de 15 g. Ce dernier a été dissout dans le MeOH et un excès de Et₂O d'éther éthylique lui a été ajouté. La fraction insoluble dans l'éther a été dissoute dans l'eau puis chromatographiée sur une colonne ouverte de Diaon HP 20. La purification de la fraction flavonoïdique sur colonne ouverte de gel de silice suivie par filtration sur gel LH 20 a fourni deux produits purs : la quercétrine (24,5 mg) et la myricétrine (33 mg).

3. Analyses physico-chimiques

L'identification a été accomplie selon des méthodes spectroscopiques usuelles (UV, SM, RMN ¹H et ¹³C). Les spectres UV ont été enregistrés à l'aide d'un appareil Perkin Elmer (Lambda 3). Les réactifs de déplacement ont été préparés selon la méthode de Mabry *et al.* (1970).

Les spectres de masse SM ont été obtenus à l'aide d'un appareil Delsi Mermag. Les spectres RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés à l'aide d'un appareil Joël GSX-400MHZ dans le DMSO-d₆ .

4. Activité anti-microbienne

Pour évaluer l'activité anti-microbienne des composés flavonoïdiques, la méthode de contact direct en milieu solide et en milieu liquide a été utilisée. Les tests ont été réalisés sur 9 bactéries et 2 levures, afin d'avoir une idée sur l'étendue du champ d'action des extraits aqueux et méthanolique et notamment la myricétine et la myricétrine.

5. Micro-organismes

Les micro-organismes isolés et identifiés proviennent de la Collection du laboratoire du Pr Faïd à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat : Bactéries Gram positif : *Staphylococcus aureus* (3 souches), *Streptococcus sp* (2 souches), *Enterococcus sp* (1 souche).

Bactéries Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* (3 souches), *Escherichia coli* (2 souches), *Citrobacter freundii* (2 souches), *Proteus mirabilis* (2 souches), *Klebsiella pneumoniae* (2 souches), *Enterobacter cloacae* (1 souche). Levures : *Candida albicans* (2 souches), *Candida glabrata* (1 souche)

6. Milieux de culture

Les bactéries sont cultivées sur milieu Muller Hinton gélosé (Beckton Dickinson) pour la technique sur milieu solide et le BHI (Beckton Dickinson) "Brain Heart Infusion" pour la technique sur milieu liquide. Pour les levures, le milieu de Sabouraud a été utilisé.

7. Préparation des suspensions de micro-organismes

Les souches sont d'abord activées sur milieu liquide (Bouillon nutritif pour les bactéries et Bouillon de Sabouraud pour les levures). Les suspensions de micro-organismes ont été préparées à partir des bouillons d'enrichissement des différentes souches incubées pendant 24 h, à

37°C pour les bactéries et à 30°C pour les levures. À 9 ml d'eau physiologique stérile, on ajoute 100 ml du bouillon.

8. Technique en milieu solide (méthode de diffusion en milieu gélosé)

Les boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé sont ensemencées par inondation de la surface par la suspension de la souche microbienne à étudier. Le surplus de la suspension est éliminé. Les boîtes sont ensuite séchées pendant 15 minutes à 37°C à l'étuve.

À l'aide d'un emporte-pièce stérile, on pratique des cavités dans la gélose, ensuite chaque cavité est remplie par 50 ml du produit à tester. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pour les bactéries et à 30°C pour les levures pendant 24 h.

L'activité inhibitrice du produit se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits. Elle est considérée comme positive pour tout produit donnant un diamètre d'inhibition supérieur à 8 mm.

Tous les essais sont réalisés en double.

9. Technique en milieu liquide

On utilise des microplaques de titration stériles (A/S Nunc Denmark). Dans chaque puits, on verse 80 µl du milieu de culture liquide (BHI pour les bactéries et Sabouraud pour les levures) auquel on ajoute 90 µl du produit à tester.

Chaque cavité est ensuite ensemencée par 10 µl de la suspension microbienne. Après 24 h d'incubation à la température optimale, le contenu de chaque puits est réensemencé par touche sur milieu solide. Un enseigneur est chargé par trempage dans les puits de la plaque, puis transféré avec précaution au niveau de la boîte de Pétri afin d'ensemencer chaque cupule de la microplaque.

L'activité inhibitrice positive du produit se manifeste par l'inhibition de la croissance du micro-organisme sur le point de la touche de l'inoculateur.

10. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

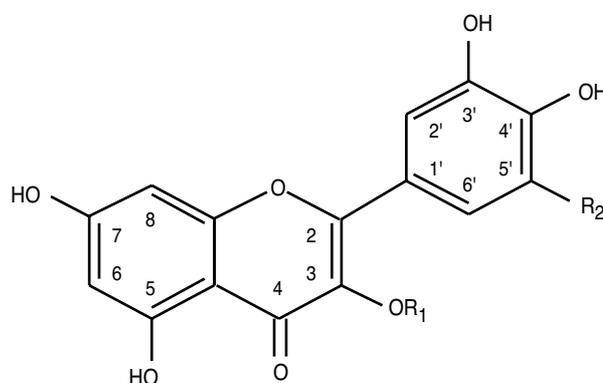
Pour la détermination des CMI, on a eu recours à deux techniques : une en milieu solide (ou méthode de diffusion sur gel) et une en milieu liquide décrites précédemment.

Dans les deux cas, 20 g de feuilles d'arganier ont été respectivement dissoutes dans 160 ml d'eau et 100 ml de méthanol, pour obtenir des extraits à dilutions finales allant de 1/8 jusqu'à 1/640 pour l'extrait aqueux et de 1/5 jusqu'à 1/640 pour l'extrait méthanolique.

Pour les levures, les CMI dues à la myricétine et à la myricétrine ont été évaluées uniquement par la méthode sur milieu solide

RÉSULTATS & DISCUSSION

Quatre flavonoïdes des feuilles d'*Argania spinosa* ont été isolés. Les différentes structures sont illustrées comme suit :



- 1** : R₁= H, R₂= H Quercétine
2 : R₁= H, R₂= OH Myricétine
3 : R₁= Rha, R₂= H Quercétrine
4 : R₁= Rha, R₂= OH Myricétrine

1. Identification des structures chimiques

Les données spectrales en UV observées pour les quatre produits sont conformes à celles de la littérature (Mabry *et al.*, 1970 ; Aumento Rubio *et al.*, 1988). Les réactifs de déplacements confirment bien la présence du 3,5-dihydroxy-flavonol et des groupements hydroxyles libres sur le noyau B, selon la structure ci-dessus, pour les composés **1** et **2** alors que pour **3** et **4** la position trois est bloquée par un sucre, le rhamnose.

Les principales fragmentations en spectroscopie de masse par impact électronique (SM/EI) des quatre flavonoïdes isolés sont regroupées dans le tableau 1.

Les déplacements chimiques obtenus par RMN ¹H pour les principaux protons des quatre flavonoïdes (Tableau 2) sont conformes à ceux qui sont rapportés par la littérature (Aumento Rubio *et al.*, 1988 ; Markham, 1982).

Les valeurs spectroscopiques de la RMN ¹³C de la quercétrine et de la myricétrine (Tableau 3) sont similaires à celles qui sont trouvées par Markham (1982) et Harwig *et al.* (1990). Nos résultats spectroscopiques sont tous en accord avec les données de Harwig *et al.* (1990) et de Agrawal & Markham (1989).

2. Activité antimicrobienne

En premier lieu, l'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanolique des feuilles de

l'arganier a été testée sur différentes souches bactériennes (Tableau 4).

La lecture des CMI obtenues pour les différentes souches bactériennes étudiées aboutit aux résultats suivants :

- La CMI déterminée par la méthode des microplaques (liquide) est plus faible que celle obtenue par la méthode d'inhibition sur milieu solide et ce, aussi bien pour les bactéries Gram positif que pour les bactéries Gram négatif.

Tableau 1. Principales fragmentations (SM/EI) des quatre flavonoïdes isolés

Composés	m/z
Quercétine	302, 274, 153, 137, 91
Myricétine	318, 290, 153, 91
Quercétrine	448, 302, 274, 153, 137, 91
Myricétrine	464, 318, 290, 153, 91

Tableau 2. RMN ¹H des quatre flavonoïdes

	Quercétine		Myricétine		Quercétrine		Myricétrine	
H-6	6,18	(d,J=1,8 Hz)	6,18	(d,J=1,8 Hz)	6,21	(d,J= 1,8 Hz)	6,20	(d,J= 1,8 Hz)
H-8	6,44	(d,J=1,8 Hz)	6,37	(d,J=1,8 Hz)	6,39	(d,J= 1,8 Hz)	6,37	(d,J= 1,8 Hz) 6,89 (s)
H-2'	7,67	(d,J=2,2 Hz)	7,24	(s)	7,31	(d,J= 2,2 Hz)	6,89	(s)
H-5'	6,87	(d,J=8,0 Hz)	7,24	(s)	6,87	(dd,J= 8,3 Hz)		5,26
H-6'	7,54	(dd,J=2,2; 8,0 Hz)			7,26	(d,J= 8,3 Hz)		0,82
Rha-1						5,26		
Rha-2						0,82		

Tableau 3. RMN ¹³C de la quercétrine et de la myricétrine

 Quercétrine Myricétrine	
	Observée	Littérature		Observée	Littérature
C-2a	157,2	157,7	C-2	156,4	156,4
C-3	134,1	134,6	C-3	134,3	134,5
C-4	177,6	178,0	C-4	134,1	134,6
C-5	161,2	161,6	C-5	177,8	177,7
C-6	98,6	99,0	C-6	99,0	98,7
C-7	164,1	164,4	C-7	164,1	164,1
C-8	93,5	93,9	C-8	93,5	93,5
C-9a	156,4	156,7	C-9	157,5	157,4
C-10	103,9	104,5	C-10	104,0	104,2
C-1'	121,0	121,4	C-1'	116,0	119,9
C-2'b	115,5	116,1	C-2'	107,9	108,2
C-3'	145,1	145,4	C-3'	145,7	145,8
C-4'	148,3	148,7	C-4'	136,4	136,5
C-5'b	115,3	115,9	C-5'	145,7	108,2
C-6'	120,6	121,2	C-6'	107,9	145,8
Rha1	101,7	102,2	Rha1	101,9	102,2
Rha2c	70,5	70,8	Rha 2 a	70,4	70,5
Rha3c	70,2	70,8	Rha 3 a	70,5	70,6
Rha4c	69,9	70,4	Rha 4	71,0	71,5
Rha5	71,1	71,7	Rha 5	70,0	70,1
Rha6	17,3	17,8	Rha 6	17,5	17,8

a, b et c valeurs interchangeables

- Les bactéries Gram positif et Gram négatif semblent être plus sensibles à l'extrait méthanolique qu'à l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique étant plus riche.

Tableau 4. Détermination de la CMI (en mg/ml) des extraits méthanolique et aqueux pour les bactéries à Gram positif et à Gram négatif

Bactéries	Souches	Extrait méthanolique		Extrait aqueux	
		M.s.* CMI	M.l.* CMI	M.s.* CMI	M.l.* CMI
Escherichia coli	Ec ₁	3,125	1,56	ND	ND
	EC ₂	3,125	1,56	ND	ND
Proteus mirabilis	Pm ₁	6,25	1,56	6,25	1,56
	PM ₂	6,25	1,56	6,25	1,56
Pseudomonas aeruginosa	Pa ₁	6,25	3,12	31,25	7,81
	Pa ₂	6,25	3,12	31,25	7,81
	Pa ₃	6,25	3,12	31,25	15,62
Citrobacter freundii	Cf ₁	6,25	3,12	15,62	7,81
	Cf ₂	6,25	3,12	15,62	7,81
Serratia marsescens	Sm ₁	12,5	6,25	31,25	ND
	Sm ₂	6,25	3,12	31,25	ND
Enterobacter cloacae	Et ₁	6,25	3,12	15,62	ND
Staphylococcus aureus	Sta ₁	3,12	1,56	3,12	1,56
	Sta ₂	3,12	1,56	3,12	1,56
	Sta ₃	3,12	1,56	6,25	1,56
Streptococcus sp.	Sp ₁	6,25	1,56	6,25	1,56
	Sp ₂	6,25	1,56	6,25	ND
Enterococcus sp.	Et ₁	6,25	ND	6,25	ND

* M.s. : Milieu solide ; M.l. : Milieu liquide ; CMI en mg/l

L'analyse des résultats préliminaires des extraits aqueux et méthanolique, ainsi que la recherche de nouveaux produits pharmacophores, nous a poussé à étudier l'activité antibactérienne de deux produits isolés à l'état pur, la myricétine et la myricétrine.

Les CMI ont été évaluées uniquement par la méthode sur milieu solide sur six souches (Tableau 5).

Les résultats obtenus (Tableau 5) montrent clairement que, pour tous les organismes testés, la myricétrine présente un pouvoir antibactérien (CMI = 0,5 mg/ml) plus élevé que celui de son aglycone non rhamnosylé, la myricétine (0,6 < CMI < 2,5 mg/ml).

L'activité antibactérienne de la myricétrine est particulièrement notable sur les streptocoques et les entérocoques.

Tableau 5. Détermination de la CMI de la myricétine et de la myricétrine pour les bactéries Gram positif et Gram négatif

Bactéries	Souches	Myricétine CMI en mg/ml	Myricétrine CMI en mg/ml
Escherichia coli	Ec ₁	2,5	0,5
	Ec ₂	0,625	0,5
Proteus mirabilis	Pm ₁	2,25	0,5
	Pm ₂	2,25	0,5
Klebsiella pneumonia	Kp ₁	0,625	0,25
	Kp ₂	0,625	0,5
Staphylococcus aureus	Sta ₁	0,625	0,5
	Sta ₂	0,625	0,5
	Sta ₃	1,25	0,5
Streptococcus sp.	Sp ₁	2,5	0,5
Enterococcus sp.	Sp ₂	2,5	0,5
	Et ₁	2,5	0,5

Aucun extrait, méthanolique ou aqueux, n'a donné une activité antimicrobienne sur les levures. Il en est de même pour la quercétine et la myricétine à l'état pur. Les levures sont donc plus résistantes à ces substances que les bactéries (Tableau 6).

Tableau 6. Détermination de la CMI pour les levures par la technique en milieu solide

Levures	Souches	EM* CMI (mg/ml)	EA* CMI (g/ml)	Myricétine CMI (mg/ml)	Myricétrine CMI (mg/ml)
Candida albicans	Ca ₁	>12, 5	>31, 25	>5	>1
	Ca ₂	>12, 5	>31, 25	>5	>1
Candida glabrata	Cgl ₁	>12, 5	>31, 25	>5	>1

* EM : Extrait méthanolique ; EA : Extrait aqueux

CONCLUSION

L'extrait hydro-alcoolique des feuilles d'arganier contient quatre flavonoïdes isolés à l'état pur : la quercétine, la myricétine, la quercétrine et la myricétrine. Ces composés ont été séparés à l'aide de méthodes chromatographiques usuelles et identifiés sur la base de leurs caractéristiques spectroscopiques (UV, SM, RMN ¹H et ¹³C).

Les extraits aqueux et méthanolique ainsi que la myricétine et la myricétrine sont doués d'activités antibactériennes intéressantes. Ces propriétés confèrent aux flavonoïdes naturels la possibilité d'être utilisés de manière efficace dans de nombreuses applications.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la contribution du Centre de Recherches pour le Développement International (CRDI) Canada.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Agrawal P.K. & Markham K.R. (1989) Carbon ¹³ NMR of flavonoids, Ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 1-40
- Aumento Rubio M.D., Ayuso Gonzales M.J., Garcia Gimenez M.D. & Toro Sainz M.V. (1988) Les flavonols isolés d'*Erica andevalensis* Cabezudo-Ribera: Contribution à l'activité antimicrobienne de l'espèce. *Plantes Médicinales et Phytothérapie* 22 (2): 113-118
- Charrouf Z. & Guillaume D. (1999) Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *Journal of Ethnopharmacology* (67) : 7-14
- Charrouf Z., Fkih-Tétouani S., Charrouf M. & Mouchel B. (1991) Triterpènes et stérols extraits de la pulpe d'*Argania spinosa* (L.) Sapotaceae *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, XXV (2-3) : 112-117
- Charrouf Z., Wieruzeski J.M., Fkih-Tétouani S., Charrouf M. & Fournet B. (1992) Triterpenoïd from *Argania spinosa* . *Phytochemistry* 31 (6) : 2079-2086
- Harwig S., Klaus G. & Honnelore W. (1990) Flavonol Glycosids from *Moghania faginea*. *Planta Medica* 56 : 410-413
- Mabry T.J., Markham K.R. & Thomas M.K. (1970) The systematic Identification of flavonoids, Spring - Verlag, Berlin
- Markham K.R. (1982) Techniques of flavonoids Identification. Ed. Academic Press, London, 36-51.
- Oulad-Ali A., Kirchner V., Lobstein A., Weniger B., Charrouf M., Anton R., Guillaume D. & Charrouf Z. (1996) Structure elucidation of three glycosides from the trunk of *Argania spinosa*. *Journal of Natural Products* (59) : 193-195