

UNIVERSITE MOHAMED KHIDER BISKRA
FACULTE DES SCIENCES EXACTES ET SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE



Thèse de Doctorat en Chimie
Option : Chimie Organique et Phytochimie

Présentée par : Mme FETTAH Asma

Intitulée

**Étude phytochimique et évaluation de l'activité
biologique (antioxydante - antibactérienne) des
extraits de la plante *Teucrium polium* L. sous espèce
Thymoïdes de la région Beni Souïk, Biskra**

Soutenue le 12/06/2019 devant la Commission d'Examen :

BELAIDI	Salah	Prof.	Univ. Biskra	Président
LAMARA	Kaddour	Prof.	Univ. Oum El Bouaghi	Directeur de thèse
LANEZ	Touhami	Prof.	Univ. El Oued	Examineur
HARKATI	Dalal	MCA	Univ. Biskra	Examineur

Remerciements

«Louanges à ALLAH le tout puissant qui m'a aidé durant toute ma vie»

Au terme de ce travail il m'est agréable de remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à sa réalisation et notamment celles dont les noms ne figurent pas sur cette page.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de chimie organiques du département de science de la matière, de la Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Med Khider Biskra.

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Mr **Kaddour LAMARA**, Professeur à l'Université l'Arbi Ben M'hidi Oum El Bouaghie. Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance ainsi que ma gratitude pour sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche. Ce fut un honneur de travailler avec vous. Mon grand respect.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Mr **Salah BLAIDI** professeur à l'université de Biskra pour ses conseils prodigués et pour m'avoir fait honneur de présider le jury de cette thèse.*

*Je remercie très sincèrement Mr **Touhami LANEZ** professeur à l'université d'Eloued et Mme **Dalal HARKATI** maitre de conférences A à l'université de Biskra qui ont accepté d'évaluer le présent travail. J'ai été très sensible à l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger cette thèse. Je tiens à leur exprimer mes respectueuses grâces et considérations.*

*Toutes mes expressions de respect et de gratitude au Mr **Mohamed KECHEBAR** pour m'avoir autorisé d'effectuer quelques manipulations dans son laboratoire de phytochimie au centre de recherche scientifique et techniques sur les régions arides CRSTRA. Ainsi que son équipe de recherche : Mme **Samira KAROUNE**, Mr **Haroun FADHLAOUI**, Mme **Mawaheb DJEDIDI** et Mme **Hadjer GUESMIA**, pour leurs précieux conseils et leur collaboration fructueuse.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Mme **Naima BENCHIKHA** maitre de conférence A à l'Université de Hama Lakhder Eloued pour m'avoir aidée à identifier quelques composés.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à tous et toutes mes collègues et très particulièrement **Z. NICIRA**, **H. BELMECHICHE**, **S. SEGUIRI** à l'Université de Biskra, pour leur aide et leur encouragement, ainsi que pour l'attention qu'elles ont bien voulu porter à ce travail.*

De plus, mes remerciements vont également aux enseignants et aux personnels du département de la science de la matière et du laboratoire de chimie.

Enfin, ne pouvant citer tous ceux et celles qui m'ont été d'un apport petit ou grand, je leur adresse mes remerciements les plus sincères.

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents, à ma mère et mon père. Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement tout au long de ma vie.

À mon mari Dr R. MAKHLOUFI, en signe d'amour et de gratitude pour ces sacrifices, ces encouragements en vue de l'achèvement de ce travail.

À mes très chères filles : Sirine, Narmine et Yasmine

À mes frères. À mes sœurs. À toute ma famille de près ou de loin.

À mes collègues

À tous ceux qui me connaissent

À tous ceux qui aiment la science

Je dédie ce modeste travail.

ملخص

يعد هذا العمل مساهمة في تثمين النباتات الطبية المستخدمة في الطب البديل و غايته البحث عن المركبات النشطة بيولوجيا والموجودة في بنة طبية من لالة التوكريوم "Teucrium polium L."، الولة الاعمال عند الجزائريين و التي تنتمي للعائلة الشفوية "Lamiaceae". لقد تم قطفها من منطقة بني ويك بولاية بسكرة و تتميز هذه الأخيرة بفضائل علاجية عديدة.

يتعلق الجزء الأول من هذه الدراسة، بالفحص الكيميائي النباتي و تخلاص الزيوت الألية والبوليفينول، فضلاً عن التقدير الكمي لهذه المواد و ذلك عن طريق الفحص اللوي للبوليفينول الكلي والفلافويدات والعفص المتكثف بالاعمال كاشف فولين و يوكاليو و تراي كلوريد الألومنيوم واختبار الفايولين على التوالي. لقد أظهرت النتائج المتحصل عليها ثراء هذا النوع من النبات بمختلف مركبات الأيض الثاوي و خاصة البوليفينول و الفلافويدات. كشف التحليل النوعي بالاعمال طرق الكروماتوغرافية (TLC و HPLC) عن احتواء هذا النبات على عدة مركبات الألية أهمها: حمض الأوكوربيك و حمض الغاليك و حاض الكلوروجينيك و الكافيين و الكيرالين و الفايولين و بيتا كومارين و الروتين.

يهدف الجزء الثاني الى دراسة النشاط البيولوجي للمستخلصات المحضرة من "Teucrium polium L." (الزيوت الألية والبوليفينول). فلقد أظهر تقييم شاط مضادات الأوكسدة بولة طريقة احتباس الجذور الحرة DPPH، أن جميع المستخلصات المدروسة لديها خصائص مضادة للأوكسدة على مستويات مختلفة و تم تقديرها ب: 50IC عند مستخلص أيتات الإيثيل 41,47 ميكروغرام/ مل و 47,56 ميكروغرام/ مل لمستخلص البوتايول و 149,92 ميكروغرام/ مل للمستخلص المائي. وعليه فان مستخلص أيتات الإيثيل يعتبر أقوى مضاد للأوكسدة مقارنة بالمستخلصات الأخرى. أما الزيت العطري لهذه النبة فقد أعطى شاط منخفض بالمقارنة مع الأواع الأخرى لتوكريوم Teucrium والذي بلغت قيمته 1250 ميكروغرام/ مل.

تم تقييم تأثير المضاد للجراثيم في المختبر بولة طريقة الاشار لمولر هينتون، بالاعمال المضادات الحيوية القياسية والتخفيف الجزئي وذلك في واط وائل، و د ثمانية لالات بكتيرية مرجعية. أظهرت النتائج أن الزيوت الألية لهذا النبات تملك شاطاً ممتازاً و هذه الكائنات الحية الدقيقة مقارنة مع المستخلصات الفينولية. إن تحديد الحد الأدنى للتراكيز المثبطة للجراثيم (MIC و CMB) للزيوت الألية والبوليفينول، يسلس الضوء على التأثير الجرثومي لهذه المستخلصات بتصنيفها كعوامل مضادة للجراثيم من فئة "مبيد للجراثيم".

الكلمات المفتاحية: التوكريوم (Teucrium polium L.) - الشفوية (Lamiaceae) - الزيوت الألية - البوليفينول - النشاط مضادات الأوكسدة - شاط مضاد للجراثيم.

Abstract

This work is a contribution to the valorization of medicinal plants, used in traditional medicine. Its objectives are the research and the study of new biologically active agents, resulting from the medicinal plant: *Teucrium Polium L.* subspecie **thymoides** of the **Lamiaceae** family, which is very used by the Algerian population. Cultivated in Beni souik region in the wilaya of Biskra , it is known as an important therapeutic virtues' plant.

The first part of this study concerns phytochemical screening, extraction and quantification of total polyphenols, flavonoids and tannins condensed by Folin-Ciocalciu reagent, aluminum trichloride and vanillin test respectively. The results obtained show the species' richness in secondary metabolites and particularly in flavonoid polyphenols

A combination of chromatographic methods (TLC and HPLC), revealed the presence of some compounds in this plant such as ascorbic acid, gallic acid, chlorogenic acids, caffeine, quercetin, vanillin, beta-coumarin and rutin.

The second part is the biological activity study of prepared extracts of *Teucrium polium L.* (essential oil and polyphenols). The evaluation of the antioxidant activity by the DPPH free-radical scavenging method, showed that all the extracts of the studied plants have antioxidant properties at different levels. The IC₅₀ was estimated at **41.47** µg / ml for the ethyl acetate extract, **47.56** µg / ml for the butanolic extract and **149.92** µg / ml for the aqueous extract. So the ethyl acetate extract has a greater antioxidant power than the other extracts. The essential oil has a low activity compared to the other *Teucrium* species with a value of **1250** µg / ml.

The antibacterial effect was evaluated in vitro by the Mueller Hinton agar diffusion method, using standard antibiogram and micro-dilution in a liquid medium; with a respect to eight reference bacterial strains. The results show that the essential oil of this plant has shown an excellent activity against these microorganisms in comparison with phenolic extracts.

The determination of minimum inhibitory concentrations (MIC), minimal bactericidal concentrations (CMB), polyphenols and essential oil, highlight the bacteriostatic effect of these extracts, to classify them as antibacterial agents class "bactericidal".

Keywords: *Teucrium polium L.*, lamiaceae (labiae), essential oils, polyphenols, antioxidant activity, antibacterial activity.

Résumé

Ce travail est une contribution à la valorisation des plantes médicinales, utilisées en médecine traditionnelle. Il a pour objectifs la recherche et l'étude de nouveaux agents biologiquement actifs, issus d'une plante médicinale très utilisée par la population algérienne qui est *Teucrium Polium L.* sous espèce *Thymoïdes* de la famille **Lamiaceae**. Cultivée dans la région de Beni souik de la wilaya de Biskra. Elle est considérée comme une plante ayant des vertus thérapeutiques importantes.

La première partie de cette étude concerne le screening phytochimique, l'extraction des huiles essentielles et des polyphénols, ainsi que la quantification de ces derniers par dosage colorimétrique des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés par le réactif du Folin-Ciocalcu, par le trichlorure d'aluminium et par le test de vanilline respectivement. Les résultats obtenus montrent la richesse de cette espèce en métabolites secondaires et particulièrement en polyphénols flavonoïdes.

L'analyse par des techniques chromatographiques (CCM et HPLC), a permis de révéler la présence de quelques principaux composés dans cette plante, tels que l'acide ascorbique, gallique, chlorogénique, caféique, quercétine, vanilline, bêta coumarine et rutine.

La deuxième partie fait l'objet de l'étude de l'activité biologique des extraits préparés de *Teucrium polium L.* (huile essentielle et polyphénols). L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, a montré que tous les extraits de la plante étudiée, présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux. La **IC₅₀** a été estimée à **41,47** µg/ml pour l'extrait acétate d'éthyle, **47,56** µg/ml pour l'extrait butanolique et de **149,92** µg/ml pour l'extrait aqueux. L'extrait acétate d'éthyle exprime donc, un pouvoir antioxydant plus grand que les autres extraits. L'huile essentielle présente une faible activité par rapport aux autres espèces de *Teucrium* avec une valeur de **1250** µg/ml.

L'effet antibactérien a été évalué, in vitro, par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton, en utilisant l'antibiogramme standard et la micro-dilution en milieu liquide ; vis à vis des huit souches bactériennes de référence. Les résultats montrent que l'huile essentielle de cette plante a manifesté une excellente activité contre ces microorganismes, à comparer avec celle des extraits phénoliques.

La détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB) de l'huile essentielle et des polyphénols, met en évidence l'effet bactériostatique de ces extraits, permettant de les classer comme agents antibactériens classe "*bactéricides*".

Mots clés : *Teucrium polium L.* - lamiacées (labiées) -huiles essentielles - polyphénols - activité antioxydante - activité antibactérienne.

Sommaire

Liste des Abreviations et des Symboles

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Objectif

<u>Introduction Générale</u>	1
<u>Chapitre I</u>	
Principales Classes de Métabolites Secondaires	
I.1. Introduction	4
I.2. Définition et fonctions des métabolites secondaires	4
I.3. Biosynthèse des substances naturelles	4
I.4. Classification des métabolites secondaires	5
I.4.1. Composés phénoliques	6
I.4.1.1. Définition	6
I.4.1.2. Localisation	6
I.4.1.3. Rôle et intérêt des composés phénoliques	6
I.4.1.4. Les principales classes des composés phénoliques	7
1) Les acides phénoliques	8
2) Les flavonoïdes	8
3) Les anthocyanes	11
4) Les quinones	12
5) Les tanins	13
a) Tanins condensés	13
b) Tanins saponifiables ou hydrolysables:	14
6) Les anthracénosides	15
7) Les coumarines	16
a) Les coumarines simples	16
b) Coumarines complexes	17
8) Les saponines	18
I.4.2. Les alcaloïdes	19
a- Les alcaloïdes vrais	19
b- Les pseudo-alcaloïdes	20
c- Les proto-alcaloïdes	20
I.4.3. Les terpènes et les stérols	22
a) Les terpènes	22
b) Les stérols	23
I.4.4. Les huiles essentielles	25
Références du chapitre I	29
<u>Chapitre II</u>	
Activité Biologique (Antioxydante-Antibactérienne)	
II.1. Activité anti-oxydante	37

II.1.1. Introduction	37
II.1.2. Stress oxydant	37
II.1.3. Radicaux libres et espèces réactives	38
II.1.4. Origines des espèces réactives de l'oxygène	39
II.1.5. Maladies liées aux stress oxydatif	40
II.1.6. Antioxydants	40
II.1.6.1. Caractéristiques des antioxydants	41
II.1.6.2. Principe des antioxydants	41
II.1.7. Antioxydants et système de défense	42
II.1.8. Rôle des antioxydants dans la prévention des AVC (accidents vasculaires cérébrales) et de l'hypertension artérielle	43
II.1.9. Méthodes d'évaluation des propriétés anti-oxydantes <i>in vitro</i>	43
II.1.10. Réaction entre le radical libre DPPH et l'antioxydant	45
II.2. Activité antibactérienne	46
II.2.1. Introduction	46
II.2.2. Définition	46
II.2.3. Culture des bactéries	46
II.2.4. Les antibiotiques	47
II.2.5. Activité antimicrobienne des extraits des plantes	47
II.2.6. Description des bactéries étudiées	48
a) Escherichia coli	49
b) Staphylococcus aureus	49
c) Pseudomonas aeruginosa	49
d) Candida albicans	49
e) Enterococcus faecalis	50
f) Salmonella	50
g) Klebsiella pneumoniae	50
h) Vibrio	50
Références du chapitre II	51
Chapitre III	
Étude Systématique de la Plante Sélectionnée	
III.1. Introduction	56
III.2. Présentation de la région de Biskra	56
III.3. Site de prélèvement	56
III.4. Présentation de la plante : <i>Teucrium polium</i> L.	58
III.4.1. La famille des Lamiacées	58
III.4.2. Systématique de la famille des Lamiaceae	58
III.4.3. Caractères généraux des Lamiacées	59
III.4.4. Genre <i>Teucrium</i>	59
a) Présentation	59
b) Habitat et répartition géographique du genre <i>Teucrium</i>	59
III.5. Etude monographique de l'espèce	60

III.5.1. Systématique de la plante	60
III.5.2. Nom de la plante	61
III.5.3. Description de la plante	61
III.6. Valorisation des plantes associées à la plante étudiée	62
III.7. Données phytochimiques de la plante	64
III.8. Utilisation de la plante	64
Références du chapitre III	66
Chapitre IV	
Matériels et Méthodes	
IV.1. Introduction	71
IV.2. Récolte, Séchage et Broyage	72
IV.3. Criblage phytochimique	72
IV.3.1. Tests chimiques d'identification	72
IV.4. Contrôle d'une drogue végétale	75
IV.4.1. Dosage de l'eau	75
a) Principe	75
b) Technique	76
c) Calcul de la teneur en eau	76
IV.4.2. Dosage de cendres	76
IV.4.2.1. Teneur en cendres totales	76
a) Principe	76
b) Technique	76
c) Calcul	76
IV.4.2.2. Teneur en cendres sulfuriques	76
a) Principe	76
b) Technique	77
c) Calcul	77
IV.5. Méthodes d'extraction	77
IV.5.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	77
IV.5.2. Extraction des polyphénols par macération	78
IV.5.3. Calcul du rendement	78
IV.6. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)	79
IV.6.1. Technique	79
IV.6.2. CCM de l'huile essentielle	80
IV.6.3. CCM des polyphénols	80
IV.7. Analyse par chromatographie liquide à haute performance	81
IV.7.1. Principe	81
IV.7.2. Mode opératoire	81
IV.8. Analyse quantitative des composés phénoliques	82
IV.8.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)	83
IV.8.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)	84
IV.8.3. Dosage des tanins condensés (TC)	85

IV.9. Evaluation in vitro de l'activité antioxyante	86
IV.9.1.Estimation du pouvoir antiradicalaire (DPPH•)	86
IV.10. Analyse statistique	88
IV.11. Étude de l'activité antibactérienne	88
IV.11.1.Technique de diffusion sur milieu gélosé (Antibiogramme)	89
a) Repiquage des espèces bactériennes	89
b) Préparation de l'inoculum	89
c) Préparation des disques	89
d) Ensemencement	89
e) Lecture	90
IV.11.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	90
IV.11.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	91
Références du chapitre IV	92
<u>Chapitre V</u>	
Résultats et Discussion	
V.1. Criblage phytochimique	
V.2. Contrôle d'une drogue végétale	
V.2.1. Dosage de l'eau par Gravimétrie (Perte à la dessiccation)	
V.2.2. Dosage de cendres	
V.3. Préparation des extraits	
V.3.1. Extraction des huiles essentielles	
V.3.2. Extraction des composés phénoliques	
V.4. Caractéristiques des extraits obtenus	
V.4.1. Rendement de l'extraction	
V.4.2. Caractéristiques organoleptiques	
V.4.3. Analyse par la chromatographie sur couche mince	
V.4.4. Résultats de caractérisation par HPLC	
V.5. Quantification des composés phénoliques	
V.5.1. Dosage des Polyphénols totaux	
V.5.2. Dosage des flavonoïdes	
V.5.3. Dosage des tanins condensés	
V.6. Activités biologiques des extraits	
V.6.1. Evaluation de l'activité antioxydante	
V.6.2. Evaluation de l'activité antibactérienne	
V.6.2.2. Résultats de la CMI et CMB	
V.6.2.3. Interprétation des résultats	
<u>Conclusion Générale et Perspectives</u>	
Annexe	

Liste des figures

Chapitre I

FIGURE	LE TITRE	PAGE
Figure I.1	Les voies des métabolismes -Interrelation entre les métabolites primaires et les métabolites secondaires-	5
Figure I.2	Principales classes des composés phénoliques.	7
Figure I.3	Structure chimique de quelques acides phénoliques.	8
Figure I.4	Structure de base des flavonoïdes.	9
Figure I.5	Structure générale des anthocyanes.	12
Figure I.6	Structure de base des quinones.	12
Figure I.7	Tanins condensés.	14
Figure I.8	Structure de Tanins hydrolysables ; esters d'acides gallique et ellagique.	14
Figure I.9	Structure du méthyl-3-dihydroxy-1,8-anthracène.	15
Figure I.10	Structures de quelques coumarines complexes.	17
Figure I.11	Structures des saponines.	18
Figure I.12	Structure de quelques alcaloïdes vrais.	20
Figure I.13	Structures de quelques pseudo-alcaloïdes.	20
Figure I.14	Exemple des proto-alcaloïdes.	20
Figure I.15	Structure de la molécule d'isoprène.	22
Figure I.16	Classification des composés terpéniques.	23
Figure I.17	Quelques exemples de stéroïdes.	24
Figure I.18	Structure rencontrées dans les huiles essentielles.	26

Chapitre II

FIGURE	TITRE	PAGE
Figure II.1	Stress oxydant.	37
Figure II.2	Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO).	38
Figure II.3	Formation des Espèces Réactives résulte d'une réduction progressive de l'oxygène.	39
Figure II.4	Radiations UV de la lumière.	40
Figure II.5	Principe des antioxydants.	41
Figure II.6	Actions de la vitamine C sur les radicaux actifs.	42
Figure II.7	Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (ERO) et des antioxydants régulateurs de leur production.	43
Figure II.8	Structure des antioxydants les plus connus.	44
Figure II.9	Structure de la paroi bactérienne.	48

Chapitre III

FIGURE	LE TITRE	PAGE
Figure III.1	Une image brute Google Earth de la commune Djemourah	57
Figure III.2	Limite administrative de la commune de Djemourah	57
Figure III.3	La plante étudiée <i>Teucrium polium</i> L.	60
Figure III.4	Association des espèces épineuses avec <i>Teucrium polium</i> L. <i>Thymoïdes</i>	62
Figure III.5	Alliance des différentes espèces avec <i>Teucrium polium</i> L. <i>Thymoïdes</i>	63
Figure III.6	<i>Astragalus armatus</i> avec <i>Teucrium polium</i> L. <i>Thymoïdes</i>	63

Chapitre IV

FIGURE	LE TITRE	PAGE
Figure IV.1	Plan général de la partie expérimentale.	71
Figure IV.2	Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm de trois essais SD).	83
Figure IV.3	Droite d'étalonnage de la catéchine (moyenne \pm de trois essais SD).	85
Figure IV.4	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant.	87

Chapitre V

FIGURE	LE TITRE	PAGE
Figure V.1	Teneur d'eau dans le <i>Teucrium polium</i> L.	97
Figure V.2	Résultat des cendres.	98
Figure V.3	Rendements moyens des extraits de <i>Teucrium Polium</i> L. exprimés en % massique.	100
Figure V.4	Résultats de l'analyse par CCM des extraits de <i>Teucrium Polium</i> L.	102
Figure V.5	Résultats de l'analyse par HPLC des extraits de <i>Teucrium Polium</i> L.	104
Figure V.6	Teneurs en PPT des extraits de l'espèce <i>Teucrium polium</i> L.	106
Figure V.7	Teneurs en flavonoïdes des extraits de l'espèce <i>Teucrium polium</i> L.	107
Figure V.8	Teneurs en tanins condensés des extraits de <i>Teucrium polium</i> L.	108
Figure V.9	Valeurs des CI ₅₀ du test DPPH (μ g/ml) de HE et polyphénols	111

Liste des Tableaux

Chapitre I

TABLEAU	LE TITRE	PAGE
Tableau I.1	Les différentes classes des flavonoïdes.	9
Tableau I.2	Structures de quelques coumarines simples.	17
Tableau I.3	Principaux composés des huiles essentielles et leurs activités biologiques.	28

Chapitre II

TABLEAU	LE TITRE	PAGE
Tableau II.1	Aperçu des différents tests pour la mesure de la capacité antioxydante globale	45

Chapitre III

TABLEAU	LE TITRE	PAGE
Tableau III.1	Situation géographique et bioclimatique de la station d'étude.	56

Chapitre IV

TABLEAU	LE TITRE	PAGE
Tableau IV.1	Les systèmes utilisés pour l'extrait d'éther de pétrole.	80
Tableau IV.2	les systèmes utilisés pour les extraits DCM, AcET et BuT.	80
Tableau IV.3	Gradient d'élution CLHP pour l'analyse des polyphénols.	82
Tableau IV.4	Souches bactériennes sélectionnées.	88
Tableau IV.5	Les différentes dilutions de la solution mère.	91

Chapitre V

TABLEAU	LE TITRE	PAGE
Tableau V.1	Résultats des tests phytochimiques de la partie aérienne de <i>Teucrium polium L. Thymoïdes</i>	96
Tableau V.2	Caractéristiques organoleptiques de extrais bruts de l'espèce <i>Teucrium polium L.</i> de la région de Biskra.	101
Tableau V.3	Temps de rétention des différents témoins polyphénoliques obtenus après séparation par CLHP.	103
Tableau V.4	Les phénols identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique	105
Tableau V.5	Zones d'inhibition en mm des extraits de <i>Teucrium polium L.</i> sur les souches bactériennes testés.	113
Tableau V.6	Résultats CMI et CMB des extraits actifs de <i>Teucrium polium L.</i>	114

Abréviations et symboles

ATCC :	American type culture collection
AcOEt :	Acétate d'éthyle
CLHP :	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CMB :	Concentration bactéricide
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
BHT :	butylhydroxytoluène
ButOH :	n-butanol
CAT :	capacité antioxydante totale (Total antioxidant capacity)
DCM :	dichlorométhane
DMSO:	Diméthyl sulfoxyde.
DO :	densité optique
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EAA :	équivalents d'acide ascorbique
EC :	équivalent d'acide gallique
EAG :	équivalent de catéchine
EC50 (IC50) :	concentration inhibitrice à 50 %
HE:	huile essentielle
EP :	éther de pétrole
ERO :	espèces réactives de l'oxygène
FVT :	flavonoïdes totaux
FRAP :	Capacités réductrices ferriques d'antioxydants
H₂O₂:	peroxyde d'hydrogène
L. :	Botaniste suédois Carl Linnæus (Carl von Linné)
Mg	milligramme
MI :	millilitre
M-H	milieu Mueller Hinton
Min	minute
nm	nanomètre
ORAC :	Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène
% :	Pourcentage
R :	rendement
Rf :	Facteur de rétention
ROO· :	radical peroxyde
ROOH :	peroxydes organiques
PPT :	polyphénols totaux
ssp :	sous espèce.
T⁺ :	test positif
TC :	tanins condensés
UV :	ultraviolet
UFC :	Unité Formant Colonie
λ:	Longueur d'onde.
µg :	Microgramme
µl :	Microlitre.

OBJECTIFS

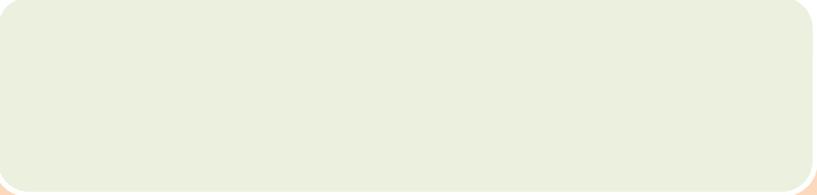
OBJECTIF GENERAL

Valorisation d'une plante médicinale de la famille des Lamiceae par la recherche de différents métabolites secondaires et leurs activités pharmacologiques.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

C'est dans cette optique que se situe notre étude dont les objectifs spécifiques se résument dans les volets suivants :

- Caractérisation qualitative des métabolites secondaires de la plante sélectionnée par screening phytochimique.
- Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.
- Extraction des polyphénols par macération.
- Analyse des extraits par CCM et CLHP.
- Quantification des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins par dosage colorimétrique.
- Etude de l'activité antioxydante des extraits actifs de la plante choisie, par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'antibiogramme.

- 
- INTRODUCTION
GÉNÉRALE

Introduction Générale

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, elle est souvent associée aux traitements classiques. Celle-ci connaît, de nos jours, un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20 % des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques. L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes ^[1].

L'utilisation des plantes médicinales sous différentes formes, brutes ou préparées s'est considérablement élargie. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 80% de la population globale dépend notamment de la médecine traditionnelle et de la phytothérapie pour les soins sanitaires, ce qui semble être une solution acceptable ^[2]. Il a été rapporté aussi que 60% des préparations médicamenteuses, dans les pays industrialisés, dérivent des plantes ; ces dernières agissent comme sources d'agents thérapeutiques modèles pour de nouveaux composés synthétiques ou comme matière de base pour la production semi synthétique de molécules de haute complexité ^[3].

Un grand intérêt est donné à l'investigation sur la préparation de nouvelles substances chimiques douées d'une activité biologique et à l'amélioration des indices thérapeutiques ^[4]. Actuellement, les extraits de plantes et les préparations analogues ne peuvent plus être considérés comme de vrais « médicaments » pour lesquels sont exigées une identification rigoureuse et une très grande pureté ^[5].

Dans une logique de stratégie des études des plantes médicinales ; la valorisation ne s'arrête pas uniquement au niveau des connaissances ethnopharmacologiques et biologiques des plantes, mais aussi à l'étude phytochimique qui est obligatoire pour cerner l'ensemble des informations nécessaires à cette valorisation ^[6]. En effet, les molécules bioactives naturelles font l'objet de nombreuses recherches et d'une nouvelle haleine vers l'exploitation des métabolites secondaires d'une manière générale et celle des huiles essentielles et des polyphénols en particulier, tant dans la santé et vis-à-vis des maladies pernicieuses (cancer) que dans l'industrie agro-alimentaire. Ces composés sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques: antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires et antiallergiques ^[7].

Dans le cadre de nos travaux, relatifs aux plantes aromatiques et médicinales de la région de Biskra, nous nous sommes intéressés à la valorisation d'une plante très utilisée en phytothérapie et dans la médecine traditionnelle, grâce à son efficacité dans le traitement à combattre les rhumatismes, les troubles gastriques et l'accélération de la cicatrisation des blessures [8,9]. C'est le *Teucrium polium* L. sous espèce des *thymoïdes* et appartenant à la famille des lamiacées (labiées) [10], elle est cultivée dans la région de Beni Souik de la wilaya de Biskra. Cette dernière est parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante [11].

L'objectif de ce travail est l'étude phytochimique ayant pour objet la détermination de la composition chimique de métabolites secondaires et la mise en évidence d'une éventuelle variabilité de la quantification de ces substances, ainsi que l'évaluation de l'activité biologique (antibactérienne et antioxydante) des extraits issus de la partie aérienne de la plante sélectionnée.

La première partie de l'étude renferme une synthèse bibliographique qui inclut deux chapitres. Le premier présente les principales classes des métabolites secondaires (définition, classification et propriétés). Dans le deuxième chapitre, nous développons une mise au point exhaustive sur l'activité antioxydante et antibactérienne.

La deuxième partie inclut le travail personnel, elle est subdivisée en trois chapitres: Le troisième chapitre est consacré à un aperçu général sur le site de prélèvement suivi d'une étude systématique de la plante sélectionnée *Teucrium polium* L.

Dans un quatrième chapitre, nous avons donné une explication détaillée de la démarche méthodologique, en partant de la collecte des échantillons, leur séchage, broyage, extraction et séparation. Nous avons aussi, mis le point sur tous les protocoles adoptés pour le dosage des polyphénols, ainsi que l'évaluation de l'activité biologique des extraits préparés.

Le cinquième et dernier chapitre a été consacré à la mise en exergue et la discussion de tous les résultats obtenus, en comparaison avec les études antécédentes pour les mettre en valeur.

Enfin nous achèverons ce travail par une conclusion générale dans laquelle différentes perspectives de recherche seront évoquées, en se basant sur les résultats obtenus.

Références bibliographiques

1. **Jensen R., (2002).** Clinical Presentation of Arterial Thrombosis vs. Venous Thrombosis. *Clinical Hemostasis Review*. 16(8), pp:1-6.
2. **Vania G.Zuin et Jenete. H.Y.Vilegas, (2000).** Phytoterapy research. 14. pp:73-88
3. **Bourobou B.H., (2004).** Approches sur la contribution des médicaments traditionnels améliorés dans les soins de santé primaires: étude des cas. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 13: 35-48.
4. **Gurib-Fakim, A, (2006).** Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine* , 27 (1), 1-93.
5. **Benchelah, A.-C.; Bouziane, H.; Maka, M, (2004).** Fleurs du Sahara, arbres et arbustes, voyage au coeur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. *Phytothérapie*, 2 (6), pp:191-197.
6. **Brahim Harkati, (2011).** Valorisation Et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille asteraceae: *Scorzonera Undulata*. Doctorat En Sciences UNIVERSITE MENTOURI-CONSTANTINE.
7. **Macheix, J.-J.;Fleuriet, A.; Jay-Allemand, C, (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.
8. **Ansari M., Alizadeh A.M., Paknejad M., Khaniki M., Naeimi S.M, (2009).** Effects of Teucrium Polium Honey on Burn Wound Healing Process. *Journal Babol Univ Med Sci*, 11: 3.
9. **Ashnagar, A.; Gharibnaseri, N.; Foroozanfar, S, (2007).** Isolation and identification of the major chemical components found in the upper parts of Teucrium polium plants grown in Khuzestan province of Iran. *Chinese Journal of Chemistry*, 25 (8), pp:1171-1173.
10. **Judd WS, (2002).** Campbell C Botanique systématique une perspective physiologique. Ed. De Boeck Supérieur, Université s. a., Paris, pp: 84-87.
11. **Bourobou B.H., (2004).** Approches sur la contribution des médicaments traditionnels améliorés dans les soins de santé primaires: étude des cas. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 13, pp:35-48.

Chapitre II

- PRINCIPALES CLASSES
DES MÉTABOLITES
SECONDAIRES

I.1. Introduction

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides et acides nucléiques), ils accumulent fréquemment un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés «métabolites secondaires» dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules bioactives utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [1,2].

I.2. Définition et fonctions des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes. Ce sont des produits à structure chimique souvent complexe, ils sont très dispersés et très différents selon le type d'espèce. Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores et dans les relations entre la plante et son environnement [3,4].

Ces molécules biologiques ne sont pas, par définition, nécessaires et vitaux pour la cellule ou l'organisme mais elles ont la particularité d'avoir des effets biologiques sur d'autres organismes [5]. Elles sont présentes en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire. Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plantes et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

I.3. Biosynthèse des substances naturelles

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux métabolites secondaires sont maintenant bien connues (**Figure I.1**).

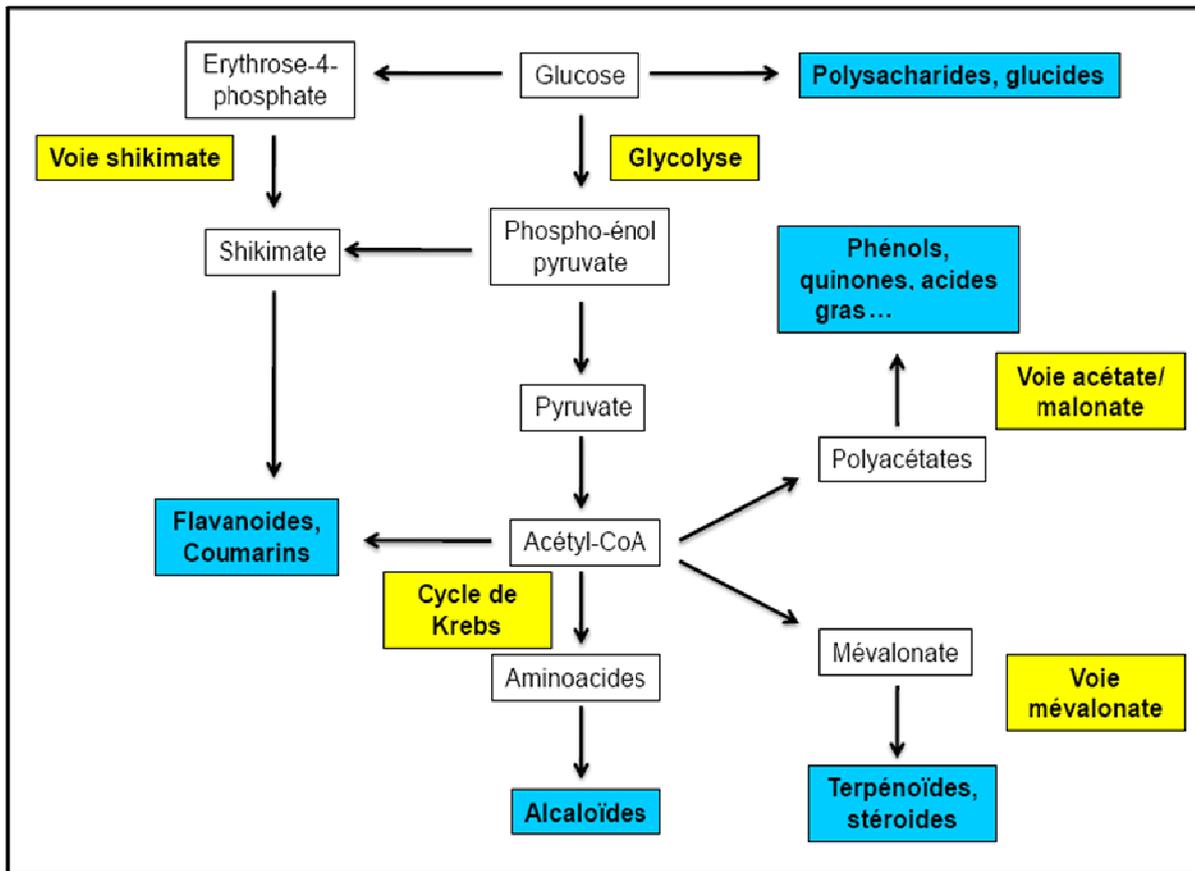


Figure I.1: Les voies des métabolismes
-Interrelation entre les métabolites primaires et les métabolites secondaires-

I.4. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il en existe plus de 200000 qui sont classés, selon leur appartenance chimique, en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques [6]. Nous citerons ci-dessous quelques importants groupes phytochimiques, source de molécules biologiquement actives et regroupés en trois classes principales [4]:

- ✚ Les composés aromatiques (les phénoliques, l'acide shikimique ou les dérivés d'acétate).
- ✚ Les composés azotés.
- ✚ Les terpénoïdes et les stéroïdes.

I.4.1. Composés phénoliques

I.4.1.1. Définition :

Les polyphénols, également dénommés composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir, cependant l'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, ester, hétéroside...etc.) [7,8,9].

Ce sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires [10]. Ils regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques et qui présentent toutes un point commun [11]. En effet ces composés manifestent une grande diversité de structures : quinones (Anthracénosides), coumarines, acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilibénoïdes, lignanes et xanthones [12,13].

I.4.1.2. Localisation :

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) [14]. Ils sont présents aussi dans diverses substances naturelles comme les fruits rouges, le raisin ...etc. [15]

I.4.1.3. Rôle et intérêt des composés phénoliques :

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales; ils ont la capacité de moduler l'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires. Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits [16]. Ces composés sont réputés aussi pour leur caractère anti-oxydante, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de plusieurs maladies [17]. En outre, un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques, antivirales et anticancéreuses. Plusieurs études ont été réalisées sur l'impact de la consommation de végétaux sur la santé. La plupart d'entre elles ont mis en évidence une baisse du facteur de risque pour de nombreuses affections telles que l'infarctus et le cancer [18,19].

I.4.1.4. Les principales classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues [20]. Ces composés peuvent être regroupés en plusieurs catégories qui se différencient d’abord par la complexité du squelette de base, ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d’oxydation, d’hydroxylation etc.) et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d’autres molécules (glucides généralement) [21]. On distingue les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les stilbènes et les quinones [2,22]. Les différentes classes de ces composés phénoliques sont représentées dans la **figure I.2**.

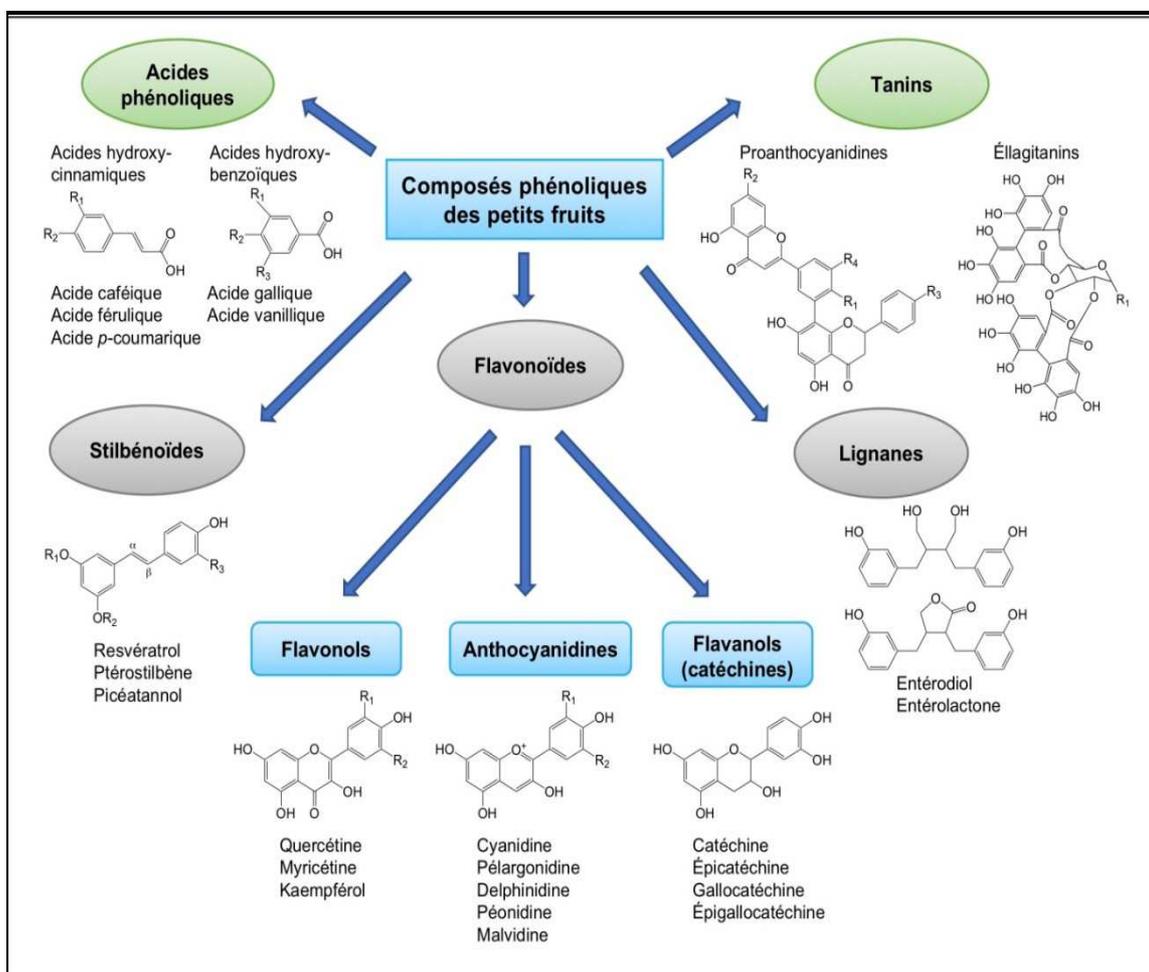
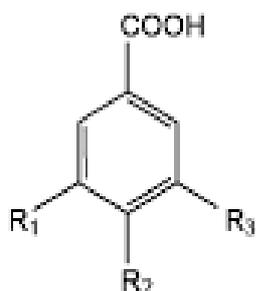


Figure I.2 : Principales classes des composés phénoliques.

1) Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des substances phytochimiques ayant au moins un groupe carboxyle et un groupe hydroxy-phénolique. La dénomination générale d'acides phénoliques englobe les formes les plus simples des composés phénoliques qui se séparent en deux grands groupes distincts: les acides hydroxybenzoïques qui sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure en C6-C1, ils sont très communs aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'ester ou d'hétérosides ; et les acides hydroxycinnamiques qui dérivent de l'acide cinnamique et possèdent une structure en C6-C3 (**Figure I.3**) [23,24].

Acides hydroxybenzoïques



Acides hydroxycinnamiques

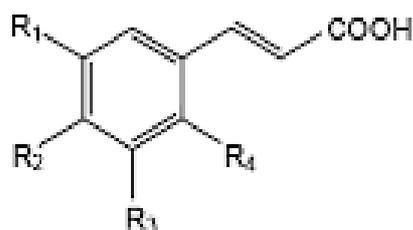


Figure I.3: Structure chimique de quelques acides phénoliques.

2) Les flavonoïdes :

Le terme « flavonoïde du grec flavus, (jaune) en latin » est le nom générique qui désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides [7,25].

Tous les flavonoïdes (plus de 6000) possèdent le même élément structural de base [26], avec un squelette à quinze carbones qui, à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C [27,28]. La **figure I.4** représente la structure de base des flavonoïdes [29].

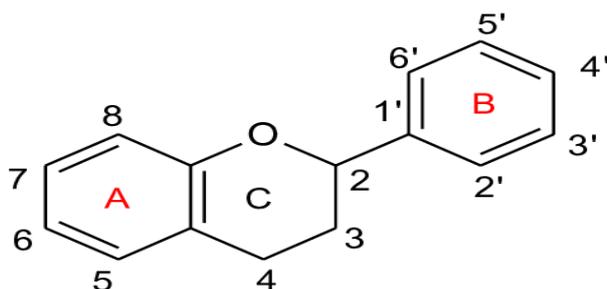


Figure I.4.: Structure de base des flavonoïdes.

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme les groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényle [30-32].

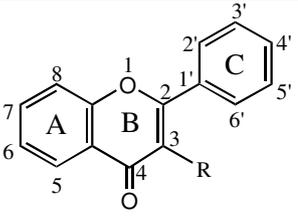
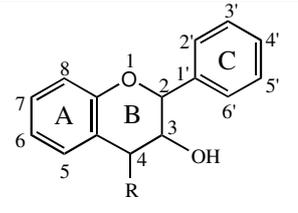
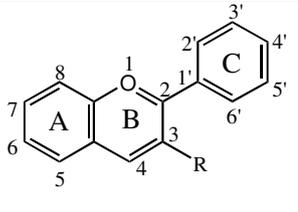
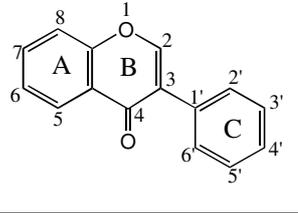
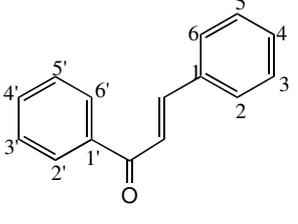
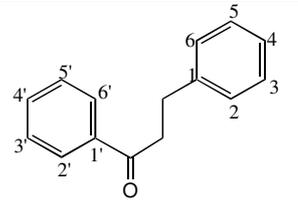
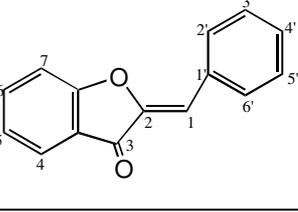
✧ **Classification des flavonoïdes:**

Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, lequel peut-être ouvert et recyclisé en un motif furanique (dihydrofuranone). Le **tableau I.1** illustre les principales classes de flavonoïdes [24].

De façon générale, les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5' et/ou 6' (suivant la numérotation présentée pour les flavones.). Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes peuvent être présents sous forme C-ou O-glycosylés. Les formes libres, sans sucres attachés sont appelés les génines ou aglycones [21,33].

Tableau I.1 : Les différentes classes des flavonoïdes.

Différentes classes		Principales substances	
Structure	Nom de famille	Hydroxylation	Nom
	R=H FLAVONE	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apeginine Luteoline
	R=OH FLAVONOL	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Kaempferol Quercétine

	<p>R=H FLAVANONE (Dihydroflavone)</p>	<p>5, 7, 4' 7, 3', 4'</p>	<p>Naringenine Butine</p>
	<p>R=OH FLAVANONOL (Dihydroflavonol)</p>	<p>7, 3', 4' 5, 7, 3', 4'</p>	<p>Fustine Taxifoline</p>
	<p>R=H CATECHINE (Flavanol-3)</p>	<p>5, 7, 3', 4', 5' 5, 7, 3', 4'</p>	<p>Gallocatechine Catechine</p>
	<p>R=OH LEUCOANTHOCYANIDINE (Flavandiol-3, 4)</p>	<p>5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4', 5'</p>	<p>Leucocyanidine Leucodelphinidine</p>
	<p>R=H FLAVYLIUM (Anthocyane)</p>	<p>5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'</p>	<p>Apigenidine Luteolidine</p>
	<p>R=OH ANTHOCYANIDINE</p>	<p>5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4', 5'</p>	<p>Cyanidine Delphinidine</p>
	<p>ISOFLAVONE</p>	<p>7, 4' 5, 7, 3', 4'</p>	<p>Daidzein Orobol</p>
	<p>CHALCONE</p>	<p>2', 4', 3, 4 2', 3', 4', 3, 4</p>	<p>Buteine Okanine</p>
	<p>DIHYDROCHALCONE</p>	<p>4, 2', 4', 6' 3, 4, 2', 4', 6'</p>	<p>Phloretine Hydroxyphloretine</p>
	<p>AURONE</p>	<p>6, 3', 4' 6, 7, 3', 4'</p>	<p>Sulphuretine Maritimetine</p>

✧ Propriétés des flavonoïdes

- Ce sont des solides cristallisés dont la teinte, varie du blanc ivoire au jaune vif. Ces hétérosides sont solubles dans l'eau (surtout à chaud), l'alcool et les solvants organiques. Ils sont insolubles dans les solvants organiques apolaires.
- Les flavonoïdes sont aussi solubles dans les solutions alcalines (ammoniaque et potasse) donnant une coloration jaune qui disparaît par addition d'acide.
- Ils possèdent un spectre d'absorption dans l'ultra violet avec, généralement deux maximums caractéristiques variant avec chaque type flavonique ^[34].
- Ils Protègent les plantes contre les radiations UV.
- Ils sont impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales.
- Ils fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire.
- Ils régulent l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits ^[35].

3) Les anthocyanes :

Les anthocyanes (du grec anthos, fleur et Kuanos, bleu violet), terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules, faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est détectable à l'œil nu. Ces pigments sont donc à l'origine des couleurs des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues. Ils sont généralement localisés dans les vacuoles des cellules épidermiques qui sont de véritables poches remplies d'eau.

On trouve également les anthocyanes dans les racines, les tiges, les feuilles et les graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle ^[36] (**Figure I.5**).

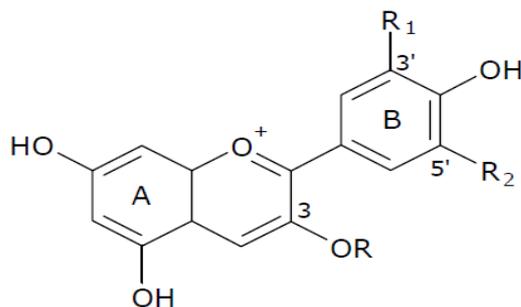


Figure I.5: Structure générale des anthocyanes.

4) Les quinones

Cétones aromatiques provenant de l'oxydation des diphénols. Les quinones (**Figure I.6**) constituent un groupe de substances biologiquement très actives. Beaucoup d'entre elles sont antimicrobiennes, c'est à dire antibiotiques naturels agissant surtout sur les grams +, ce sont aussi des fongicides et parfois même des vermifuges. Les quinones sont des transporteurs d'électrons spécifiques de la membrane mitochondriale (interne) et celle des thylakoïdes. La vitamine K1 (méthyl 2- naphthoquinone), en est un exemple, elle est abondante dans la Luzerne. On trouve également dans ce groupe des plantes tinctoriales. Enfin, la majorité des anthraquinones sont apéritives, mais aussi purgatives, agissant directement sur la musculature lisse au niveau du côlon et entravant la résorption de l'eau. En présence d'une base (NaOH ou KOH), les quinones donnent une coloration caractéristique allant du rouge orangé au violet pourpre [37].

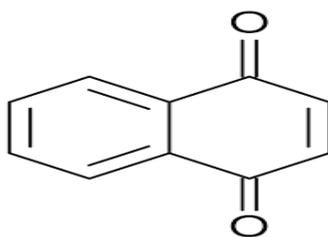


Figure I.6 : Structure de base des quinones.

5) Les tanins :

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux, autrement dit, transformer une peau en cuir ^[34]. Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique, leur degré d'oxydation ^[38] et leur saveur astringente mais ayant en commun la propriété de tanner la peau. Cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 g/mol ^[39,40]. Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides ^[41-43].

✧ Localisation et distribution

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les fagacées et les rosacées ^[44]. Ils peuvent exister dans divers organes tels que les écorces, le bois, les fruits (raisin, datte, café, cacao..), les feuilles, les racines et les graines ^[45].

✧ Structure et classification ^[7,25] :

On distingue, habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique:

- Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères)
- Les tanins saponifiables ou hydrolysables : esters d'acides phénols et de glucose.

a) Tanins condensés:

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou procyanidoliques, sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ces tanins sont des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique ^[46].

La structure complexe des tanins condensés est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation.

Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation

du noyau B (**Figure I.7**) On distingue ainsi les catéchines, les épicatechines et les gallocatéchines [47].

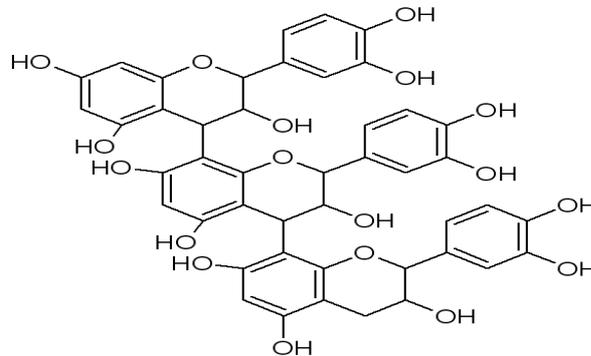
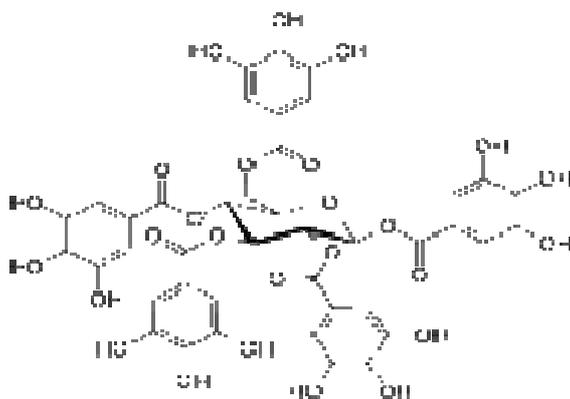


Figure I.7 : Tanins condensés.

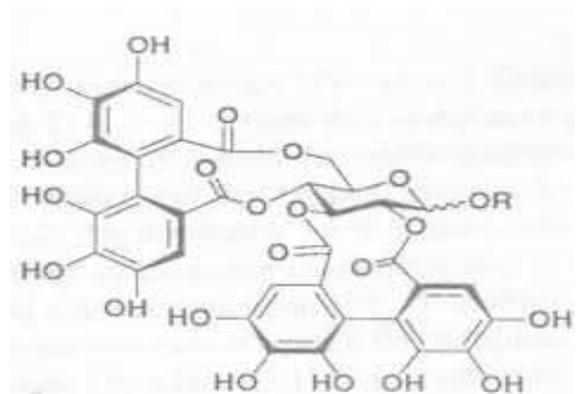
b) Tanins saponifiables ou hydrolisables :

Les tanins hydrolisables sont des esters de glucides ou d'acides phénols, ou de dérivés d'acides phénols (**Figure I.8**); la molécule glucidique est, en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones. Ces tanins, en raison de leurs nombreux groupements OH, se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales [48]. Ces tanins sont de deux types :

- Les tanins galliques qui sont des esters d'oses (glucose) et d'acides galliques.
- Les tanins ellagiques qui sont des esters d'oses et d'acides ellagiques [36].



Tanin gallique "gallotannin"



Tanin ellagique "ellagitanin"

Figure I.8: Structure de Tanins hydrolisables ; esters d'acides galliques et ellagiques.

✧ **Propriétés des tanins :**

- Les tanins sont des corps généralement amorphes, solubles dans l'eau et l'alcool et insolubles dans les solvants organiques apolaires. On les extrait, généralement par des mélanges hydro-alcooliques.
- Ils précipitent, avec de nombreux réactifs et avec les sels de métaux lourds tels que le fer, le plomb, le zinc et le cuivre [49].
- Grâce à leur astringence, les tanins sont utilisés comme antidiarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes [50].
- Ils sont largement employés dans l'industrie du cuir surtout dans celle des vernis et peintures [50].

6) Les anthracénosides :

Ce sont des composés d'origine végétale ayant des propriétés laxatives et purgatives (l'intensité de l'action les différencie : laxatif léger et purgatif violent). Ces composés possèdent une structure de base qui dérive du méthyl-3-dihydroxy-1,8-anthracène (**Figure I.9**).

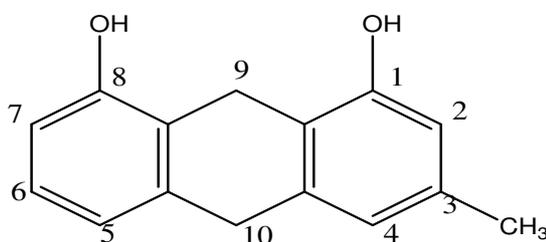


Figure I.9 : Structure du méthyl-3-dihydroxy-1,8-anthracène.

✧ **Propriétés des anthracénosides :**

Les anthracénosides sont des composés polaires à cause de leur fonction phénolique et de leurs nombreuses fonctions alcools des sucres : ils sont donc hydrophiles et solubles dans les solvants polaires [51].

On utilise les anthracénosides pour :

- La préparation des patients à des examens radiologiques et colonoscopiques.
- Le maintien des selles molles en cas d'intervention chirurgicale ano-rectale.

- En présence de constipation chez le patient qui va subir une intervention chirurgicale, il est préférable de lui administrer une préparation à base de laxatif pour accélérer le transit.
- Le traitement de la constipation occasionnelle liée à un traitement médicamenteux [7].

7) Les coumarines :

Historiquement, le nom de coumarine vient de «cumaru» qui est le nom de l'arbre de tonka (*dipteryx odorata willd, fabaceae*), dans une langue amazonienne dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine. Les coumarines ont été isolées pour la première fois en 1820. Ces composés constituent une classe importante de produits naturels et donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. , elles se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Plus de mille structures de coumarines ont été décrites et les plus simples d'entre elles sont largement distribuées dans le règne végétal, avec une abondance remarquable au sein des angiospermes [52]. Les familles les plus riches en coumarines sont : les légumineuses, les rutacées, les apiécées et les thymeleacées. Elles sont présentes dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les graines [53,54]. Se trouvant dans la nature, soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres, elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin [55].

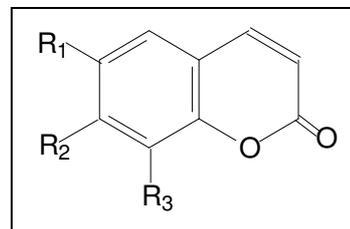
✧ Structure chimique et classification:

Les coumarines sont caractérisées par une structure qui comporte un noyau benzo (2 H)-1 pyranone , résultant de la lactonisation de l'acide ortho-hydroxy- cis cinnamique C-2 [56,57]. Toutefois leurs structures restent très diverses et peuvent être classés en deux grands groupes [58,59]. Coumarines simples et Coumarines complexes où un noyau furanne ou pyranne est associé au noyau benzo α pyrone.

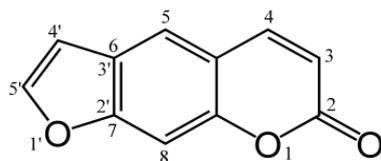
a) **Les coumarines simples** : Ce sont celles qui ont des substituants dans le cycle benzénique. Elles peuvent être des dérivés hydroxylés, méthoxylés, alkylés, alcoxylés et glycosylés de la molécule mère (**Tableau I.2**) [60].

Tableau I.2: Structures de quelques coumarines simples.

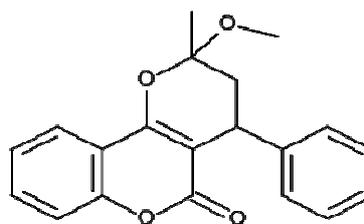
	R ₁	R ₂	R ₃
Umbélliférone	H	H	OH
Esculéétine	OH	OH	H
Scopoléétine	OCH ₃	H	OH
Fraxétole	OCH ₃	OH	OH
Esculine	O-Glu	OH	H
Fraxoside	OCH ₃	O-Glu	OH



b) **Coumarines complexes** : ils se constituent d'un noyau furane ou pyrane associé au noyau benzo- α -pyrone, la prénylation est à l'origine des coumarines polycycliques :



furanocoumarine



pyranocoumarine

Figure I.10: Structure de quelques coumarines complexes.

✧ Propriétés des coumarines:

- Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques tels que les solvants chlorés avec lesquels on peut les extraire. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau [7].
- Elles ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants et profondément modifié en milieu alcalin (KOH, NaOCH₃), elles sont examinées en lumière ultra-violette [7].
- Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes.
- Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles des flavonoïdes [59].

- Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Les coumarines peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes [61].

8) Les saponines [62,63]

Les saponosides ou saponines sont un groupe de métabolites secondaires, abondamment trouvés dans certaines familles du règne végétal. Ils sont principalement produits par les plantes supérieures, mais aussi par des animaux marins inférieurs et quelques bactéries. Leur nom provient du latin *sapo* signifiant "savon" en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes en présence d'eau. Ce sont des hétérosides de poids moléculaire élevé qui se composent d'une partie lipophile, l'aglycone (ou génine) et d'une partie hydrophile osidique. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse.

✧ Structure et classification chimique:

Au niveau structural, les saponines sont des molécules composées de deux entités : une génine (appelée aussi aglycone) et une fraction glycoside. La partie aglycone (sapogénine) est constituée d'un noyau stéroïdique ou triterpénique [64] (**Figure I.11**).

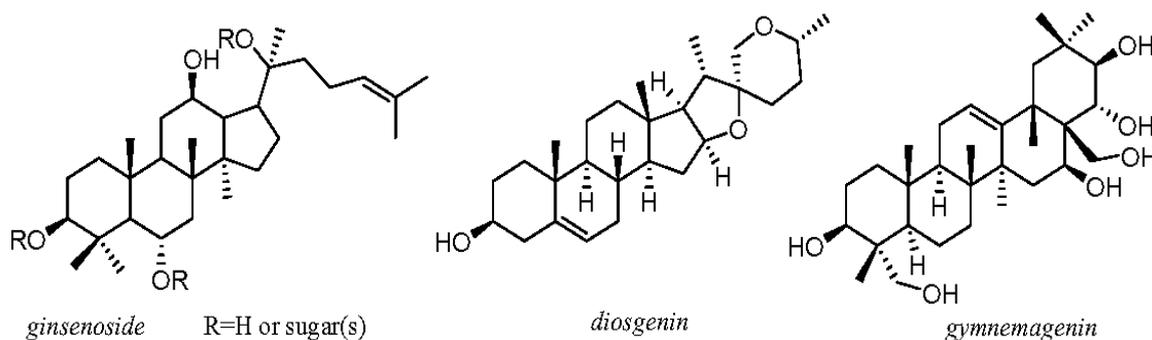


Figure I.11: Structures des saponines.

✧ Propriétés des saponosides :

Les saponines isolées de différentes sources possèdent un goût amer, elles ont été utilisées, en tant que détergents et pesticides, en plus de leurs applications industrielles en tant qu'agents moussants et tensioactifs [65].

Reconnues pour avoir un fort potentiel pharmacologique, les saponines ont été intensivement étudiées au cours des dernières années. La communauté scientifique a démontré un intérêt marqué envers cette classe de métabolites secondaires afin d'accélérer le processus lié à leur développement biopharmaceutique.

- Les saponines exercent des activités biologiques très variées telles que : hémolytique, molluscicide, anti-inflammatoire, antibactérienne et antiparasitaire, cytotoxique et antitumorale [63,66].
- La nature amphipathique de cette classe leur procure une activité tensioactive qui peut être utilisée pour accroître la pénétrabilité des macromolécules (protéines) à travers les membranes cellulaires [67].
- Des saponines ont aussi été utilisées comme adjuvants de vaccins.

I.4.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés, hétérocycliques et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose [68]. Leurs noms se terminent toujours par <-ine>. Ils présentent des réactions communes de précipitation par lesquelles ils sont détectés (capacité de se combiner avec des métaux). Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent l'un des plus grands groupes de près de 10000 à 12000 structures [69].

✧ **Classification:**

Parmi les nombreux systèmes proposés pour la classification des alcaloïdes, on peut citer, selon leur biogénèse et la position de l'azote, celui qui regroupe les alcaloïdes en trois classes. On distingue généralement [70,71]:

- ✚ alcaloïdes vrais.
- ✚ pseudo-alcaloïdes.
- ✚ proto-alcaloïdes.

a) Les alcaloïdes vrais [72]:

Les alcaloïdes vrais représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes qui sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde (**Figure I.12**).

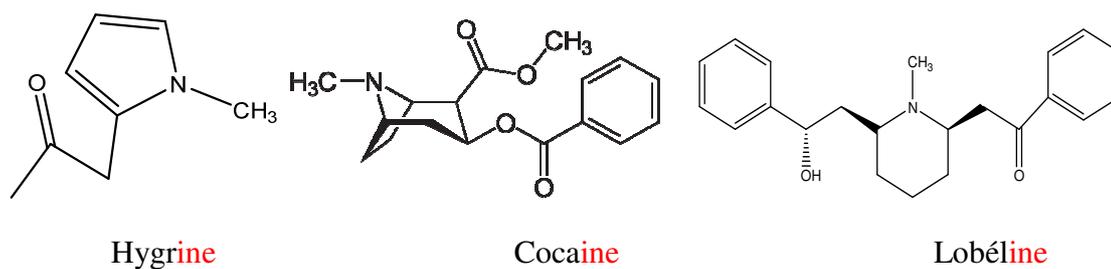


Figure I.12 : Structure de quelques alcaloïdes vrais.

b) Les pseudo-alcaloïdes :

Ce sont des composés dont le squelette carboné de base ne dérive pas d'acide aminé. Il s'agit d'alcaloïdes aromatiques qui sont, dans la majorité des cas, des isoterpénoides comme la capsaïcine. La caféine et la noréphédrine sont aussi des pseudo-alcaloïdes (Figure I.13).

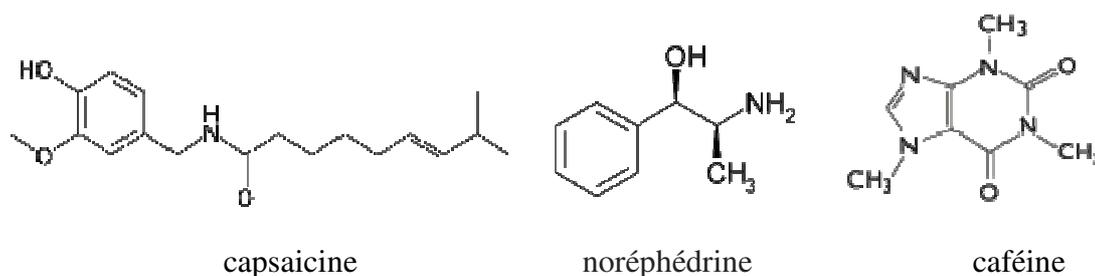


Figure I.13 : Structures de quelques pseudo-alcaloïdes.

c- Les proto-alcaloïdes:

Ce sont des amines simples qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : la colchicine), certains s'associent à des résidus terpéniques, exemple: alcaloïdes indoliques monoterpéniques (utilisés contre le cancer) (Figure II.14).

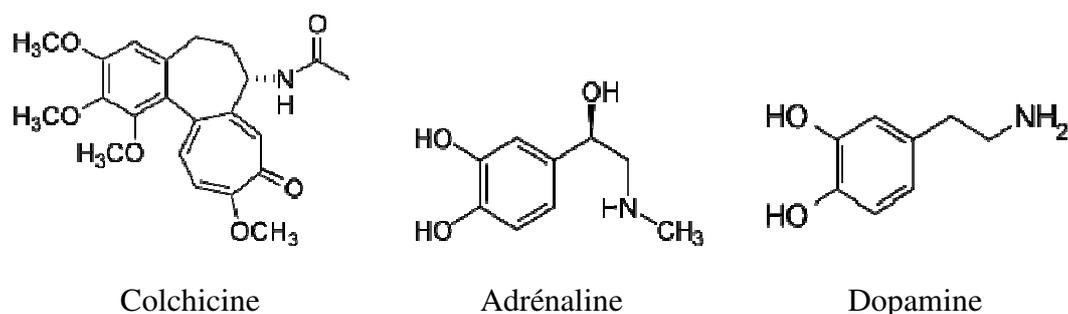


Figure I.14 : Exemple des proto-alcaloïdes.

✧ Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes :

- Les alcaloïdes sont des substances azotées ayant des masses moléculaires très variables de 100 à 900 g/mol [70].
- Les alcaloïdes et leurs sels purs sont, en général des produits solides cristallisés, caractérisés par un point d'ébullition propre. Certains d'entre eux sont amorphes et se trouvent sous forme de cires. D'autres, ayant de faibles points d'ébullitions sont à l'état liquide sous forme d'huiles et ont une viscosité variante [73].
- Ils sont solubles, dans l'eau et les solvants organiques polaires comme les alcools, tant qu'ils sont placés en milieu acide (sels d'alcaloïdes), ils sont solubles aussi, dans les solvants organiques peu polaires comme le dichlorométhane, le chloroforme, etc...en milieu alcalin (alcaloïdes sous forme de base) [74].
- La basicité des alcaloïdes est très variable et dépend de la disponibilité du doublet libre de l'atome d'azote. Cette basicité est fortement influencée par la présence des groupements liés à l'atome d'azote : les groupements électro-attracteurs adjacents à l'atome d'azote diminuent la basicité tandis que les groupements électro-donneurs la renforcent. La colchicine et la pipérine, du fait de l'existence du carbonyle de l'amide, sont pratiquement neutres [75].

✧ Propriétés thérapeutiques des alcaloïdes [76,77]:

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leur activité pharmacologique qui s'exerce dans des domaines variés.

- Au niveau du système nerveux central, ce sont des dépresseurs (morphine) ou des stimulants (caféine)
- On notera aussi l'existence de curarisants, d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antifibrillants (quinidine), d'anti-tumoraux (vinblastine), d'antipaludique (quinine).

Ces différentes activités (et d'autres) conduisent à une utilisation pharmaceutique des plantes à alcaloïdes. D'une manière générale, les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques très variées ainsi que par leur toxicité.

I.4.3. Les terpènes et les stérols

a) Les terpènes :

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure, soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs de (1-8) sauf dans les polyterpènes où il peut atteindre plus de 100 (caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (**Figure I.15**). Le terme terpenoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) [78]. Ces composés sont majoritairement d'origine végétale. Ils sont synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons et même par les animaux [79].

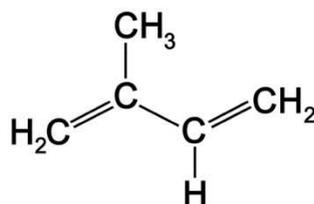


Figure 1.15: Structure de la molécule d'isoprène.

✧ Classification des terpènes [79, 80]:

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représentés et d'un intérêt chimique considérable. Bien que de structures très diverses, ils ont un caractère commun: ils peuvent être virtuellement déconnectés en unités isopréniques. De ce fait, la classification des terpenoïdes est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène, ce qui donne des : hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40) et polyterpènes comme indiqué sur la **figure I.16**. Les structures de chaque classe sont illustrées dans l'**Annexe I**.

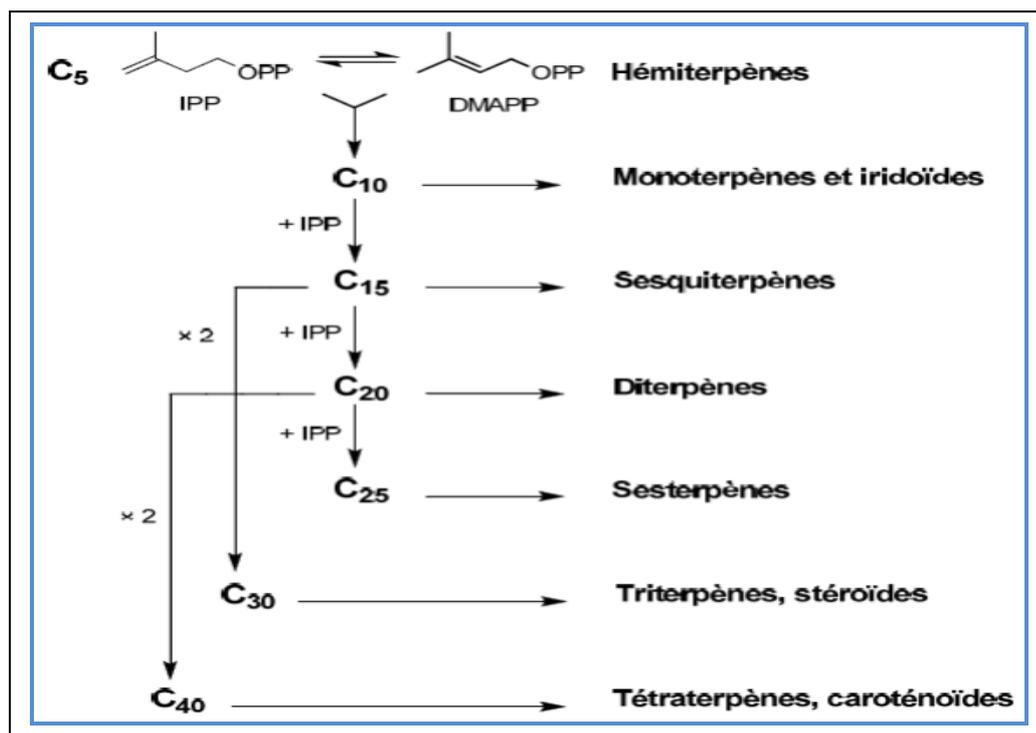


Figure I.16 : Classification des composés terpéniques.

b) Les stérols :

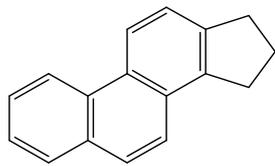
Les stérols possèdent une structure chimique proche de celle du cholestérol. Cette proximité permet à ces derniers de tromper l'organisme permettant ainsi de limiter le passage du cholestérol de l'intestin vers le sang. Ce sont des substances naturelles stéroïdiques caractérisées par un noyau polycyclique portant une fonction alcool ^[76].

✧ Classification des stérols :

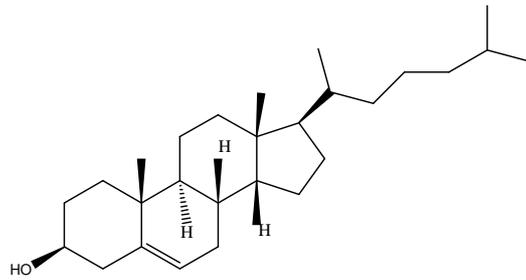
Selon l'IUPAC, les stéroïdes incluent tous les lipides possédant un noyau cyclopentanophénanthrénique (stérane) ou dérivant de celui-ci ^[79]. Cette définition ne catégorise pas les différents types de stéroïdes. Toutefois, l'IUPAC précise que les « stérols sont des stéroïdes » se caractérisant par la présence d'un groupe hydroxyl -OH sur le carbone C₃ et comme exemple, le cholestérol (Figure I.17).

En revanche, pour plusieurs biochimistes, les « stérols constituent une catégorie à part entière incluant les stéroïdes, ainsi que cinq autres sous-classes ^[81] :

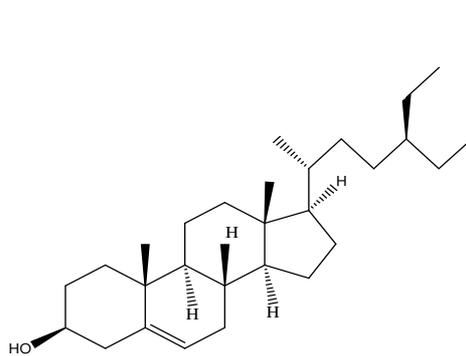
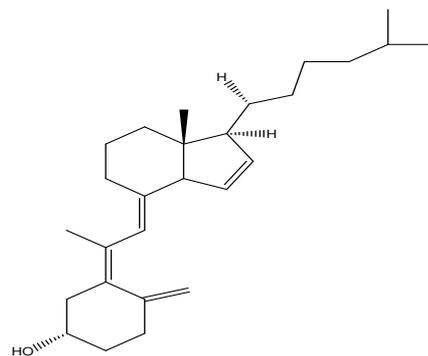
- Les stérols et dérivés : cholestérol, phytostérol et stérides .
- Les stéroïdes : œstrogènes, androgènes, gluco- et minéralocorticoïdes .
- Les sécostéroïdes : vitamine D.
- Les stéroïdes conjugués.
- Les hopanoïdes.



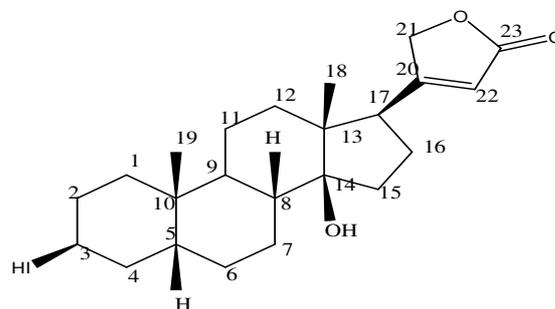
Stérane



Cholestérol

 β -sitostérol

Vitamine D



Cardénolide

Figure I.17 : Quelques exemples de stéroïdes.

✧ Intérêts des terpènes et des stérols:

- Les terpénoïdes sont connus comme doués de propriétés antifongiques et antibactériennes. Le mécanisme des terpénoïdes n'est pas bien connu mais, il pourrait induire une destruction de la membrane du microorganisme par une action lipophile [71].
- Les triterpènes font un groupe de produits naturels de première importance dans les terpènes. Ils sont responsables d'une multitude d'activités biologiques : cytostatique, antivirale, insecticide, anti-inflammatoire, molluscicide et analgésique [82].
- Le β -sitostérol appartient à la famille des stérols végétaux ou phytostérols, composés naturels présents dans toutes les plantes. Le β -sitostérol est comparable au cholestérol. Il peut aider à réduire le taux de cholestérol en limitant la quantité de cholestérol qui peut entrer dans le corps. Le β -sitostérol est également reconnu pour son activité anti-inflammatoire [83].
- Les stérols sont des constituants de membranes cellulaires qui jouent un rôle très important dans la perméabilité de celles-ci et aussi dans la prolifération cellulaire [76,84].

I.4.4. Les huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des composants liquides et hautement volatiles des plantes marqués par une odeur forte et caractéristique, les terpènes (principalement les monoterpènes) représentent la majeure partie (environ 90%) de ces composants. Les HES ne contiennent pas de corps gras (lipides). Elles sont obtenues par distillation par la vapeur d'eau et sont plus ou moins modifiées au cours de la préparation [85].

✧ Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles n'existent que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus des plantes et recouvertes d'une cuticule [86]. Ces huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles: les conifères, les rutacées, les ombellifères, les myrtacées, les lamiacées, Asteraceae, Apiaceae et les poacées. Tous les organes peuvent en renfermer, surtout les sommités

fleuries (lavande, menthe...) mais on en trouve aussi dans les racines ou rhizomes (vétiver, gingembre), dans les écorces (cannelle), le bois (camphrier), les fruits (poivres) et les graines (Muscade). Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits et graines [87,88].

✧ Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles volatiles sont des mélanges très complexes dont les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale $(C_5H_8)_n$. Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpène et 3000 de structure sesquiterpène. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des structures spécifiques contenant le soufre ou l'azote, la **figure I.18** présente la structure de quelque composants retrouvés dans les huiles essentielles.

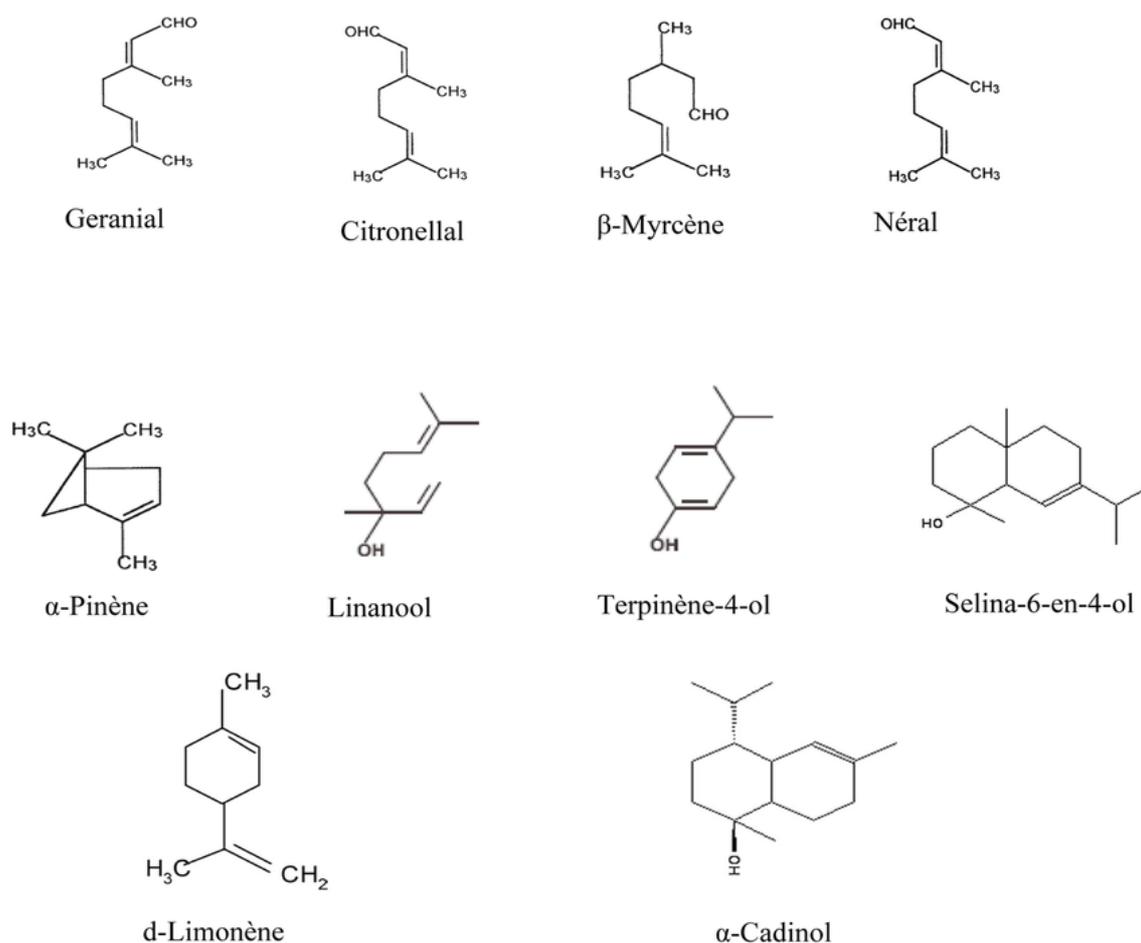


Figure I.18 : Structures rencontrées dans les huiles essentielles.

✧ **Propriétés physico-chimiques** ^[86,88]:

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène, qui a des propriétés communes représentées dans les points suivants :

- Les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes.
- Elles sont plus ou moins colorées et peuvent conférer leur odeur à l'eau. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau.
- Leur indice de réfraction et pouvoir rotatoire sont très élevés.
- Elles sont entraînaibles par la vapeur d'eau et solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles fixes, mais insolubles dans l'eau.
- Elles sont altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux. Il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

✧ **Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles :**

Depuis longtemps, les huiles essentielles sont utilisées en thérapeutique. Leurs applications dans ce domaine sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et du fonctionnement du corps humain. L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique, alimentaire et cosmétique. Celles-ci sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables. Elles ont une action anti-inflammatoire, antiseptique, antivirale, désodorisante, insecticide et antioxydante ^[89,90]. Néanmoins, une seule huile peut avoir plusieurs utilisations à la fois.

Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité. Le **tableau I.3** regroupe les différentes compositions chimiques des huiles essentielles et leurs activités biologiques.

✧ **Toxicité des huiles essentielles :**

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue; on manque aussi de données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes, tératogènes ou cancérigènes. On connaît par contre beaucoup mieux le risque de toxicité aiguë lié à une ingestion massive, en particulier la neurotoxicité de huiles essentielles à thuyone (thuya, absinthe, tanaïsie,

sauge, officinale) ou à pinocomphone (hysope): ces cétones induisent des crises épileptiformes et tétaniformes et des troubles psychiques et sensoriels nécessitant l'hospitalisation. De telles intoxications ne sont pas exceptionnelles car il ya d'autres monoterpènes qui sont également toxiques à des doses fortes: camphre, menthol, (risque de spasme de glotte chez le jeune enfant), cinéole, et E-anéthole [91,92].

Tableau I.3 : Principaux composés des huiles essentielles et leurs activités biologiques.

Nom de l'élément biochimique	Activités biologiques
Les acides	Anti-inflammatoires très puissants, agissent en calmant le système nerveux.
Les aldéhydes	Anti- inflammatoires, calmants du système nerveux, anti- infectieux et peuvent irriter les muqueuses et la peau.
Les cétones	Anti-inflammatoires, anti-infectieux, stimulent le système immunitaire à faibles doses, cicatrisantes, calmantes et peuvent être neurotoxiques à forte dose. Les huiles essentielles, riches en cétones, ne doivent pas être employées seules.
Les éthers	Effets antalgiques, rééquilibrants nerveux (antidépresseurs psychiques) et à inversion des effets si les doses sont trop élevées.
Les esters	Rééquilibrants nerveux.
Les monoterpènes	Stimulants du système immunitaire et ont des propriétés antiseptiques et antalgiques. Peuvent occasionner des brûlures importantes sur la peau, donc leur action doit être limitée dans le temps.
Les phénols	Anti-infectieux et à action contre les microbes, les champignons, les virus et les bactéries, irritants pour la peau et les muqueuses (peuvent entraîner des brûlures). Peuvent (en grande quantité) endommager le foie en détruisant les cellules hépatiques.
Les sesquiterpènes	Anti-inflammatoires, anti- allergiques et ayant un emploi important en cosmétologie car ont une bonne tolérance avec la peau et ont des propriétés thérapeutiques

Références du chapitre I

1. **Jeun, J. M., Annie. F., Chrystian. J. L., (2005).** les composés phénoliques des végétaux, p203- 204.
2. **Macheix J., Fleuriot A. & Jay-Allemand C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. (Ed.) Presses polytechniques et universitaire romandes. pp:1-32.
3. **Lutge U., Kluge M., Bauer G., (2002).** Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. p: 211.
4. **Abderrazak M. et Joël R., (2007).** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. p:177. ISBN 10: 2100506382.
5. **Gravot A., (2008).** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.
6. **Vermerris W., (2006),** Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN10 1-4020 5163-8 (HB).
7. **Bruneton, J., (1999).**Pharmacognosie, Phytochimimie, Plantes médicinales. 3^{ème} Ed. Paris.
8. **Lugasi A., Hovari J., SagiK., and Biro L (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.J.Acta.biologica. szegediensis. 47 (1-4) pp:119-125.(Cited in Mohammedi Z, 2005).
9. **Sarni-Manchado P, Veronique C, (2006).** Les polyphénols en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition TEC et DOC, Paris (France). p: 398.
10. **Lebham, (2005).** Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).
11. **Beta.T; Nams.S; Dexter.J.E; Sapirstein. H. D, (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled ubeat and roller-milled fonctions,Creal chem.. pp: 390-393.
12. **Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie, 1, pp: 3-6.
13. **Stalikas, C. D (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. J. Sep. Sci. 30, pp: 3268–3295.

14. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52 ; pp: 673-839
15. Martin S. et Andriantsitohaina R., (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 ; pp :304-315.
16. Boizot N. et Charpentier.J.P., (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. pp : 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
17. Epifano F., Genovese S., Menghini L. and Curini M, (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*; 68: pp: 939-953.
18. Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. G., Girao da Cruz, M. T., Cordeiro, M. N., Milhazes, N., Borges, F., Marques, M. P. M, (2004). Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg. Med. Chem.* 12, pp: 3581–3589.
19. Sumner, M. D., Elliott-eller, M., Weidner, G., Daubenmier, J. J., Chew, M. H., Marlin, R., Raisin, C. J., Ornish, D, (2005). Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 96, pp: 810–814.
20. Lugasi A ; Hovari J ; Sagi K.V ; et Biro L, (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biologica Szegedientis* 1-4. pp: 119-125.
21. Dacosta Y, (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. p: 317.
22. Bragazza L. & Freeman C, (2007). High nitrogen availability reduces polyphenol content in Sphagnum peat. *Science of the Total Environment.* 377, pp: 439–443.
23. Chanforan, C., (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université D'AVIGNON et des PAYS de VAUCLUSE.

24. **Balasundram N., Sundram K. and Sammam S, (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: pp: 191-203.
25. **Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M, (2001).** Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème}Ed TEC&DOC. Paris. pp:275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008)
26. **Ghedira K, (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, Vol 3(4) ; pp:162-169.
27. **Graham T.L (1998).** Flavonoids and flavonal glycoside metaolism in arabidopsis. *Plant physiol. biochem.* 36, pp:135-44
28. **Schijlen E.G.W.M., Ric de Vos C.H., Van Tunen A.J. & Bovy A.G, (2004)** Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*. 65, pp: 2631–2648.
29. **De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T, (2006).** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: pp: 31-63.
30. **Beecher G. R, (2003).** Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutri.*, 133 (10), 3248S-3254S.
31. **Williams C.A., Grayer R. J, (2004).** Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* Vol. 21(4); pp: 539-573.
32. **Kueny-Stotz M, (2008).** Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylum sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols et aux proanthocyanidines. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Chimie organique, Université Louis Pasteur Strasbourg, France. p54.
33. **Louis S, (2004).** Diversité structural et d'activité biologique des Albumines sentomotoxiques de type 1b des légumineuses. Thèse de doctorat. Lyon, p.259.
34. **HOPKINS., (2003).** *Physiologie végétale*, 2^{ème} édition, Boeck, pp: 276-280.
35. **Yang J., Guo J., and Yuan J, (2008).** In vitro antioxydant properties of rutin. *LWT*.41:1060-1066. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
36. **Belyagoubi Née Benhammou Nabila, (2012),** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse Doctorat en Biologie, pp: 8-11. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.

37. **Bruneton J, (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Tec & Doc (4^{ème} Ed.), p.1268.
38. **Hemingway, R.W, (1992).** Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York.
39. **Guignard J.L, (2000).** Biochimie végétale. 2^{ème} Ed. Dunod. Paris.
40. **Cavin, A, (1999).** Investigation phytochimique de trios plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: Tinos poracispa (Menispermacées), Merremia emarginata (Convolvalacées) et Oropea enneanda (Annonacées). Thèse de doctorat Lausanne, p. 241.
41. **Bennick, A, (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Croit. Revy. Oral.Biol. Med*, pp: 184-196
42. **Koivikko R., Loponen J., Honkanen K. and Jormalainen V, (2005).** Contents of sol cellwall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*, 31 (1); pp: 195-2
43. **Koivikko R., Loponen J., Eränen J.K. and Jormalainen V, (2008).** Variation of phlorotannins among three populations of *Fucus vesiculosus* as revealed by HPLC and colorimetric quantification. *Journal of Chemical Ecology*, 34; pp: 57-64.
44. **Ghestem A ; Seguin E; Paris M; Orecchioni AM, (2001).** Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-homeopathie. Tec et Doc (Ed), p 272.
45. **Khanbabaee K. and Ree T.V, (2001).** Tannins: Classification and definition. *Natural Products Rep.*, 18; pp: 641-649.
46. **Peronny. S, (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle.
47. **Atefeibu E.S.I, (2002).** Contribution a l'étude des tanins et de l'activité antibacterienne d'Acacia Nilotica Var Andesonii .Thèse de Doctorat, université cheikh Anta Diop de Dakar. P.33.
48. **Derbel S. et Ghedira K, (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et Nutrition*. 1 ; pp: 28-34.
49. **Bouhadjera Keltoum, (2005).** contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes .Oudneya africana R.Br. et Aristida pungens L. Diplôme de Doctorat Chimie Organique Appliquée. université abou bekr Belkaid.

50. **Paris M., Hurabeille M, (1981).** Abrégé de matière médicale, tome1, Masson, 102-107.
51. **Vigor Claire, Vercauteren Joseph et Montels Jérôme, (2010-2011).** TRAVEAUX PRATIQUES DE PHARMACOGNOSIE; les substances naturelles dans la chaîne médicament.
52. **Iserin P, (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparations, soins. Larousse, Paris.
53. **Deiana S, Gessa CE, Palma A, Premoli A, Senette C, (2003).** Influence of organic acids exuded by plants on the interaction of copper with the polysaccharidic components of the root mucilage, *Organic Geochemistry*, vol. 34 (pp: 651-660).
54. **Booth, D.B., J.R. Karr, S. Schauman, C.P. Konrad, S.A. Morley, M.G. Larson, and S.J. Burges, (2004).** Reviving urban streams: land use, hydrology, biology, and human behavior. *Journal of the American Water Resource Association*, October 1351-1364
55. **Cowan, M.M., (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12 (4): 564- 582.
56. **Harkati B, (2011).** valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille ASTERACEAE : *Scorzonera Undulata*, Thèse de doctorat Université Mentouri Constantine.
57. **Lake, B. G., (1999).** Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food and Chemical Toxicology* 37(4); pp: 423-453.
58. **Smyth, T., Ramachandran, V. N., et Smyth, W. F., (2009).** A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33(5); pp: 421-426.
59. **Floc'h F., Mauger, F., et Desmurs, J. R., (2002).** Coumarin in plants and fruits." *Perfumer & flavorist* 27(2); pp:32-36.
60. **Cohen A. J., (1979).** Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man." *Food and Cosmetics Toxicology* 17(3) ; pp:277-289.
61. **Hoffman L, (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I.

62. **Betina Bencharif Soumeya., (2014).** Isolement et caractérisation de saponosides extraits de deux plantes médicinales : *Cyclaen africanum*, *Zygophyllum cornutum*, et évaluation de leur activité anti-inflammatoire. Thèse de Doctorat en cotutelle Université de Constantine1/Université de Bourgogne.
63. **Das T K., Banerjee D., Chakraborty D., Pakhira M C, Shrivastava B, Kuhad R C., (2012).** Saponin: Role in Animal system. *Vet. World.* 5(4): 248-254
64. **Thakur M , Melzig M, Fuchs H, Weng A., (2011).** Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. 1. 19–29
65. **Abid A., Naqvi T.S., Naqvi M.S., (2012).** Identification of Phytosaponins as Novel Biodynamic Agents: An Updated Overview. *ASIAN J.EXP.BIOL.SCI.* 3 459-467
66. **Chaieb I., (2010).** Saponins as insecticides: a review. *Tunisian Journal of Plant Protection* 5. 39-50.
67. **Makkar H.P.S., Siddhuraju P., Becker K (2007).** Plant Secondary Metabolites Humana. 17-26
68. **Zenk M.H., Juenger M, (2007).** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68, (22-24), pp: 2757-2772.
69. **Stöckigt J., Sheludk Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H. and Stöckigt D, (2002).** High performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoreticelectrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of Chromatography A*, 967(1), pp: 85-113.
70. **Dehak K., (2013).** Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles. Université KASDI Merbah Ouargla.
71. **Beddou F, (2015).** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid.Tlemcen, Algérie.
72. **Tadeusz Aniszewski, (2007).** Alkaloids - Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role, *Elsevier*.
73. **M. Paris, M. Hurabeille, (1986).** Abrégé de matière médicale, tome2, Masson, 256-266.
74. **Vigor Claire,Vercauteren Joseph et Montels Jérôme, (2010-2011).** TRAVEAUX PTATIQUES DE PHARMACOGNOSIE; les substances naturelles dans la chaîne médicament.

75. **Organisation mondiale de la santé, (2003).** K.P. Stenart B, editor(ed), World cancer raport Lyon, Larc Press, PP.11.
76. **Bruneton, (1993).** Phytochimie et plantes médicinales; Paris, Pharmacognosie 2 édition, Techniques et documentation, Lavoisier, pp.200-274.
77. **BEDIAGA M., (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali . thèse de doctorat. Université de bamako . p 10.
78. **Malecky, M. (2005).** Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. p 9, 13-19, 20, 27.
79. **Benaissa O., (2011).** Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.
80. **Loomis D; Croteau R., (1980).** Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds.) The Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function No. 4. pp: 364-410. Academic Press, San Francisco.
81. **Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., Glass C.K., Merrill A.H. Jr., Murphy R.C., Raetz C.R., Russell D.W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., VanNieuwenhze M.S., White S.H., Witztum J.L., Dennis E.A., (2005).** A comprehensive classification system for lipids, *J Lipid Res.*, vol. 46(5), pp:839-861
82. **Fernandez, M. A., De las Heras, B., Garcia, M. D., Sáenz, M. T., Villar, A., (2001).** New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene Iupeol. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, pp :1533–1539.
83. **Nirmal, S. A., Pal, S. C., Mandal, S. C., Patil, A. N., (2012).** Analgesic and anti inflammatory activity of β -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Inflammopharmacology* 20, pp :219–22
84. **Rahal, S., (2004).** Chimie des Produits Naturels et des Etres Vivants, pp:39-44.
85. **FIGUEREDO G., (2007).** Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (*Lamiaceae*) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne, École Doctorale Des Sciences Fondamentales. P13.
86. **Rakotonanahary, M., (2012).** thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28

87. **Oussala M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M, (2006).** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat-Meat Science, Vol. 73; pp 236-244.
88. **LAIB, I., (2011).** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs, diplôme de Magister en Sciences Alimentaires, université Mentouri Constantine. p23, 25- 27.
89. **Svoboda K.P. et Hampson J.B., (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plantes : antibacterial, antioxidant, antiinflammatory other related pharmacological activities.plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK.,KA6 5HW.)
90. **Baser, K.H.C. and G. Buchbauer, (2015).** Handbook of essential oils: science, technology, and applications: CRC Press.
91. **Valnet, (2003).** Les huiles essentielles, une santé toute naturelle. Phytothérapie de la recherche à la pratique, 1(1), 12.
92. **Willem, J.P., (2009).** 60 maux sont soignés par les huiles essentielles : l'aromathérapie au quotidien pour toute la famille, Les minipockets de santé.

Chapitre III

- ACTIVITÉS
BIOLOGIQUES
(ANTIOXYDANTE ET
ANTIBACTÉRIENNE)

II.1. Activité anti-oxydante

II.1.1. Introduction

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermie), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé et la production de radicaux dérivés de l'oxygène ^[1].

II.1.2. Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles ^[2] (**Figure II.1**). Cette perturbation peut avoir diverses origines, telle que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants comme la pollution, un contact avec le rayonnement gamma, ultraviolet ou même l'ozone, certains pesticides et solvants, métaux toxiques, exercice intense ou mal géré, consommation de tabac et d'alcool et aussi prise des médicaments ^[3].

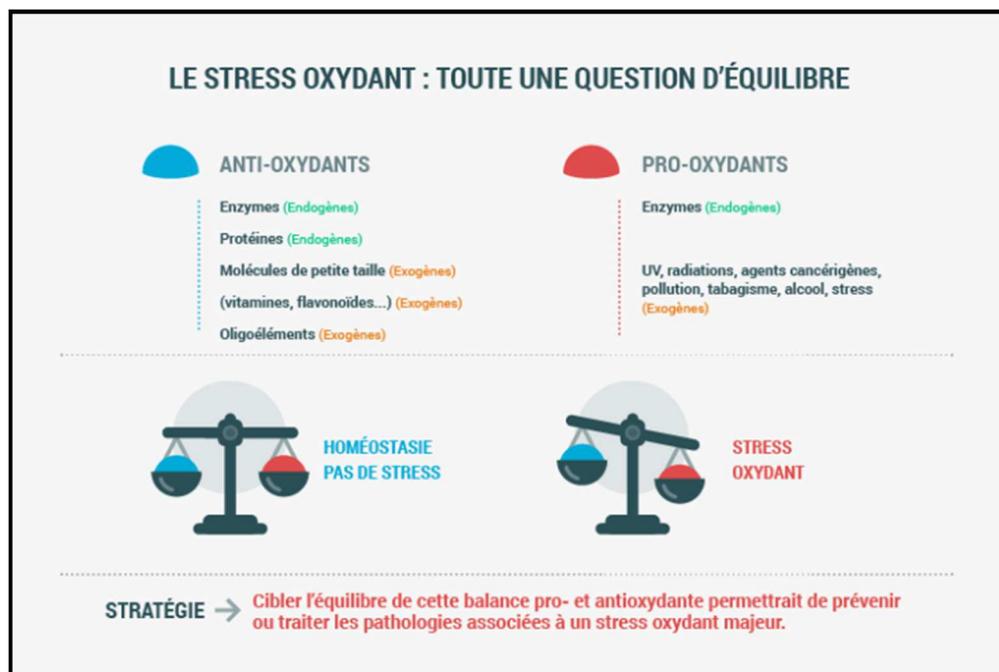


Figure II .1: Stress oxydant.

Cependant, le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources anti-oxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer ^[4].

II.1.3. Radicaux libres et espèces réactives

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés ^[5], cette molécule est très instable et réagi rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre ^[6].

Les espèces réactives oxygénées ERO, classe spécifique de radicaux, incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyl ($\text{OH}\cdot$), le radical superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) et sa forme protonnée ($\text{HO}_2\cdot$), le radical peroxy ($\text{ROO}\cdot$) ainsi que les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène (O_2), sont produites par divers mécanismes physiologiques à dose raisonnable (**Figure II.2**) ^[7]. Ces espèces réactives de l'oxygène doivent être neutralisées immédiatement par différents systèmes antioxydants ^[8].

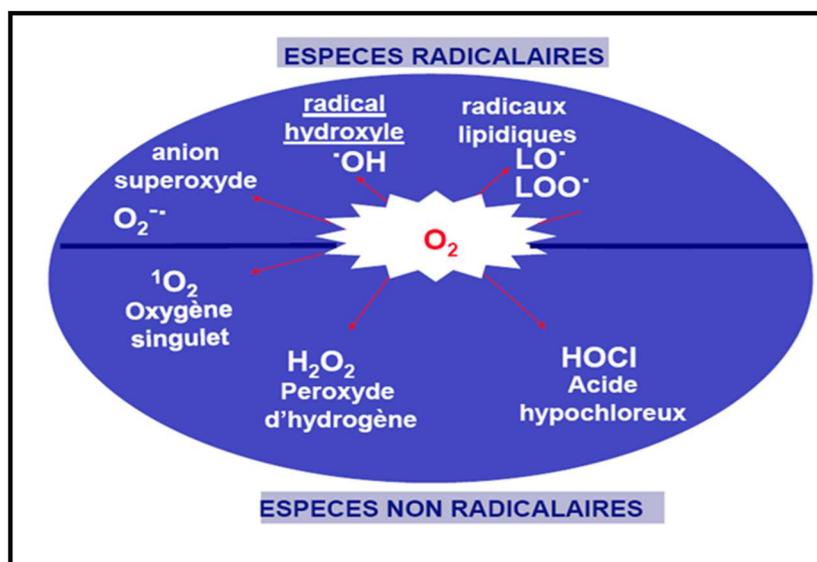


Figure II.2: Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO).

II.1.4. Origines des espèces réactives de l'oxygène

Il existe deux sources différentes de ces radicaux libres :

➤ Production endogène

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP (Adenosine DiPhosphate) en ATP (Adenosine TriPhosphate). Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des ERO (**Figure II.3**) [9-10].

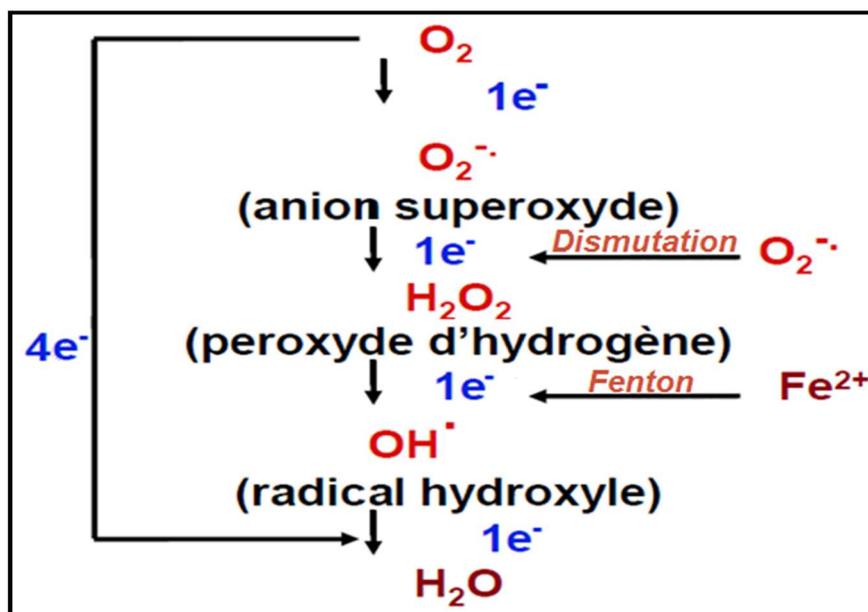


Figure II.3 : Formation des Espèces Réactives résultant d'une réduction progressive de l'oxygène.

➤ Formation par voie exogène

Les ERO peuvent également être générées par différents agents non enzymatiques comme les rayonnements UV induisant la synthèse de radicaux libres ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) et des molécules génératrices de radicaux libres (H_2O_2) par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants,

ainsi que les radiations ionisantes (**Figure II .4**). L'ingestion d'alcool ou de médicaments est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes dont les structures peuvent jouer le rôle d'accepteurs et de donneurs d'électrons ^[11].

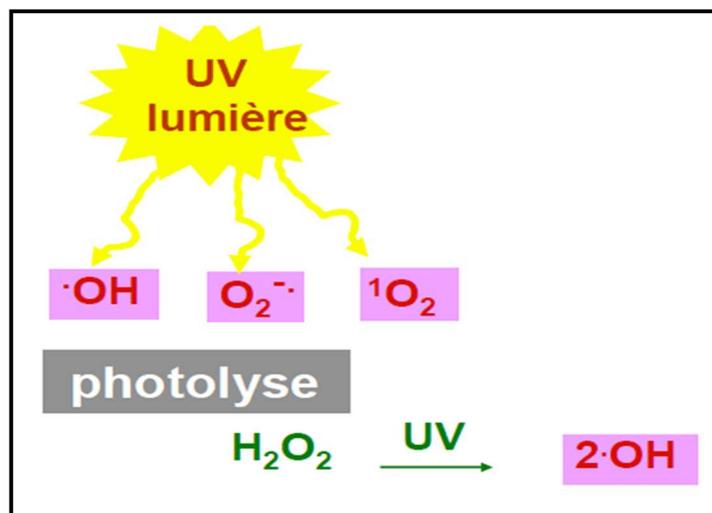


Figure II.4: Radiations UV de la lumière.

II.1.5. Maladies liées aux stress oxydatif

De nombreuses anomalies pathologiques sont induites par le stress oxydant : baisse de la fluidité des membranes, diminution de la sensibilité à l'insuline, perturbation de l'immunité cellulaire, fibrose, dépôts de lipides oxydés, affaiblissement musculaire, lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides, malformation des fœtus, formation d'auto-anticorps et immunosuppression ^[12,13].

En conséquence, le stress oxydant sera la cause initiale et essentielle de plusieurs maladies telles que le cancer, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse pulmonaire aigu, l'œdème pulmonaire, le vieillissement accéléré, l'Alzheimer, parkinson, les infections intestinales, le rhumatisme et le diabète ^[14,15].

II.1.6. Antioxydants

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des RL. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme «antioxydant». Du point de vue biologique, les antioxydants sont toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe

significativement l'oxydation de ce substrat [16], et dont les produits de réaction avec l'oxydant ne sont pas toxiques [17].

II.1.6.1. Caractéristiques des antioxydants:

Un composé est considéré antioxydant *in vivo*, lorsqu'il requière les propriétés suivantes [15].

- ✓ Agi spécifiquement sur les radicaux libres ;
- ✓ Chélate les métaux de transition ;
- ✓ Agi en synergie avec d'autres antioxydants pour se régénérer ;
- ✓ Agi à des concentrations physiologiques relativement faibles ;
- ✓ La demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant.

II.1.6.2. Principe des antioxydants:

La réaction d'oxydation est souvent une réaction en chaîne, les anti-oxydants bloquent cette chaîne et empêchent ainsi les radicaux libres d'attaquer les cellules du corps. Les anti- oxydants vont se lier aux radicaux libres et réalisent une réaction d'oxydation avec eux, ce qui va les rendre inoffensifs et donc rendre impossible leurs oxydations par les protéines ou les acides gras (Figure II.5).

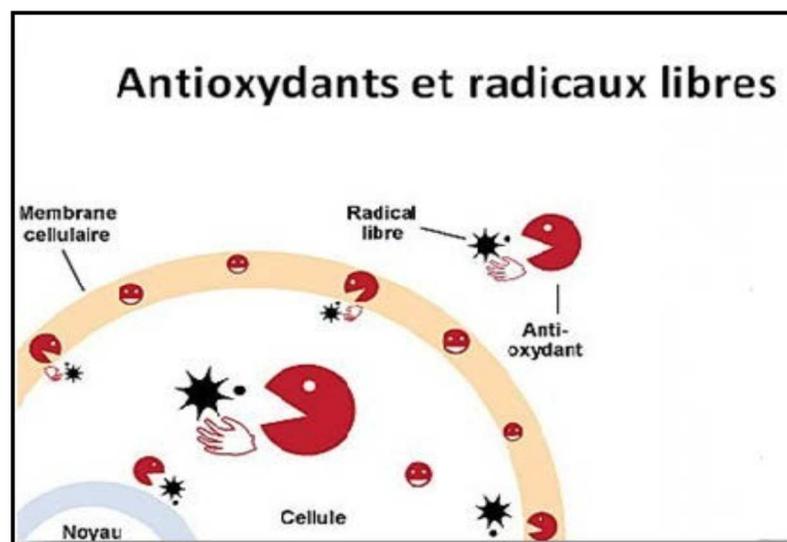


Figure II.5 : principe des antioxydants.

II.1.7. Antioxydants et système de défense

Les antioxydants, analogues de l'acide ascorbique, sont des substances naturellement présentes dans l'organisme et capables de neutraliser ou stabiliser les radicaux libres par résonance (**Figure II.6**). L'organisme possède des enzymes qui peuvent métaboliser les ERO [18].

Les systèmes de défense contre les dommages induits par ROS/RNS sont classés en trois catégories : Les antioxydants préventifs qui suppriment la formation de radicaux libre, les antioxydants piègeurs de radicaux, qui inhibent ou empêchent le déclenchement des réactions en chaîne et arrêtent la propagation et les antioxydants impliqués dans des processus de réparation.

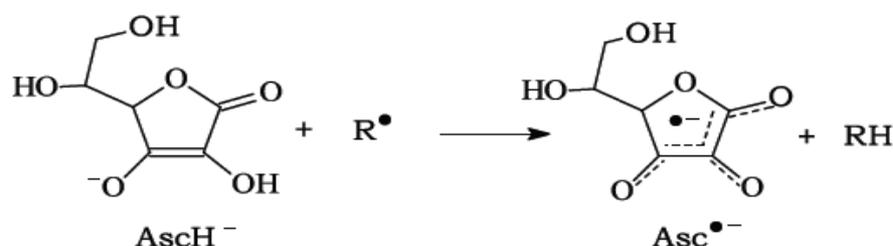


Figure II.6 : Actions de la vitamine C sur les radicaux actifs.

En effet, les cellules disposent d'un ensemble complexe de défenses anti-oxydantes (**Figure II.7**). Ces dernières peuvent se diviser en systèmes non enzymatiques ; apportées par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; et systèmes enzymatiques qui se composent d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et les systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases [19].

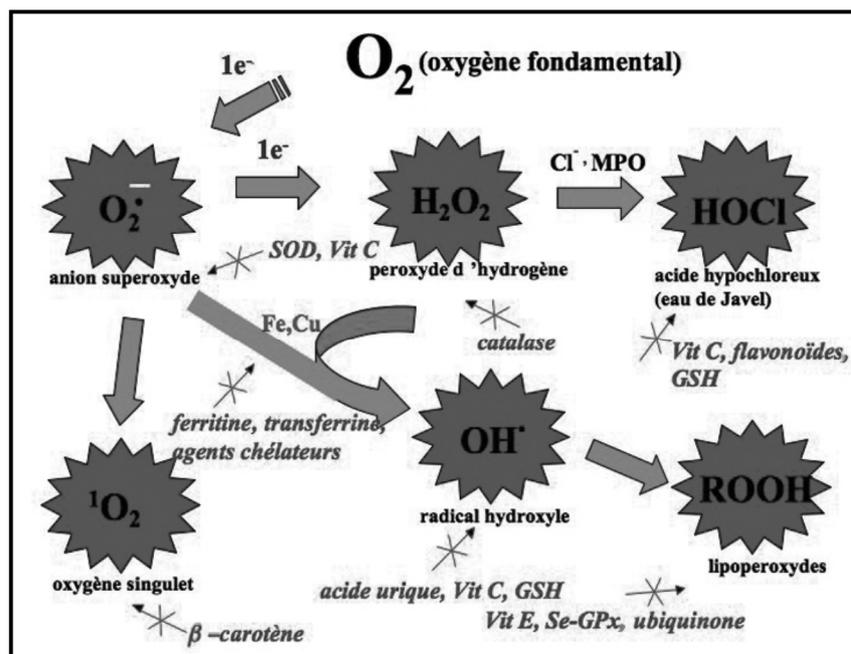


Figure II.7 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (ERO) et des antioxydants régulateurs de leur production.

II.1.8. Rôle des antioxydants dans la prévention des AVC (accidents vasculaires cérébraux) et de l'hypertension artérielle

Si les antioxydants ont le pouvoir d'excéder la capacité des radicaux libres à endommager les tissus de l'organisme et prévenir, particulièrement, les maladies cardiovasculaires, il paraît évident de corrélérer ce pouvoir à une activité vasodilatatrice. En effet, Burn et al, 2000 [20] et K.Chira et al. 2008 [21], ont démontré une étroite relation entre l'activité antioxydante et la capacité vasodilatatrice d'un groupe de composés phénoliques. De même, d'autres études ont abouti à conclure que les antioxydants agissent comme vasodilatateurs et par la suite aident à baisser la pression artérielle et prévenir les attaques vasculo-cérébrales (AVC) [19,22,23].

II.1.9. Méthodes d'évaluation des propriétés anti-oxydantes *in vitro*

L'activité anti-oxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) [24] ainsi, que les composés phénoliques (acide gallique) (Figure II.8).

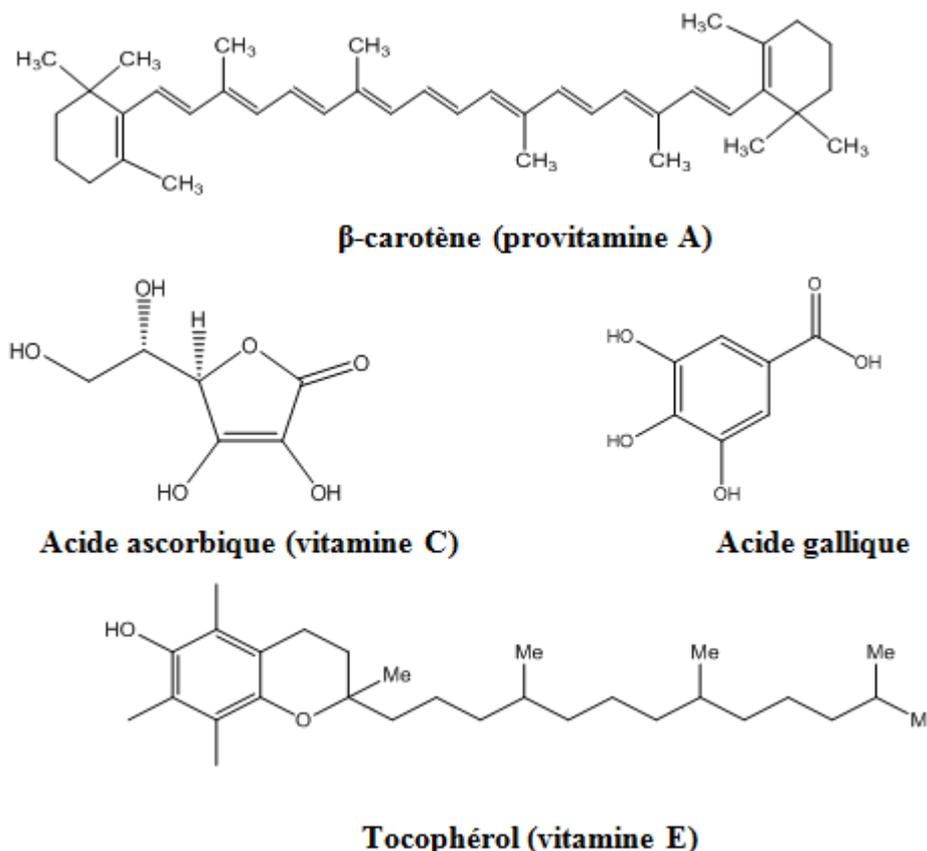


Figure II.8 : Structure des antioxydants les plus connus.

En revanche, la plupart des structures des antioxydants possèdent des groupes hydroxyphénoliques dont les propriétés anti-oxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet) [25].

Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer, *in vitro*, l'activité anti-oxydante par piégeage de radicaux différents (**Tableau II.1**), comme les peroxydes ROO^\bullet par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) [26] et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) [27] les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) [28] ou les radicaux ABTS^\bullet (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) [29] ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH^\bullet (diphényl-picrylhydrazyle) [30].

Du point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH^\bullet est recommandé pour des composés possédant la fonction OH [31]. Il s'effectue à température ambiante, ceci permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles.

Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits naturels très riches en composés phénoliques [32,33].

Tableau II.1: Aperçu des différents tests pour la mesure de la capacité antioxydante globale.

Méthode	Nom	Générateur de radicaux	Standard	Mesure/Calcul
TEAC	Total équivalent antioxydant capacité	ABTS + horseradisch peroxydase + peroxyde d'hydrogène formation du radical (ABTS•+)	Trolox	Décoloration du radical ABTS•- : $\lambda=734$ nm Unité : équivalent Trolox
FRAP	Ferric reducing ability of plasma	Réduction du Fe(III) (TPTZ) ₂ Cl ₃	Fe(II)	Changement d'absorbance à $\lambda=593$ nm Unité : FRAP par rapport à une solution de Fe(II)
CUPRAC	Cupric reducing antioxydant capacity	Réduction du cuivre(II) néocuprione	acide urique	Absorbance à $\lambda =450$ nm Unité : équivalent d'acide urique
DPPH	2,2 diphénylpicrylhydrazyl	DPPH	Trolox	Diminution de l'absorbance $\lambda=515$ nm Unité : équivalent Trolox
TRAP	Total radical trapping parameter	2,2-azobis (2-amidinopropane) dichlorohydrate (APPH) radicaux peroxydes de nature hydrophile	Trolox	Diminution de la fluorescence de la β -phycoérythrine ($\lambda=495$ nm et $\lambda=575$ nm). Unité : équivalent Trolox
ORAC	Oxygène radical antioxydant capacité	2,2-azobis (2-amidinopropane) dichlorohydrate (APPH) radicaux peroxydes de nature hydrophile	Trolox	Diminution de la fluorescence ($\lambda=485$ nm et $\lambda=520$ nm) Unité : équivalent Trolox

II.1.10. Réaction entre le radical libre DPPH et l'antioxydant [34]

Le composé chimique 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité anti-oxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un anti-oxydant se fait en suivant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à $\lambda = 517$ nm.

II.2. Activité antibactérienne

II.2.1. Introduction

Les bactéries sont responsables de diverses infections dans les organismes vivants. Les chercheurs ont espéré pouvoir éradiquer certaines maladies avec la découverte des antibiotiques. Malheureusement la large utilisation de ces médicaments a généré une résistance croissante des bactéries face aux antibiotiques. Dans cette perspective, il y a eu un grand intérêt pour la recherche de nouvelles substances biologiquement actives et efficaces comme alternative à partir des ressources naturelles.

II.2.2. Définition

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires, classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, et protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria.

Ces dernières ont généralement un diamètre inférieur à 1 μ m. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique [35].

II.2.3. Culture des bactéries

On utilise habituellement, pour cultiver les bactéries, des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viande. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et de se solidifier à des températures inférieures à 40°C. En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont

confluentes et forment une nappe.). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon [35,36].

II.2.4. Les antibiotiques

Ils sont définis par Turpin et Velu comme : « Tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimio-thérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose et d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des micro-organismes ou même de certaines cellules des êtres pluricellulaires » [37]. Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) [38].

✧ Classification des antibiotiques

Il existe plusieurs classifications des antibiotiques, elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Cette dernière est la plus fréquemment rencontrée. Les principales familles chimiques des antibiotiques sont: Bêtalactamines: pénicilline et céphalosporines; Aminosides: streptomycine, gentamycine; Chloramphénicol et thiamphénicol; Cyclines: tétracyclines, doxycycline. Macrolides et apparentés : Erythromycine et oléandomycine [39].

II.2.5. Activité antimicrobienne des extraits des plantes

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portée par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons et intégrons). Ces résistances ont conduits à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques, d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) [40,41].

Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenel (*Foeniculum vulgare*), peppermint (*Mentha piperita*) et thyme (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus [42,43].

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle [44].

II.2.6. Description des bactéries étudiées

Les bactéries représentent un groupe étonnamment complexe et fascinant. Ce sont des organismes cellulaires simples appelés Procaryotes qui ne contiennent pas de noyaux et qui sont d'habitude trouvés en très grand nombre parce qu'ils peuvent se multiplier rapidement. Bien que les bactéries soient microscopiques, on distingue différentes morphologies. Les plus communes sont les tiges, les cocci (circulaire) et la spirale. Elles peuvent être grandes, petites, ovales, grosses, longues, courtes ou encore plus épaisses. Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (Gram positif et Gram négatif), basés sur la différence de la structure et de la composition chimique de la paroi cellulaire (**Figure II.9**).

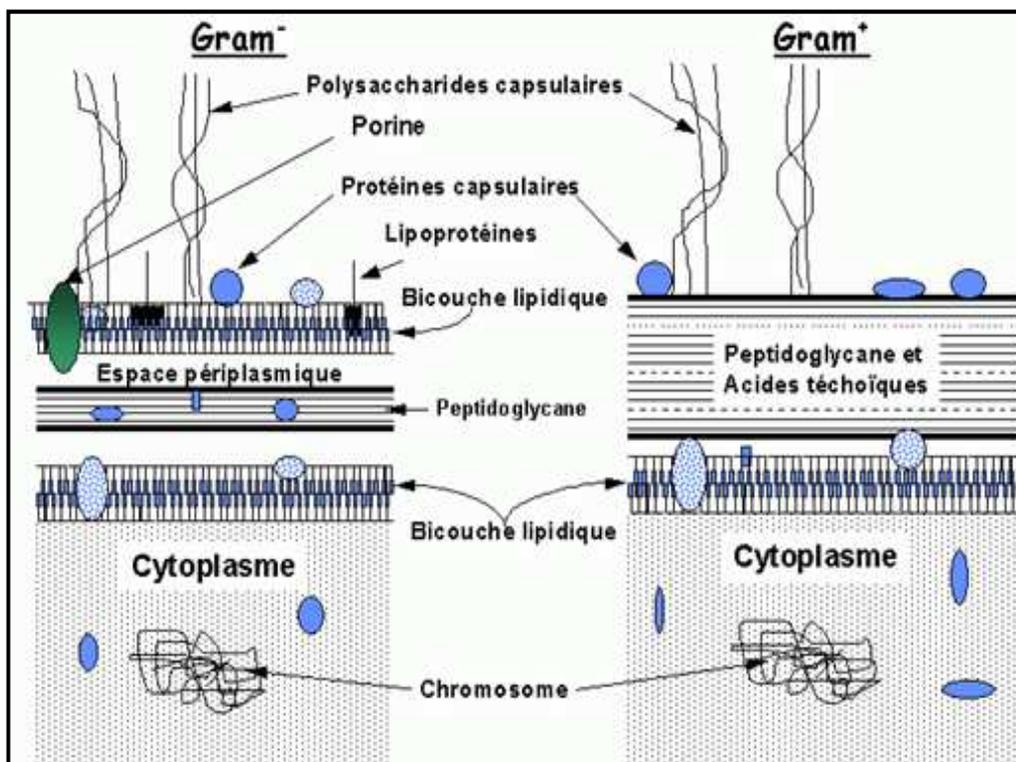


Figure II.9: Structure de la paroi bactérienne.

a) Escherichia coli

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal et qui appartient à la famille des Entérobactéries. Elle est de forme non sporulée, de type aérobie facultative et généralement mobile grâce aux flagelles. Sa longueur varie de 2 à 6 μm alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm . *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës de l'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires [45].

b) Staphylococcus aureus

Ce sont des cocci Gram positif appartenant à la famille des Micrococcaceæ avec un diamètre de 0,5 à 1,5 μm , de forme non sporulée qui tendent à se grouper en paires et en petites chaînes et habituellement non capsulée ou possédant des capsules limitées. Elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë et intoxication alimentaire [46].

c) Pseudomonas aeruginosa

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies et mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles. Ces bactéries synthétisent deux principaux types de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert. Il s'agit de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques [47]. *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires et 8% des infections suites aux blessures chirurgicales [48].

d) Candida albicans

Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levuriformes. *Candida albicans* est le plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo-vaginale, ou de la bouche. Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *Candida albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80% des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées et superficielles muco-cutanées [49].

e) Enterococcus faecalis

Gram positif anaérobies facultatifs, flore normale du tractus gastro-intestinal, des voies génitales féminines, et de la cavité orale, elles provoquent des infections des voies urinaires, des plaies et des tissus mous entraînant une endocardite en présence de valvules cardiaques déjà lésées. *Enterococcus faecalis* est résistant aux β -lactames, aux aminoglycosides et à la vancomycine [50].

f) Salmonella

Bacille à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae et au genre Salmonella. Ce genre comporte 2 espèces (*S. enterica* et *S. bongori*). C est la première cause de toxi-infections alimentaires collectives bactériennes dans le monde. Elle est l'une des préoccupations majeures des laboratoires de contrôle de qualité alimentaire. *S. Typhimurium* est largement répandue dans les différents réservoirs animaux (porcs, bovins, volailles...) et dans certaines denrées destinées à l'homme [51].

g) Klebsiella oxytoca

Non mobiles, capsulés avec colonies à aspect de muqueuses sensibles à la Gentamicine, la Kanomycine, la Céphalosporine et la Polymyxine B mais pas sensibles à la pénicilline. Commensales du tube digestif, elles provoquent des infections urinaires ou respiratoires, parfois compliquées de septicémies et d'infections nosocomiales [52]. Les *Klebsiella* sont des Enterobacteriaceae à bacilles gram négatif, immobiles et capsulées (sauf 6 % des souches de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*). Elles sont abondantes dans le sol et les eaux et sont des fixateurs de l'azote atmosphérique. [53].

h) Vibrio

Vibrio cholerae est un bacille Gram négatif en forme de bâtonnet incurvé et oxydase-positif. Il est doté d'une grande motilité et d'un seul flagelle polaire. Cette bactérie de 1 à 3 μm par 0,5 à 0,8 μm est un anaérobie facultatif de la famille des *Vibronaceae*. Les sérogroupes O1 (biotypes classique et El Tor) et O139, sont les principaux agents pathogènes en cause dans les épidémies de choléra. Les sérogroupes pathogènes produisent la toxine cholérique (CT), alors que les souches non pathogènes peuvent ou non produire cette toxine [54].

Références bibliographiques

1. **Walker, J.E.M., Saraste, M. J., Runswick And N. J. Gay (1982).** Distantly Related Sequences In The Alpha And Beta-Subunits Of ATP Synthase, Myosin, Kinases And Other ATP-Requiring Enzymes And A Common Nucleotide Binding Fold. *Embo J*, 1(8) .pp :945-51.
2. **Pincemail J, Meurisse M, Limet R Et Defraigne J O (1999).** L'évaluation Du Stress Oxydatif D'un Individu: Une Réalité Pour Le Médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* .4 (5).
3. **Poirier, J (2004).** L'indispensable Pour Vivre En Santé, Edition Merlin, P 72. Médart, J,(2009). Manuel Pratique De Nutrition: L'alimentation Préventive Et Curative. Editions De Boeck Supérieur, p. 49.
4. **Boyd B., Ford C., Koepke M.C., GaryK., Horn E., Mc Analley S., and Mc Analley B. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. 4 (6):7.
5. **Jacques B, and André R. (2004).** Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220223-225.
6. **Ben Aissa Bouguerne (2012).** Production Des Radicaux Libres :Doctorat De Luniv De Toulouse. p.7.
7. **Chu W L, Lim Y W, Radhakrishnan A K And Lim P E (2010).** Protective Effect Of Aqueous Extract From Spirulina Platensis Against Cell Death Induced By Free Radicals. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 10 (53), pp:2-8.
8. **Favier A (2003).**The Oxidative Stress: Concept And Experimental Interest To Understand Diseases Mechanisms And Therapeutic Approaches. *Actualité Chimique*, pp:108-115.
9. **Aurousseau, B (2002).** Les Radicaux Libres Dans L'organisme Des Animaux D'élevage : Conséquences Sur La Reproduction, La Physiologie Et La Qualité De Leurs Produits. *INRA Prod. Anim*, 15 (1): pp:67-82.
10. **J. Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle (2007).** Le Stress Oxydant. *Rev Med Liege*; 62; 10; pp:628-638.
11. **Tamer Fouad, M.D (2003).** Free Radicals, Types, Sources And Damaging Reactions, *Internal Medicine Articles*. ([Http://Www.Doctorslounge.Com/Primary/Articles/](http://www.Doctorslounge.Com/Primary/Articles/)).
12. **Favier A (2006).** Oxidative Stress In Human Diseases. *Annales Pharmaceutiques Francaises* 64, pp:390-396.

13. **Atawodi, S. E (2005).** Antioxydant Potential Of African Plants. *Afr J Biotechnol.* 4 (2), pp:128-133.
14. **Georgetti, S. R., Casagrande, R., Di-Mambro, V. M., Azzolini, A. E., Fonseca, M. J. V (2003).** Evaluation Of Antioxidant Activity Of Different Flavonoids By The Chemilu-Minescence Method. *A A P S Pharm Sci.* (2), 20.
15. **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 160:1-40.
16. **Rizzo AM., Berselli P., Zava S., et al. (2011).** Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Adv Exp Med Biol,* Vol. 698; pp: 52-67.
Tang S. Y. et Halliwell B. (2010). Medicinal plants and antioxydants: What do we
17. learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 394; pp:1-5.
18. **Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J. p et Canaud, B. (2002).** Stress oxidant, hémoïncompatibilité et complication de la dialyse au long cours. *Néphrologie.* 5; pp:201-208.
19. **T L Yue, H Y Cheng, P G Lysko, P J McKenna, R Feuerstein, J L Gu, K A Lysko, L L Davis and G Feuerstein (1992),** Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger the journal of pharmacology. <http://jpet.aspetjournals.org/content/263/1/92.short>.
20. **Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, Lister C, Matthews D, MacLean MR, Lean ME, Duthie GG, Crozier A; (2000).** Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines., *J Agric Food Chem.* 2000 Feb;48(2):220-230.
21. **K. Chira, J. H. Suh, C. Saucier, P. L. Teissèdre ; (2008).** Les polyphénols du raisin; Article de Synthèse Phytonutrition Fondamentale. Volume 6, pp 75-82.
22. **Schwarzacher SP, Hutchison S, Chou TM, Sun YP, Zhu BQ, Chatterjee K, Glantz SA, Deedwania PC, Parmley WW, Sudhir (1998).** Antioxidant diet preserves endothelium-dependent vasodilatation in resistance arteries of hypercholesterolemic rabbits exposed to environmental tobacco smoke. *J Cardiovasc Pharmacol.* 31(5); pp:649-53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593062>.

23. **G. Z. Feuerstein and R. R. Ruffolo JR (1995).** Carvedilol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection *European Heart Journal*.
24. **Barati Elbaz et Le Marechal, (2008).** Eudesmanolides from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, 43 ; pp : 309 - 311.
25. **Popovici C, Saykova I, Tylkowski B (2009).** Evaluation De L'activité Antioxydant Des Composés Phénoliques Par La Réactivité Avec Le Radical Libre DPPH. *Revue De Génie Industriel*, 4, pp:25-39.
26. **Cao, G.H., Alessio, H.M., Cutler, R.G (1993).** Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay For Antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 14: pp:303-311.
27. **Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U. Et Locke, S (1985).** Quantitative Measurement Of The Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Capacity Of Human Blood Plasma By Controlled Peroxidation. *FEBS Letters*, 187; pp:33-37.
28. **Benzie, I. F. F. Et Strain, J. J (1996).** The Ferric Reducing Ability Of Plasma (FRAP) As A Measure Of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239; pp:70-76.
29. **Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A (1993).** A Novel Method For Measuring Antioxidant Capacity And Its Application To Monitoring The Antioxidant Status In Premature Neonates. *Clin Sci*, 84; pp:407-412.
30. **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C (1995).** Use Of A Free Radical Method To Evaluate Antioxidant Activity. *Food. Sci. Technol*, 28; pp:25-30.
31. **Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell, G.P., Rice-Evans C.A (1995).** Polyphenolic Flavanols As Scavengers Of Aqueous Phase Radicals And As Chain-Breaking Antioxidants. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, pp:339-346.
32. **Yi-Zhong Cai, Mei Sun, Jie Xing, Qiong Luo, Harold Corke (2006).** Structure-Radical Scavenging Activity Relationships Of Phenolic Compounds From Traditional Chinese Medicinal Plants. *Life Sciences*, 78(25), pp:2872-2888.
33. **Hatzidimitriou Ef., Nenadis N., Tsimidou M.Z (2007).** Changes In The Catechin And Epicatechin Content Of Grape Seeds On Storage Under Different Water Activity (Aw) Conditions. *Food Chemistry*, 105, pp:1504-1511.
34. **Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C.(2004).** Electron- Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH Radical assay, *Journal Org Chem*, Vol.69; pp: 2309-2461.

35. **Lozniewski A., Rabaud C., (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques, Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux–Infections associées aux soins, CCLIN, Sud-Est, Nancy, p4.
36. **Nauciel C., Vilde J-L., (2005).** Bactériologie médicale. 2ème édition. Masson, Paris., p.78. 97
37. **Bergogne-Berezin E. et Dellamonica P. (1995).** Antibiothérapie en pratique clinique. Ed. Masson, Paris. 486p.
38. **Elghozi J.L., Duval D. (1992).** Pharmacologie 2ème Ed : Médecine Flammarion. Paris. 289p.
39. **Cohen Y et Jacquot C. (2001).** Pharmacologie. 5ème Ed. Masson. Paris. p.350.
40. **Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V. (2008).** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. Food Control. 19; pp:835–841.
41. **Kempf S. Zeitouni. (2009).** Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences Pathologie Biologie : article in press.
42. **Jürgen R., Paul .S., Ulrike S., and Reinhard S. (2009).** Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: Forsch Komplementmed.16; pp:79–90.
43. **Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y. J. et Li H.B., (2011).** Biological activities of polyphenols from grapes. International Journal of Molecular Sciences. 11(2) : 622-646.
44. **Huang Guangrong., Jiang Jiabin.,and Dai Dehui. (2008).** Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. African Journal of Biotechnol.7 (9); pp:1335-1338.
45. **Kaper J.B., Nataro J.P., et Mobley H.L. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2(2); pp:123-140
46. **Dworkin M.M. et FALKOW S., (2006).** Proteobacteria: Gamma subclass. Ed. Springer, New York. p.1248.
47. **Percival S., Chalmers R., Embrey M., Hunter P., Sellwood J. et Wynjones P., (2004).** Microbiology of waterborne diseases. Edition: Elsevier Academic Press, Amsterdam. p.480.
48. **Van Delden C. et Iglewski B.H., (1998).** Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerging Infectious Diseases. 4; pp:551-560.

49. **Delorme J. et Robert A., (1997).** Mycologie médicale. Ed. DÉCARIE, Mont-Royal Québec. p.184.
50. **Teixeira I.M., Carvalho m., Da siqueira G., Facklam R.R. (2007).** Enterococcus. In P. R. Murray (Ed.), Manual of Clinical Microbiology, pp : 430442.
51. **Medjbar M., Bouyoucef A., Benayad T., Zerrouki K. (2008).** Caractérisation des salmonelles dans les tueries avicole de la wilaya de Blida. Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. pp: 158-161.
52. **Berrada N., (2013).** L'athérombose : la maladie et les avancées thérapeutiques des vingt dernières années. Thèse de docteur en pharmacie, université d'Angers, France. 151p.
53. **François Denis, Marie-Cécile Ploy (2007).** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson, p.573.
54. **Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L. & Vergnes M.F. (2008).** Etude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. Phytothérapie. 6 ; pp:160-4.

Chapitre III

• ÉTUDE
SYSTÉMATIQUE DE
LA PLANTE
SÉLECTIONNÉE

I.1.Introduction

Depuis longtemps, les plantes médicinales furent une source inépuisable permettant de traiter certaines maladies et pathologies souvent mortelles.

En Algérie, les plantes médicinales forment un groupe relativement important et un réservoir inestimable de molécules bioactives, cependant un nombre limité d'espèces est étudié en terme d'investigation phytochimique et de valorisation biologique.

Au cours de nombreux travaux de recherche, une espèce a été récoltée : *Teucrium polium* L.; elle appartient à la famille botanique des **lamiacées**.

Ce chapitre présente une étude approfondie à propos de cette plante. Il met en valeur des données bibliographiques issues de son genre, sa famille et son usage en médecine traditionnelle.

III.2. Présentation de la région de Biskra

La wilaya de Biskra est située au Nord-est Algérien à environ 470 Km du sud-est d'Alger, elle s'étend sur une superficie de 21671,2 Km² et compte actuellement 12 Daïras et 33 communes.

Elle est limitée au : nord par la wilaya de BATNA, nord-est par la wilaya de KHENCHELA, nord-ouest par la wilaya de M'SILA, sud-est par la wilaya d'EL OUED, sud-ouest par la wilaya de DJELFA et au sud par la wilaya d'OUARGLA.

III.3. Site de prélèvement :

Djemourah est une commune de la wilaya de Biskra, situé à 37 km du nord de la wilaya. Elle est limitée au nord par les communes de :Ain Zaâtout et El kantara, au sud par la commune de Branis, à l'est par la commune de Tigharghar et à l'ouest par la commune d'El Outaya (**Figure III.1 et Figure III.2**). Elle couvre une superficie de 24917 Km. Son climat est chaud et sec en été et froid et sec en hiver.

Les paramètres géographiques de notre station d'étude sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau III.1: Situation géographique et bioclimatique de la station d'étude.

Station	Partie étudiée	Longitude (O)	Latitude (N)	Etage bioclimatique
Djemourah (Biskra)	Partie aérienne	5° 50' 39	35° 4' 11	Aride (sec)

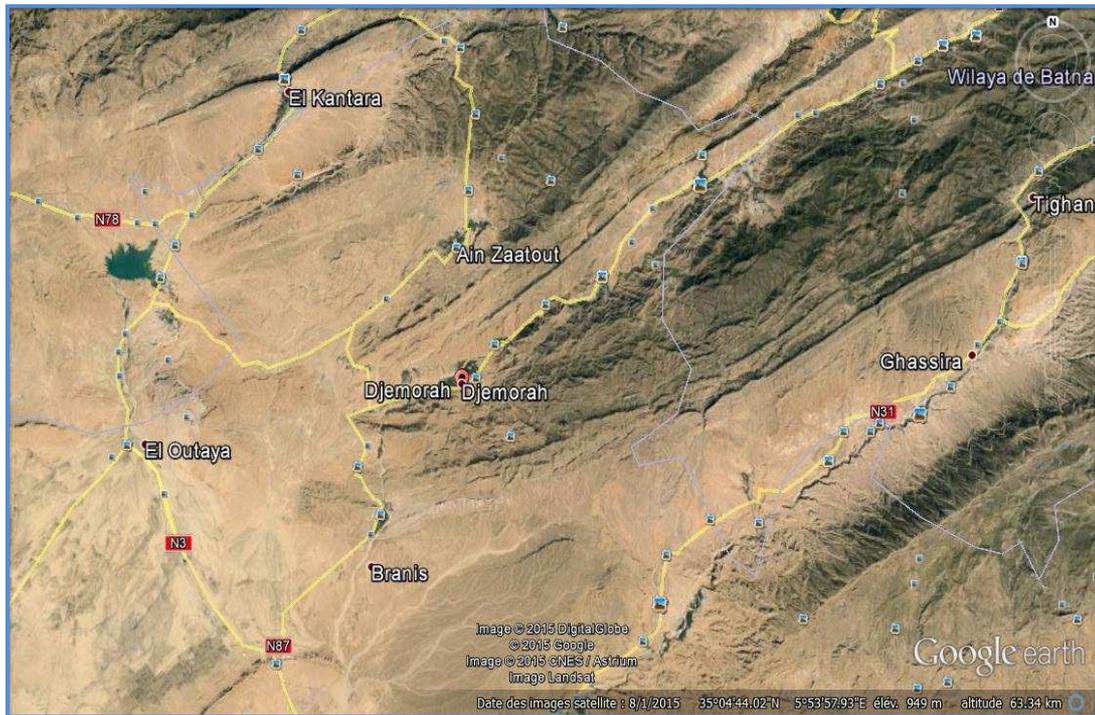


Figure III.1 : Une image brute de Google Earth de la commune Djemourah.

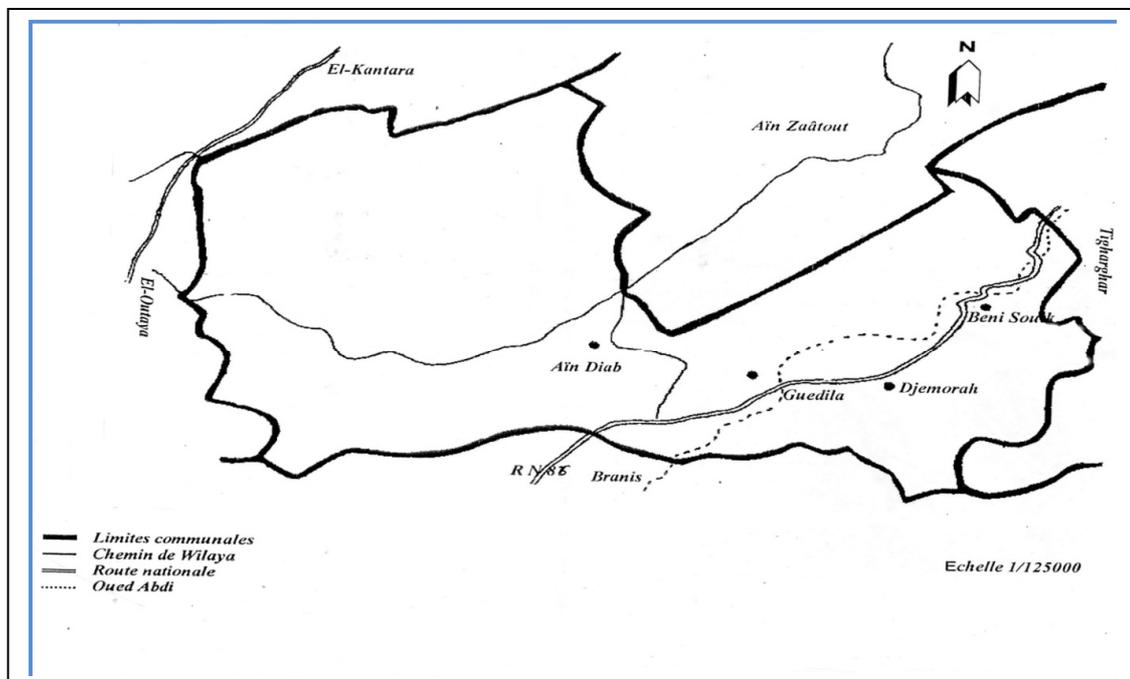


Figure III.2. : Limite administrative de la commune de Djemourah.

III.4. Présentation de la plante : *Teucrium polium* L.

III.4.1. La famille des Lamiacées.

La famille des **Lamiacées** ou **Labiées** est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant ^[1,2]. Les huiles essentielles caractérisent cette famille.

La famille des lamiacées est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 6 900 espèces et près de 258 genres ^[3], largement répartie dans le bassin méditerranéen. Elle est composée surtout de plantes herbacées, d'arbustes et de quelques arbres. Cette famille est divisée en deux principales sous-familles: les Stachyoideae et les Ocimoideae. Les lamiacées sont des herbacées ayant la consistance et la couleur de l'herbe, parfois sous-arbrisseaux ou ligneuses ^[4]. Une grande partie de ces plantes sont aromatiques et riches en huiles essentielles d'où leur intérêt économique et médicinal puisqu'elles permettent de produire des huiles essentielles, des condiments (sauge, thym, basilic, menthe etc.), ainsi que des infusions très prisées et fournissant des antibiotiques naturels utilisés en aromathérapie, en cosmétique et aussi pour la fabrication des parfums et des produits pour la peau ^[5].

Entre autres, un très grand nombre de genres de la famille des Lamiacées sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes, iridoïdes glycosylés et en composés phénoliques ^[6].

III.4.2. Systématique de la famille des Lamiaceae

D'après la nouvelle classification de l'APG 3 (Angiosperms Phylogeny Group 3, 2009) ^[7], la famille des Lamiacées est classée comme suit :

- ❖ Embranchement : Embryophytes
- ❖ Sous Embranchement : Trachéophytes
- ❖ Super Classe : Spermaphytes
- ❖ Classe : Angiospermes
- ❖ Grade : Triporées évoluées
- ❖ Grade : Astéridées
- ❖ Grade : Lamiidées (Euastéridées I)
- ❖ Ordre : Lamiales
- ❖ Famille : Lamiacées

III.4.3. Caractères généraux des Lamiacées ^[8,9]

- Les tiges sont quadragulaires, au moins dans leur jeune âge, et sont à rameaux opposés,
- Les feuilles opposées sont simples, parfois amplexicaules, toujours sans stipule et à limbe penninerve,
- Les inflorescences formées par de faux verticilles axillaires ou glomérules proviennent de la réunion de 2 cymes bipares,
- Les fleurs hermaphrodites ou unisexuées sont accompagnées de bractéoles et ont évolué vers l'adaptation à la pollinisation par les insectes (entomophilie),
- Le calice est gamosépale persistant à 5 sépales soudés,
- La corolle est gamopétale et zygomorphe. Elle comprend un tube plus ou moins long, droit ou incurvé et souvent poilu. Le limbe est bilabié, partagé en 5 lobes (2 pour la lèvre supérieure et 3 pour la lèvre inférieure),
- Les étamines sont au nombre de 4 : 2 grandes et 2 petites (sauf pour le genre *Mentha* qui en compte 5),
- Le gynécée est formé de 2 carpelles formant un ovaire biloculaire reposant sur un disque glanduleux et possédant 2 ovules par loge. Chaque loge se subdivise, par une fausse cloison, en 2 logettes uniovulées. Les ovules sont anatropes ascendants à raphé interne,
- Le fruit est un tétrakène formé de 4 nucules secs enveloppés par le calice.

III.4.4. Genre *Teucrium*

a) Présentation

Nom générique des germandrées (labiées) désignant en Latin *Teucrium*, mot venant du grec teukris. Le genre *Teucrium* fait partie des genres les plus importants de la famille des Lamiacées et est réparti en 340 espèces et variétés environ. D'un point de vue taxonomique, elles sont identifiables grâce à la forme du calice et de l'inflorescence ^[10].

b) Habitat et répartition géographique du genre *Teucrium*

Le genre de *Teucrium* est l'un des plus riches en espèces, qui se trouve en abondance au sud-ouest de l'Asie, de l'Europe et du nord de l'Afrique. Au nord (abandonnément trouvée dans le secteur Irano-Turanien, principalement méditerranéen et occidental), elle pousse dans les pelouses arides, les rocailles de basse altitude, les collines et les déserts arides ^[11]. Cette plante est présente dans la majorité des pays du Moyen-Orient et de la Méditerranée ^[12,13].

❖ **Dans le monde**

Ainsi, réparti sur différents pays du bassin méditerranéen, le genre *Teucrium* (Lamiaceae) est représenté en Iran par 13 espèces dont l'orientale avec quatre sous-espèces accroissantes, se sont : **orientale**, de l'espèce d'orientale de *Teucrium*, **glabrescens**, de l'espèce d'orientale de *Teucrium*, **taylori**, de l'espèce d'orientale de *Teucrium*, et **gloetrichum**, de l'espèce d'orientale de *Teucrium*^[14].

❖ **En Algérie**

Elle est assez commune dans l'espace méditerranéo-saharien, plus rare au Sahara septentrional et au Tassili, elle pousse dans les lieux rocaillieux et secs, les lits arides, les roches et les sables^[3,15]. C'est une plante méditerranéenne, commune dans l'atlas saharien. Elle pousse surtout dans les lits pierreux des oueds et dans les roches en altitude entre 1200 et 2600 m^[16,17].

Selon OZENDA^[15], les espèces les plus répandues de *Teucrium* en Algérie sont : *pseudo-chamaepitys*, *campanulatum*, *botrys*, *flavum*, *Kabylicum*, *lucidum*, *Polium*, *mauritanicum*, *montanum*, *compactum*, *albidum*, *bracteatum*, *buxifolium*, *atratum*, *santaequél*, *simonneau*, *ramosissim*, *scordiodes*, *fruticans*, *Spinosum* et *resupinatum*.

III.5. Etude monographique de l'espèce

Cette plante a été identifiée par Mr S. DOUMANDJI professeur à l'Institut ENSA, l'école nationale supérieure d'agronomie -ALGER-.

III.5.1. Systématique de la plante

- **Règne:** planta
- **Embranchement :** Angiospermes
- **Classe :** Dicotylédones
- **Ordre :** Tubiflorale
- **Famille :** Labiées ou Lamiacées
- **Genre :** *Teucrium*
- **Espèce :** *Polium* L.
- **Sous espèce :** *Thymoides*



Figure III.3. Représente la plante étudiée *Teucrium polium* L.

III.5.2. Nom de la plante

- **Nom Local** : Djada ; jaad ; Djaida
- **Nom arabe** : El Khayata
- **Nom Amazigh** : Thazirekth; Felfla-Timzourin; Haida; Timtchich.
- **Nom français** : Pouliot de Montagne
- **Nom en Italien** : Camedrio polio, Canitola polio.
- **Nom en espagnol** : Poleo montano, Tomillo terrero, Zamarilla.

III.5.3. Description de la plante

C'est une plante tomenteuse, blanchâtre, vivace de 10 à 30 cm moyennement velue et à odeur forte et désagréable, ces tiges sont nombreuses, ligneuses à base révolutes, en général à marges, grêles, dressées ascendantes et plus ou moins ramifiées. Les feuilles sont sessiles, oblongues ou linéaires, cunéiformes, crénelées, à bords plus ou moins enroulés régulièrement dentés et d'une couleur verte pâle en dessus et blanche en dessous.

Les inflorescences sont en têtes denses capituliformes serrés ; les fleurs jaunâtres et globuleuses ou ovoïdes, courtement pédonculés. Le calice, petit (3 à 4 mm) et en cloche, ayant des dents courtes triangulaires presque égales et très velues.

La corolle, à tube ne dépassant pas le calice, velue en dehors, a des lobes latéraux et linéaires, le médian est ovoïde; les fruits murs et secs, d'une couleur noire, légèrement creusés, rocaillieux et sèches.

La floraison est en la période, du mois d'avril au mois de juin ; les fleurs sont d'un jaune doré de 5 mm et la récolte est en printemps-été ; commun dans les broussailles et les friches [6,18].

Teucrium polium : Appartient à la série quatre

- Corolle bilabée; lèvre inférieure de la corolle à cinq lobes inégaux corolle caduque blanche- rocailles.
- Calice vert grisâtre.
- Feuilles linéaires ou lancéolées à marge, en général révolutes, denticulées-crénelées, inflorescences en têtes denses capituliformes ou un peu allongées, à bractées florales réduites mais ressemblent aux feuilles.

- Feuilles linéaires vert-grisâtres à marge pratiquement entière, quelques–unes: seulement crénelées. Cf supra : ssp *Thymoides* (pomel) batt, feuilles à marges distinctement crénelées.
- Espèces très polymorphes où la détermination des micro-morphes reste toujours délicate [3].

III.6. Valorisation des plantes associées à la plante étudiée

L'analyse de cortège floristique, du point de vue physiognomique, nous révèle que *Teucrium polium* L. sous espèce des *thymoides* se trouve en association avec certaines espèces de la strate herbacée : *Artemisia herba alba*, *Astragalus armatus*, *Atractylis flava*, *Gefn et*, *Annabasis articulata*, mais d'une manière générale, cette association se développe dans les mêmes conditions climatiques, ce sont les exigences édaphiques qui font leur différence.

Signalons la dominance des espèces herbacées en coussinet, généralement épineux, résultat d'un pâturage intensif sur les autres espèces comme *Artemisia herba alba* et *Annabasis articulata*.

Le plus remarquable, c'est que l'espèce *Teucrium polium* L se sert des espèces épineuses comme bouclier pour assurer son développement contre le cheptel (voir les photos des **Figures III.4-6**).



Figure III.4: Association des espèces épineuses avec *Teucrium polium* L. *Thymoides*.



Figure III.5: Alliance des différentes espèces avec *Teucrium polium* L. *Thymoïdes*.



Figure III.6: *Astragalus armatus* avec *Teucrium polium* L. *Thymoïdes*.

III.7. Données phytochimiques de la plante

Plusieurs chercheurs ont évalué la composition chimique de *Teucrium polium* L. développée dans différents secteurs géographiques. La plupart de ces études, basées sur l'analyse des extraits par des méthodes chromatographiques, ont révélé la présence de composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes et les tanins, ainsi que d'autres composés, tels que les saponines, les stéroïdes les terpénoïdes et les huiles essentielles.

Les composés chimiques thérapeutiques trouvés dans *Teucrium polium* L. comprennent: les polyphénols (Proestos et al., 2006); Stefkov et al., 2009; Djabou et al., 2012) ^[19,20,21], les diterpénoïdes avec un squelette neoclerodane, et avec plus de 220 diterpènes ^[22], les huiles essentielles principalement monoterpéniques/ les sesquiterpènes hydrocarbures et sesquiterpènes oxygénés Cozzani et al., 2005 ^[23]; Kabouche et al., 2007 ^[24]; Saroglou et al., 2007 ^[25]; Moghtader, 2009 ^[26]; Belmekki et al., 2013 ^[27]; Elmasri et al., 2014 ^[28]; Sadeghi et al., 2014 ^[29]; Khani and Heydarian, 2014 ^[30], les glycosides phenylethanoides tels que la verbascoside, poliumoside et la vandulifolioside Oganesyanyan et al., 1991; Ladjel et al., 1994 ^[31,32] et les glycosides de flavones avec aglycones très méthylés Rizk et al., 1986 ^[33]; Harborne et al., 1986 ^[34]; Kawashty et al., 1999 ^[35] et Sharififar et al., 2009 ^[36].

En 2009, Stefkov et al. ^[20], ont identifié six flavones aglycones: luteoline, apigénine, diosmétine, cirsiol, cirsimaritrine et cirsilinéol, cependant les composés stéroïdiens ont été isolés par Ulubelen et al., 1994 ^[37] et Kisiel et al., 1995 ^[38]. L'analyse des principes actifs révèle la présence des saponines Hassan, 2007 ^[39], des tanins et des alcaloïdes (Shakhanbeh et Atrouce, 2001; Parsaee et Shafiee-Nick, 2006 ^[40,41]). Le **Tableau II** cité dans l'annexe présente quelques exemples de composés isolés du genre *Teucrium*.

III.8. Utilisation de la plante

Très tôt au cours de l'évolution, les hommes, pour se soigner, utilisèrent les ressources présentes dans leur environnement naturel. Les plantes tinrent une place très importante qui ne s'est jamais démentie. *Teucrium polium* L. possède un large spectre d'effet pharmacologique:

- ❖ Plante vermifuge et stimulante, tout simplement.
- ❖ Dans la médecine folklorique iranienne, *Teucrium polium* est employé comme anticonvulsant [11].
- ❖ Des espèces de *Teucrium polium* ont été employées en tant qu'herbes médicinales pendant plus de 2000 an comme diurétique, inotropique et chronotropique [42], tonique, antipyrétique[24], cholagogue et anorexique [43].
- ❖ Le feuillage de *Teucrium polium* légèrement poivré, était couramment utilisé pour relever les salades ou parfumer les fromages de chèvre. Une infusion des feuilles et des fleurs était ainsi consommée comme boisson régénératrice [18].
- ❖ En médecine traditionnelle, le *Teucrium* est employée comme analgésique, antispasmodique et hypolipidémique. Cette plante peut avoir quelques intérêts d'ordre clinique: cas de désordres stomacaux [44,45] et gastro-intestinaux tels que la colite.
- ❖ L'huile essentielle de *Teucrium polium* possède une activité antispasmodique puissante ; L'extrait éthanolique de *Teucrium polium* s'est avéré, possédant des activités anti-inflammatoires, anticancéreux et antioxydants [46,47,48,49].
- ❖ D'autres espèces de *Teucrium* possèdent, également des effets pharmacologiques, comme combattre les rhumatismes, les troubles gastriques, la fièvre et les mucosités abondantes, elles accélèrent la cicatrisation des blessures [50,51].
- ❖ Seulement la tradition apporte des indications de traitement symptomatique de diarrhées légères et actuellement celles de l'hygiène buccale.
- ❖ *Teucrium polium* a été utilisée (partie aérienne) dans le traitement symptomatique des bouleversements digestifs et dans des états neurotoniques des adultes et des enfants, particulièrement dans des bouleversements plus petits du rêve [52].
- ❖ L'utilisation de l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* sur des milieux de culture de *Saccharomyces*, in vitro, a mené à diminuer le taux des acides gras et à bloquer la peroxydation au niveau des érythrocytes, il a montré ainsi des effets antibactériens et antifongiques [53,54].
- ❖ Cette plante est largement distribuée comme agent hypoglycémiant [55]. Sa décoction dispose d'un effet hypoglycémiant chez les rats normoglycémiques par rapport aux modèles hyperglycémiques induits par la streptozotocine [56].
- ❖ Par conséquent, d'autres investigations sont nécessaires maintenant pour élucider le mécanisme d'action pharmacologique et identifier les composants bioactifs responsables de telles actions afin d'expliquer leur efficacité thérapeutique [57].

Références du chapitre III

1. **Bekkali F., Averbeck S., Averbeck L., (2008).** «Review MI-Biological effects of essential oils A Review Food and Chemical Toxicology»; Vol 46; pp:446-475.
2. **Hilan C., Sfeir R., Jawish D., Aitour S., (2006).** Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae, Libanaise Science Journal, 7(2) ; pp :13-22.
3. **Quezel. P, Santa. S., (1963).** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Es.C.N.R.S, Ed. Paris, p.1165.
4. **Botineau, M., (2010).** Systematic and applied botany of flowering plants. Technique et Documentation Lavoisier.
5. **SOSA M. E., TONN C. E., (2006).** Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. Phytochem. Rev., 7(1); pp:3-24
6. **Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi M.S., Ghorbani A, (2005).** Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. Iranian J Pharmaceut Res, 2; pp:63-79.
7. **Dupont F. and Guignard J.L, (2012).** Abrégés de pharmacie. Botanique: les familles de plantes. 15^{ème} édition.
8. **Moyse, H., (1971).** Matière médicale, Tome III, Ed. Masson et Cie. pp : 255-256.
9. **Chadefaud, M. and L. Emberger, (1960).** Traité de botanique systématique, Les végétaux vasculaires, Tome II, Éd. Masson et Cie, pp. 832-833.
10. **Roukia H., (2009).** Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plante *Teucrium polium geyrii* provenant de la région Tamanrasset. Thèse de Magister. UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA.
11. **Abdollahi, M., H. Karimpour, and H.R. Monsef-Esfehani, (2003).** Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. Pharmacological Research. 481, pp:31-35.
12. **Moghtader M., (2009).** Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran. American-Eurasian Journal Agricultural Environmental Sciences, 5, 843-846.
13. **Kandouz M., Alachkar A., Zhang L., Dekhil H., Chehna F. Yasmeeen A. and Al Moustafa A.E., (2010).** *Teucrium polium* plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cells via the restoration of the E-cadherin/catenin

- complex. *Journal of Ethnopharmacology*, 129, pp:410-415.
14. **Javidania. K ,Miri. R., (2003).** Composition d'huile essentielle d'orientale d'espèce l'orientale L.de *teucrium*, in *journal de Iran de recherche d'huile essentielle JEOR*, Furel.net.
 15. **Ozenda. P., (1983).** Flore de sahra. CNRS. Éd, Paris, p.622.
 16. **Lemoine C., (2005).** Les fleurs méditerranéennes. Editions Jean-Paul Gisserot. p. 26.
 17. **Abdallah H. and Sahki R., (2004).** Le Hoggar promenade botanique. Espèces herbacées. Edition Ésope, p.311.
 18. **Boullard, B., (2003).** Plantes médicinales du monde : réalités et croyances. Paris, pp:1092-1107.
 19. **Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G.J.E., Komaitis M., (2006).** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95; pp:664–671.
 20. **Stefkov G., Karapandzova M., Stefova M., Kulevanova S., 2009.** Seasonal variation of flavonoids in *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 55 (1, 2) 33 – 40
 21. **Djabou N., Muselli A., Allali H., Dib M. E. A., Tabti B., Varesi L., Costa J., (2012).** Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, 83; pp:51-62.
 22. **Piozzi F., Bruno M., Rosselli S., Maggio A., (2005).** Advances on the chemistry of furanoditerpenoids from *Teucrium* genus. *Heterocycles*, 65; pp:1221-1234.
 23. **Cozzani V., Gubinelli G., Salzano E., (2005).** Criteria for the escalation of fires and explosions. In: *Proceedings of the 7th Process Plant Safety Symposium*, American Institute of Chemical Engineers, New York, NY, p. 225.
 24. **Kabouche A., Kabouche Z., Ghannadi A., Sajjadi S.E., (2007).** Analysis of the essential oil of *Teucrium polium* ssp. *Aurasiacum* from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 19; pp:44-46.
 25. **Saroglou V., Arfan M., Shabir A., Hadjipavlou-Litina D., Skaltsa H., (2007).** Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium royleanum* Wall. ex Benth growing in Pakistan. *Flavour Fragr. J.*, 22 ; pp :154-157.

26. **Moghtader M., (2009).** Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran. *American-Eurasian Journal Agricultural Environmental Sciences*, 5, pp :843-846.
27. **Belmekki N., Bendimerad N., Bekhechi C., Fernandez X., (2013).** Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(14), pp:897-902.
28. **Elmasri W.A., Hegazy M.E.F., Aziz M., Koksal E., Amor W., Mechref Y., Hamood A.N., Cordes D.B., Paré P.W., (2014).** Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*, 103 ; pp:107-113.
29. **Sadeghi H., Jamalpoor S., Shirzadi M.H., (2014).** Variability in essential oil of *Teucrium polium* L. of different latitudinal populations. *Industrial Crops and Products*, 54 ; pp :130-134
30. **Khani A., Heydarian M., (2014).** Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from *Teucrium polium* subsp. *Capitatum* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, pp:956-961. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60169-3.
31. **Oganesyan G.B., Galstyan A.M., Mnatsakanyan V.A., Shashkov A.S., Agababyan P.V., (1991).** Phenylpropanoid glycosides of *Teucrium polium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 27, pp :556-559
32. **Ladjel S., Lamara K., Al-Hillo M.R.Y., Paÿs M., (1994).** Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium* ssp. *Aurasianum*. *Phytochemistry*, 37 (6) ; pp : 1663–1666.
33. **Rizk A.M., Hammouda F.M., Rimpler H., Kamel A., (1986).** Iridoids and flavonoids of *Teucrium polium* herb. *Planta Med.*, (2) ; pp:87-88.
34. **Harborne J.B.,Tomas-Barberan F.A.,Williams C.A.,Gil M.I., (1986).** A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry*, 25 (12); pp:2811-2816.
35. **Kawashty S.A., Gamal El-Din E.M., Saleh N.A.M., (1999).** The flavonoid chemosystematics of two *Teucrium* species from Southern Sinai, Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27 ; pp:657-660.
36. **Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldini M., (2009).** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium*. *Food Chemistry*, 112 ; pp:885–888.

37. **Ulubelen A., Topcu G., and Kaya Ü., (1994).** Steroidal compounds from *Teucrium chamaedrys* subsp. *chamaedrys*. *Phytochemistry*, 36: 171D173.
38. **Kisiel W., Piozzi F., and Grzybek J., (1995).** Terpenoids from *Teucrium montanum* subsp. *Pannonicum*. *Planta Med.*, 61: 191-192.
39. **Hassan S.M., Gutierrez O., Haq A.U., Byrd J.A., Bailey C.A., Cartwright A.L., (2007).** Saponin-rich extracts from quillaja, yucca, soybean, and guar differ in antimicrobial and hemolytic activities. *Poult. Sci.*, 86:121.
40. **Shakhanbeh J., Atrouce O., (2001).** *Teucrium polium* inhibits nerve conduction and carrageenan induced inflammation in the rat skin. *Turk J Med Sci.*, 3 ; pp :15-21.
41. **Parsaee H. and Shafiee-Nick R., (2006).** Anti-spasmodic and anti-nociceptive effect of *Teucrium polium* aqueous extract. *Iranian Biomedical Journal*, 10 (3) ; pp :145-149.
42. **Niazmand, S., et al., (2008).** The positive inotropic and chronotropic effects of *Teucrium polium* L. extract on Guinea pig isolated heart. *Pharmacologyonline*. 2, pp:588-94.
43. **Khleifat, K., J. Shakhanbeh, and K.A. Tarawneh, (2002).** The chronic effects of *Teucrium polium* on some blood parameters and histopathology of liver and kidney in the rat. *Turkish journal of Biology*. 262, pp:65-71.
44. **Dehghani, F., et al., (2005).** Effect of *Teucrium polium* on histology and histochemistry in rat stomach. *INDIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY*. 243, p.126.
45. **Kaileh, M., et al., (2007).** Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential antiinflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*.
46. **Menichini F., Conforti F., Rigano D., Formisano C., Piozzi F., Senatore F., (2009).** Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry*, 115; pp:679–686.
47. **Harleva E., Nevoa E., Lansky E.P., Lansky S., Bishayeed A., (2012).** Anticancer attributes of desert plants. *Anti-Cancer Drugs*, 23:255–271,1133; pp:510-516.
48. **Elmasri W.A., Hegazy M.E.F., Mechref Y., Paré P.W., (2016).** Structure-antioxidant and anti-tumor activity of *Teucrium polium* phytochemicals. *Phytochemistry Letters*, 15 ; pp:81-87.
49. **Hasani P., Yasa N., Vosough-Ghanbari S., Mohammadirad A., Dehghan G.,**

- Abdollahi M., (2007). In vivo antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta Pharm.*, 57 ; pp:123–129.
50. Iserin. P. (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales*. Larousse- Bordas, Éd : p.335.
51. Rajabalian S., (2008). Methanolic extract of *Teucrium polium* L. potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines. *Exp Oncol.*, 30(2):133-8.
52. BRUNETON J., (2001). *Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux*. 2^{ém} édition Tec et Doc, Paris.
53. Mansour Mashreghi M., Soudabe Niknia S., (2012). The Effect of *Peganum harmala* and *Teucrium polium* Alcoholic Extracts on Growth of *Escherichia coli* O157. *Jundishapur J Microbiol.*; 5(3) ; pp :511-515.
54. Shahraki, M.R., et al., (2007). The effect of *Teucrium polium* (Calpoureh) on liver function, serum lipids and glucose in diabetic male rats. *Iranian Biomedical Journal*. 111, pp:65-68.
55. Kasabri V., Afifi F.U., Hamdan I., (2011). In vitro and in vivo acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2); pp:888-896.
56. Gharaibeh, M.N., H.H. Elayan, and A.S. Salhab, (1988). Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*. *Journal of ethnopharmacology*. 241, pp:93-99.
57. Ljubuncic P., Dakwar S., Portnaya I., Cogan U., Azaizeh H., Bomzon A., (2006). Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity in vitro. *Advance Access Publication*. 3(3); pp:329-338.

Chapitre IV

- MATÉRIELS ET MÉTHODES

IV.1. Introduction

Les plantes aromatiques constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation requière une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés des plantes dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques. L'intérêt porté sur ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. A cet effet, on s'est intéressé à l'une des espèces de la famille des Lamiacées : le *Teucrium polium L. ssp thymoïdes* et il est important de définir leurs identités, connaître leurs compositions chimiques et rechercher leurs activités biologiques. Dans cette partie expérimentale, deux axes ont été envisagés : Le premier axe concerne l'étude phytochimique, suivie par la quantification des teneurs en polyphénols par dosages. Dans le deuxième, nous nous sommes intéressés au pouvoir antioxydant et à l'activité antibactérienne des extraits issus de la partie aérienne de cette plante. Ce travail a été effectué selon le plan illustré dans la (Figure IV.1).

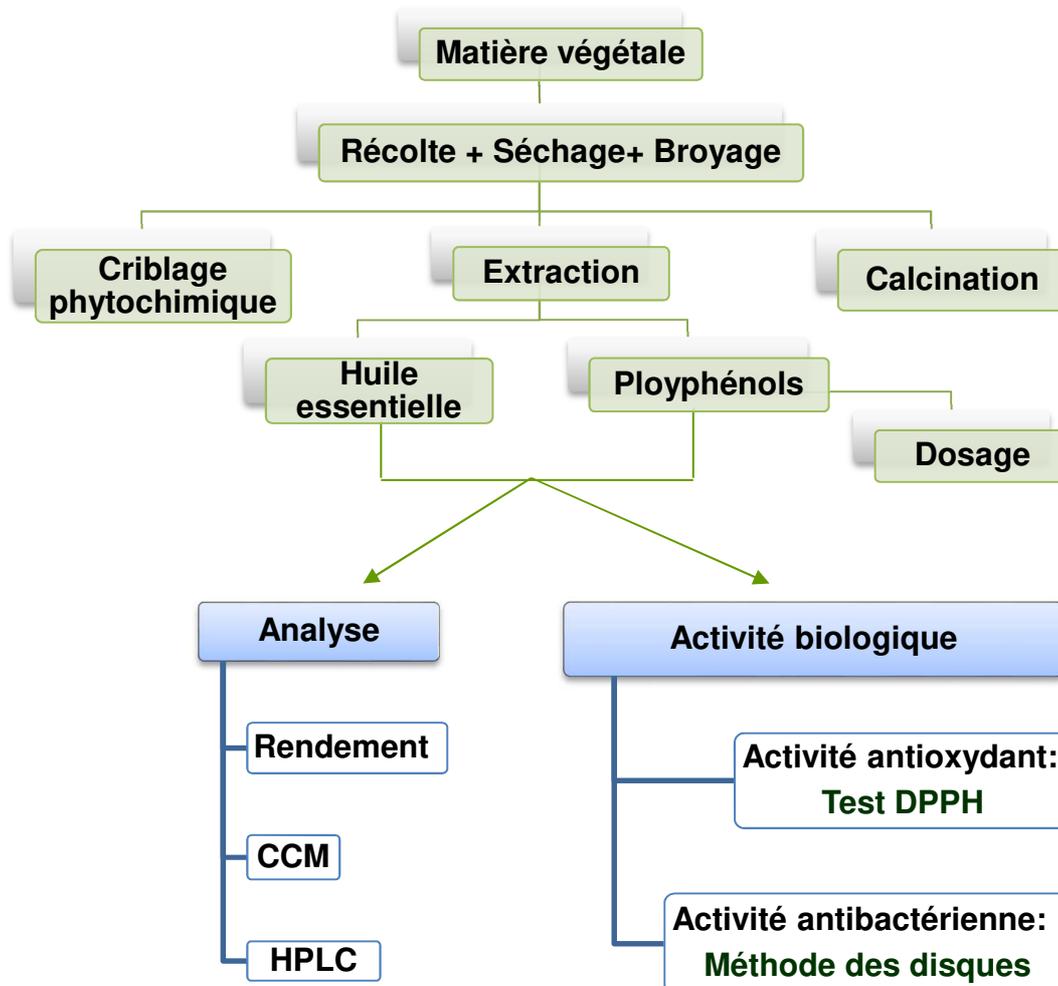


Figure IV.1: Plan général de la partie expérimentale.

IV.2.Récolte, Séchage et Broyage

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne (tiges, feuilles, fleurs) de la plante *Teucrium Polium* L. sous espèce des *Thymoides*, il a été récolté au mois de Mai dans la région de Beni souik de la wilaya de Biskra. Cette plante a été séchée à l'abri de la lumière et de l'humidité à température ambiante. Après séchage, puis broyage, cette dernière est réduite en poudre et stockée soigneusement dans un flacon en verre bien fermé dans un endroit sec, en vue de son utilisation ultérieure.

IV.3.Criblage phytochimique

Le screening chimique d'une drogue végétale représente toujours la première étape de l'étude chimique et permet d'orienter les recherches ultérieures.

Les techniques de détection utilisables pour un "screening" des substances actives doivent être rapides, simples et sensibles afin de ne mettre en œuvre qu'une faible quantité de matière végétale. Ces méthodes sont donc limitées à la détection de quelques groupes chimiques. Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, de réactions de coloration et de précipitation ainsi que sur des examens en lumière ultra violette.

IV.3.1.Tests chimiques d'identification

On procède aux tests chimiques d'identification, selon les méthodes décrites par Békro ^[1] et Béourou ^[2] avec quelques modification, de la manière suivante:

❖ Alcaloïdes :

Dans un erlenmayer de 50ml, introduire 6g de la Poudre végétale et 30ml d'une solution d'acide sulfurique à 10%. Agiter pendant 2 minutes puis filtrer avec papier filtre. Mettre le filtrat dans 4 tubes:

- Dans le 1^{er} tube, ajouter quelques gouttes de réactif de **MAYER** (couleur jaunâtre).
- Dans le 2^{ème} tube, ajouter quelques gouttes de réactif de **BOUCHARDAT** (couleur brune).
- Dans le 3^{ème} tube, ajouter quelques gouttes de réactif de **DRAGENDORFF** (couleur orangé).

❖ Polyphénols :

Dans un erlenmayer, introduire 6g de poudre végétale, ajouter un mélange d'eau distillée 6ml et 12ml d'acétone. Placer au bain marie (60°C max) pendant 5min environ, en agitant de temps en temps. Eviter une trop forte évaporation de l'acétone. Placer le filtrat dans un tube à essai de 16ml et lui ajouter 2 gouttes de solution de perchlorure ferrique (FeCl₃).

❖ Flavonoïdes :

Macérer 10 g du produit dans 150ml d'HCl à 1% pendant une nuit, filtrer et procéder aux tests.

- Prendre 10ml du filtrat, le rendre basique par NH₄OH. L'apparition de la couleur jaune claire indique la présence de flavonoïdes.
- Ajouter à 5ml du filtrat, 2,5ml d'alcool amylique, la phase alcoolique colorée en jaune indique la présence de flavonoïdes libres.
- Evaporer la phase aqueuse du test précédent sous vide, ensuite dissoudre le précipité dans 3ml d'HCl à 1% en chauffant légèrement, refroidir et ajouter 2,5ml d'alcool amylique. L'apparition de la couleur jaune indique l'existence de glycosides de flavones.

❖ Tanins :

Prendre 10g du produit, l'extraire avec de l'alcool éthylique 50°, filtrer puis tester le filtrat avec quelques gouttes d'une solution de FeCl₃. L'apparition d'une coloration verdâtre ou bleu - noir indique la présence des tanins.

La différenciation entre les tanins galliques et catéchiques se fait par le réactif de Stiasny (méthanal-acide chlorhydrique concentré 2 : 1v/v).

❖ Les tanins condensés : (Stiasny)

Dans un erlenmayer, introduire 6g de poudre végétale, Ajouter un mélange d'eau distillée 6ml et 12ml d'acétone. Placer au bain marie (60°C max) pendant 5min, en agitant de temps en temps. Eviter une trop forte évaporation de l'acétone. Placer 15ml de filtrat dans un erlenmayer et lui ajouter 8ml de réactif de Stiasny. Porter au bain-marie pendant 30min. L'apparition d'un précipité montre la présence des tanins condensés.

❖ Les tanins galliques:

Pour révéler les tanins galliques, filtrer le mélange précédemment chauffé et prélever 0,5ml du filtrat. Saturer ensuite le filtrat avec de l'acétate de sodium, ajouter à ce mélange, 100µl d'une solution de FeCl₃ à 1%. Le développement d'une teinte bleu-noire indique la présence des tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

❖ Saponosides :

Prendre 2g de produit sec, le chauffer dans 80ml d'eau distillée, filtrer et refroidir la solution et agiter le filtrat. L'apparition de mousse persistante indique la présence des saponosides.

❖ Coumarines :

Dans un erlen, introduire 6g de la poudre végétale, 16ml d'éthanol et 2ml de l'eau distillée. Agiter pendant 2min puis filtrer. Prendre 2ml de filtrat, lui ajouter 0,5ml de NaOH 10%, chauffer jusqu'à l'ébullition, après le refroidissement ajouter 4ml d'eau distillée. Ajouter quelque goutte de HCl concentré, la présence de la couleur jaune indique la présence des coumarines.

❖ Cardénolides :

Prendre 1g du produit sec, macérer dans 20ml d'eau distillée et filtrer, prélever 10 ml du filtrat. Celui-ci est ensuite extrait avec un mélange de 10ml de CHCl₃ et C₂H₅OH. Evaporer la phase organique, dissoudre le précipité dans 3ml d'acide acétique glacial, ajouter quelques gouttes d'une solution de FeCl₃ suivie de 1 ml d'H₂SO₄. La présence de la couleur verte bleue dans la phase acide implique la présence des cardénolides.

❖ Huiles essentielles :

Prendre environ 10g du produit sec broyé, le mettre dans un appareil à entraînement à la vapeur selon la norme (E.P.1953), chauffer doucement pendant 4 à 5 heures. L'apparition d'une couche huileuse sur le distillat indique la présence des huiles essentielles.

❖ Caractérisation des Stérols :

On ajoute 0,5ml à 1ml d'acide sulfurique concentré à une solution chloroformique à 10%, la phase inférieure acide prend une coloration d'abord jaune ensuite rouge foncé.

❖ Terpènes:

Une quantité de 0,3 à 0,4g de la matière sèche est macérée dans 15ml de méthanol à 70%, puis le filtrat est évaporé à sec. Le résidu obtenu est dissout dans le chloroforme. On ajoute ensuite quelques gouttes d'acide sulfurique concentré au fond du tube sans agiter. La formation d'une coloration jaune qui passe au bout de deux minutes au rouge, révèle la présence des terpènes.

❖ Sucres réducteurs :

On ajoute 1ml de liqueur Fehling à 5ml d'extrait puis on chauffe les tubes contenant les mélanges au bain marie à 40°C. Un test positif est indiqué par l'apparition d'une couleur rouge brique.

❖ Amidon :

La valeur de 2g de poudre végétale est ajoutée à quelques gouttes d'iode I₂, la formation d'une coloration bleue violette indique la présence d'amidon

IV.4. Contrôle d'une drogue végétale**IV.4.1. Dosage de l'eau**

Les drogues végétales sont séchées à des fins de conservation, une dessiccation insuffisante peut en effet entraîner le développement de moisissures ou de levures. Cet essai sert à déterminer et à limiter la quantité d'eau contenue dans la drogue sèche dans les conditions indiquées. Le dosage de l'eau dans les drogues végétales permet de vérifier la bonne conservation ainsi que le bon conditionnement de ceux ci. Il faut, en outre tenir compte de la teneur en eau dans les dosages de principes actifs. D'après les normes décrites dans la pharmacopée européenne (2000), Cette teneur ne dépasse pas les 10 %.

❖ Gravimétrie (Perte à la dessiccation) : Dessiccation à l'étuve**a) Principe :**

Chauffées pendant un temps suffisant à 100-105°C, les drogues convenablement divisées subissent une perte de masse qui correspond sensiblement à la quantité d'eau qu'elles contenaient.

b) Technique :

Nous avons opéré sur un échantillon homogène, broyé ou concassé. Nous avons, ensuite introduit 2g de la poudre dans un verre de montre préalablement taré. Le verre et son contenu est placé dans l'étuve à 100°C pendant 24h.

Après refroidissement dans un dessiccateur renfermant un desséchant (gel de silice), le verre de montre est pesé.

c) Calcul de la teneur en eau

$$X = \frac{m - m'}{m} * 100\%$$

m: masse de l'échantillon avant le séchage ;

m' : masse de l'échantillon après le séchage = masse après séchage (creuset + échantillon) – masse du creuset vide.

IV.4.2. Dosage de cendres**IV.4.2.1. Teneur en cendres totales :****a) Principe :**

Il s'agit d'évaluer la quantité de substances résiduelles non volatilisées lorsque la drogue est complètement calcinée. D'après les normes décrites dans la pharmacopée européenne (2007), le teneur en cendres totales est au maximum 14,0 %.

b) Technique :

Dans un creuset en porcelaine, préalablement taré, on introduit 5g de notre poudre végétale. On calcine au four à 600°C pendant 6h (toute la matière organique brûle et on ne récupère que la partie inorganique de l'échantillon), on laisse refroidir dans un dessiccateur et on pèse.

c) Calcul :

M : masse finale (creuset + cendres totales) ;

M' : masse du creuset vide ;

E : prises d'essais de la matière.

$$T = \frac{M - M'}{E} * 100\%$$

IV.4.2.2. Teneur en cendres sulfuriques**a) Principe**

Les cendres sont des substances résiduelles non volatilisées recueillies lorsque l'échantillon de drogue est calciné avec de l'acide sulfurique. Ces dernières déterminent la quantité de substances inorganiques (impuretés inorganiques) contenues dans la drogue.

D'après les normes décrites dans la pharmacopée européenne (2005), Cette valeur est au maximum 0,1 % déterminé sur 1,0g.

b) Technique :

Dans un creuset en porcelaine taré(T), on introduit une prise d'essai de 2 g de la poudre et on pèse l'ensemble (M). La poudre est ensuite humectée avec H₂SO₄ à 50% et laissée dans l'étuve pendant 24 heures à 100°C (jusqu'à évaporation à sec), le creuset est mis dans un four à 600°C pendant 6 heures (calcination maintenue jusqu'à la disparition des particules noires) et la poudre est enfin pesé après refroidissement dans un dessiccateur (M').

c) Calcul :

La masse des cendres sulfuriques (M CS) est donnée par la formule : $M_{CS} = M' - T$

La masse de la prise d'essai : $M_{PE} = M - T$

Le pourcentage des cendres sulfuriques (% Cs) est donné par :

$$\% \text{ CS} = \frac{M_{CS}}{M_{PE}} * 100\%$$

IV.5.Méthodes d'extraction**IV.5.1.Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation :****❖ Hydrodistillation :**

C'est une technique largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. L'avantage de cette technique réside en la diminution de la température de distillation. Les composés volatils sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition.

L'opération consiste à introduire 50g de masse végétale séchée dans un ballon de 1litre, on y ajoute une quantité d'eau distillée correspondant à 2/3 du volume du ballon. L'opération d'extraction est réalisée pendant 6 heures à partir du début d'ébullition. Le distillat obtenu est soumis à une extraction liquide-liquide, trois fois par le chloroforme (CHCl₃) et la phase organique est séchée par le sulfate de magnésium anhydre (MgSO₄). Après une simple filtration, on procède à l'évaporation pour l'élimination totale du solvant. Enfin l'huile obtenue est conservée dans un flacon fumé et bien scellé à une température de 5°C.

IV.5.2.Extraction des polyphénols par macération:

La macération est une méthode traditionnelle et couramment employée. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation. Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. En plus, elle se déroule à température ambiante, ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules polyphénoliques [3,4].

❖ Technique :

Pour extraire les polyphénols de la plante étudiée, on a macéré 200 g de poudre végétale, après séchage et broyage dans un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau 70/30 : V/V) trois fois, avec agitation de temps en temps à la température ambiante et à l'obscurité, en renouvelant le solvant toutes les 24 heures. Les extraits hydroalcooliques sont réunis et évaporés sous pression réduite à une température inférieure à 50°C jusqu'à l'obtention d'une solution visqueuse. Le résidu brut obtenu de couleur vert foncée est repris avec 150 ml d'eau distillée bouillante pendant une nuit, ensuite le mélange est filtré par simple filtration. Après, on procède à l'affrontement par les solvants organiques de polarité croissante [5]. Le premier est effectué par un solvant apolaire (éther de pétrole) pour éliminer les pigments et dégraisser la matière végétale [6], la phase résiduelle est épuisée successivement par le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Les extractions sont répétées trois fois [7]. Les quatre phases organiques ainsi obtenues sont séchées par du sulfate de magnésium anhydre MgSO₄, puis filtrées, évaporées sous pression réduite à température inférieure à 50°C et ensuite pesées pour déterminer les rendements [8]. Le protocole de l'extraction est résumé dans l'organigramme de l'Annexe IV.

IV.5.3.Calcul du rendement

Le rendement d'une extraction se calcule par le rapport entre la masse de l'extrait obtenu et la masse de la matière première végétale traitée. Ce rendement est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R\% = ([MEX] / [MMV]) \times 100$$

MMV : masse de la matière végétale séchée et laminé en (g)

MEX : masse de l'extrait obtenu après évaporation en (g)

IV.6. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est un outil précieux pour l'analyse en phytochimie. Elle est assez peu onéreuse et son utilisation est très simple. C'est une méthode facile et très rapide, elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ^[9]. Cette technique d'analyse qui permet un contrôle aisé et rapide, est réalisée avec divers solvants et différents adsorbants. De ce fait nous avons opté pour cette technique dans le but de connaître la composition de l'extrait brut, de faire une comparaison entre deux ou plusieurs extraits bruts et de trouver par conséquent, le système de solvant donnant une bonne séparation ^[10].

IV.6.1. Technique :

Une plaque de CCM se compose d'un support (en aluminium, en verre ou en plastique), sur lequel est fixé une fine couche d'un milieu de désorption (silice, cellulose, alumine, polyamides...) comme phase stationnaire. On la place en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre. Cette dernière repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0,5 centimètre dans la phase mobile, constituée d'un ou de plusieurs solvants et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. L'échantillon à étudier, déposé à l'état liquide par une micropipette et éventuellement séché, il sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque. Le comportement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions existant entre soluté, phase mobile et phase stationnaire ^[11,12]. L'identification des substances séparées se fait selon différentes méthodes :

- ☞ directement si les substances sont colorées ;
- ☞ à l'aide d'un révélateur si elles sont incolores afin de les transformer en tâches colorées.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son R_f (Rate factor ou rapport frontal) qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant)

$$R_f = \frac{d}{D} = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

IV.6.2. CCM de l'huile essentielle :

L'application de la CCM comme moyen d'analyse permet l'identification de certains constituants et surtout la mise en évidence des composés majoritaires des huiles essentielles. Pour l'analyse de l'huile essentielle de cette plante, nous avons utilisé comme éluant le système de solvant suivant : **Hexane / Dichlorométhane (5/5 : V/V)**.

La détection de nos produits est réalisée en premier lieu avec la lampe U.V, mais parce que de nombreux composés n'absorbent pas la lumière U.V, on est contraint de rendre visible certaines taches en pulvérisant notre plaque avec une solution d'acide sulfurique/Acide Acétique/Eau distille (5/5/10 : V/V/2V), il apparait des taches de différentes R_f .

IV.6.3. CCM des polyphénols :

- **L'extrait d'éther de pétrole :**

Les systèmes d'élution utilisés sont illustrés dans le **tableau IV.1**. suivant:

Tableau IV.1: Les systèmes utilisés pour l'extrait d'éther de pétrole

Système	volume (ml)
Ether de pétrole - d'acétate d'éthyle.	9.5/0.5
Ether de pétrole - d'acétate d'éthyle.	9/1
Ether de pétrole - d'acétate d'éthyle.	7/3

- **L'extrait de dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du n-butanol :**

Préparation de la phase mobile : l'éluant est constitué par un mélange de deux solvants organiques. Pour cela, différents systèmes de solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations (**Tableau IV.2**).

Tableau IV.2: les systèmes utilisés pour les extraits DCM, AcOET et ButOH.

Système	volume (ml)
Chloroforme – méthanol	9/1
Chloroforme - méthanol	8.5/1.5
Chloroforme – méthanol	7/3

IV.7. Analyse par chromatographie liquide à haute performance

La technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique est la chromatographie liquide à haute performance (pression), abrégée HPLC (CLHP en français). Elle est très utilisée dans de nombreux secteurs d'activités tels : l'agroalimentaire, l'industrie chimique et pharmaceutique, les cosmétiques, etc.

IV.7.1.Principe :

La méthode de séparation qu'elle utilise fait appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire, mais avec un appareillage plus sophistiqué. C'est une méthode physico-chimique basée sur les différences d'interactions entre les molécules à séparer et les phases mobile et stationnaire. Préalablement, les solutés sont mis en solution dans la phase mobile (solvant). Après son injection, ce mélange passe sous haute pression à travers la colonne (tube en acier inoxydable) qui renferme la phase stationnaire [13].

IV.7.2.Mode opératoire :

L'analyse est réalisée par un chromatographe (SHIMADZU SPD-10A), au niveau du laboratoire de Valorisation et de Technologie des Ressources Sahariennes (VTRS), Université Hamma Lakhdar d'EL Oued.

Ce chromatographe HPLC-RP-C18, est équipé des éléments suivants :

- une colonne (d'une longueur de 125mm et d'un diamètre interne de 4,6mm) contenant la phase stationnaire apolaire (phase inverse), cette dernière est constituée de silice modifiée chimiquement par greffage de résidus (C-18), les colonnes en phase inverse permettent la séparation des composés polaires et solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques ;
- un système de pompage, Pompe: VARIAN 9010, pour déplacer la phase mobile à haute pression (plusieurs dizaines de bars) ;
- un injecteur : VARIAN 9100, pour introduire l'échantillon, dans le système à haute pression ;
- un détecteur monochrome: VARIAN 9065 ;
- un logiciel informatique permettant de visualiser les signaux enregistrés par le détecteur ;
- Temps d'analyse : 15min ;

La phase mobile est de composition constante (mode isocratique), elle est composée d'un mélange méthanol - eau (60 : 40 V/V) [14].

Différentes substances de nos extraits sont identifiées par comparaison des chromatogrammes des standards avec ceux des échantillons.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- ✧ Débit: 1 ml/min ;
- ✧ Volume d'injection: 20 μ l ;
- ✧ La température est réglée à 25°C.
- ✧ Longueur d'onde: 300nm ;
- ✧ Concentration de l'échantillon: 10mg/ml ;
- ✧ Temps d'analyse : 50min ;

La phase mobile est un mélange de deux phases dont la composition est précisée dans le **tableau IV.3** :

- A = Eau acidifié (acide acétique 0,2%)
- B = Acétonitrile

Tableau IV.3 : Gradient d'élution CLHP pour l'analyse des polyphénols.

Temps (min)	A (%)	B (%)
<u>0.01</u>	<u>10</u>	<u>90</u>
<u>0.02</u>	<u>10</u>	<u>90</u>
<u>6.00</u>	<u>14</u>	<u>86</u>
<u>16.00</u>	<u>17</u>	<u>83</u>
<u>23.00</u>	<u>19</u>	<u>81</u>
<u>28.00</u>	<u>23</u>	<u>77</u>
<u>30.00</u>	<u>10</u>	<u>90</u>
<u>50.00</u>	<u>10</u>	<u>90</u>

IV.8. Analyse quantitative des composés phénoliques

Des déterminations quantitatives des principaux groupes de métabolites secondaires ont été effectuées sur les extraits de *Teucrium polium* L. ssp *thymoides*; Cette plante a été choisie pour l'évaluation de l'activité biologique sur la base de sa richesse en composés phénoliques. La recherche bibliographique réalisée sur les plantes **Lamiacée**, en général et les *Teucrium polium* en particulier, ainsi que l'analyse des chromatogrammes des extraits AcOEt et *n*-BuOH, ont confirmée cette richesse. Par conséquent, la teneur en composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins) de nos extraits choisis est déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis de marque DR2800 HACH LANGE.

Tous les dosages des composés phénoliques et également le test DPPH, ont été réalisés au sein du laboratoire de phytochimie du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides (CRSTRA), Biskra (Algérie).

IV.8.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

➤ Principe :

Le dosage des polyphénols se fait avec le réactif de Folin-Ciocalteu, qui en milieu alcalin se réduit en oxyde de tungstène et de molybdène donnant une couleur bleue en présence de polyphénols [15]. Le réactif FCR est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), de coloration jaune. Lors de l'oxydation, il est réduit en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé et l'intensité de cette coloration est mesurée dans le visible à une longueur d'onde de l'ordre 760 nm.

➤ Protocole :

On réalise une gamme d'étalonnage en milieu aqueux (6 points de concentrations à partir de A1 jusqu'à A6, voir annexe) avec un polyphénol témoin, en général de l'acide gallique (2g de l'AG dissout dans 2ml d'eau distillée pour obtenir la solution S1).

On peut représenter la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure IV.2**) en prenant la concentration (mg/ml) en fonction de l'absorbance, le coefficient de corrélation $R^2 = 0,9864$.

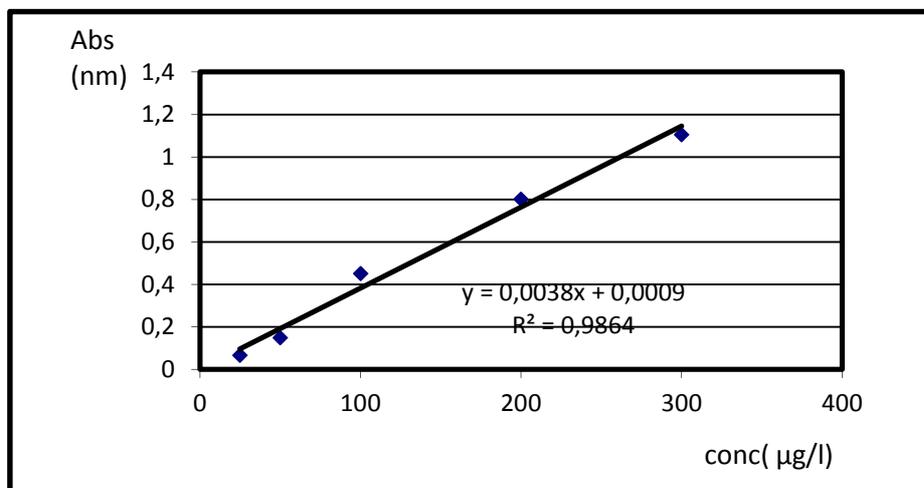


Figure IV.2: Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm de trois essais SD).

Brièvement 125µl d'extrait de l'échantillon ont été ajoutés à 125µl de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 3 minutes à une température ambiante. Après l'incubation, 1250µl de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (75g/l) a été ajoutée. Le mélange a été ensuite ajusté avec 1ml d'eau distillée puis incubé pendant 90 min dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à la longueur d'onde $\lambda = 760 \text{ nm}$ [16,17].

A partir de la courbe d'étalonnage précédente, la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée et le résultat est exprimé en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

Une courbe d'étalonnage effectuée à l'aide de l'acide gallique à différentes concentrations est réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons.

IV.8.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

➤ Principe :

Le dosage des flavonoïdes est réalisé à l'aide de la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm selon la méthode décrite par (Dewanto et al., 2002) [17] et (Kim et al., 2003) [18] avec quelques modifications.

➤ Protocole :

Une quantité de 250µl d'extrait dilué est ajouté à 75µl d'une solution de NaNO₂ à 5%. Après 6min d'incubation à température ambiante, 150 µl d'une solution fraîchement préparée de chlorure d'aluminium (AlCl₃, 10%) est additionnée au mélange précédent. Après 5 mn de repos, toujours à température ambiante, 500µl de soude (NaOH, 1M) est ajouté. Le mélange homogène résultant est ajusté à 2500µl avec de l'eau distillée. L'absorbance de cette préparation est mesurée à 510 nm.

La concentration des flavonoïdes, dans les extraits, est calculée à partir de la gamme d'étalonnage de la catéchine (**Figure IV.3**) et exprimée en mg d'équivalents de la catéchine par gramme d'extrait (mg EC g⁻¹ extrait).

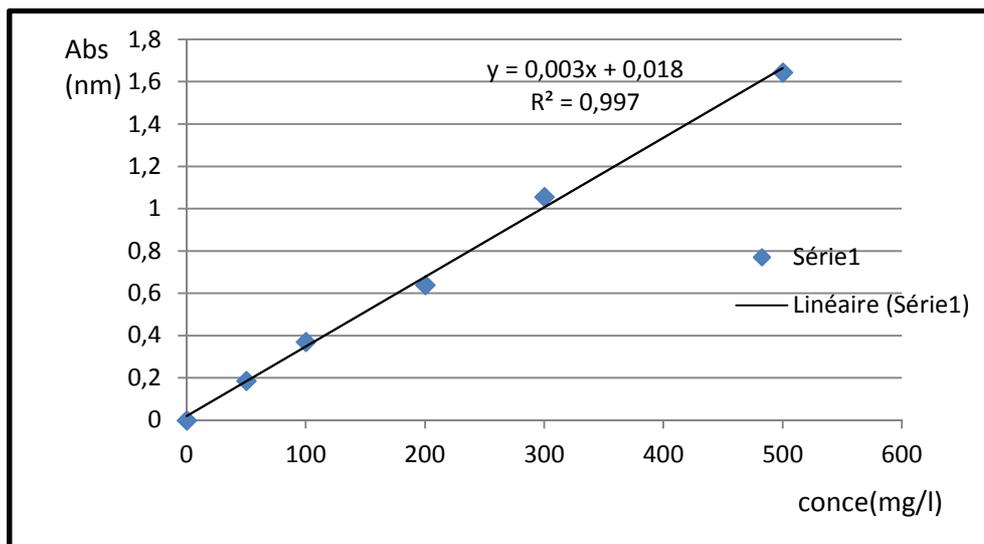


Figure V.3: Droite d'étalonnage de la catéchine (moyenne \pm de trois essais SD).

IV.8.3. Dosage des tanins condensés (TC)

➤ Principe :

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en utilisant la procédure rapportée par Sun et al. [19]. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés, en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm.

En milieu acide, les tanins condensés se dépolymérisent et par réaction avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurables par spectrophotométrie à 500nm [19].

➤ Protocole :

Une aliquote de 0,05ml d'extrait est ajoutée à 1,5 ml de vanilline à 4% et 750ml d'acide chlorhydrique (HCl). Le milieu réactionnel est mélangé grâce à un vortex, laissé à incuber pendant 20 minutes puis analysé en spectrophotométrie à 500 nm contre un blanc contenant de l'acétone 80 %.

Les teneurs en tanins condensés sont déterminées, en se référant à une gamme étalon de catéchine (0 à 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Comme pour les flavonoïdes, les teneurs en tanins condensés sont exprimées en mg d'équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EC g^{-1} extrait).

Remarque :

Les valeurs des concentrations de polyphénols seront lues à partir des droites d'étalonnage, établies de la solution de référence d'acide gallique et la gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique à des concentrations variable de 50, 100, 200, 300, 400 µl/l.

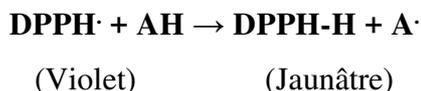
IV.9. Evaluation in vitro de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer, *in vitro*, l'activité antioxydante des huiles essentielles, des composés phénoliques, des aliments et des systèmes biologiques. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans un milieu réactionnel. La méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) est la plus simple à réaliser *in vitro* [20]. Le DPPH est largement employé pour évaluer le balayage de divers produits naturels et il est considéré comme un composé modèle pour les radicaux libres de ces produits.

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits naturels de la partie aérienne de la plante *Teucrium polium L. ssp thymoides* en vue de leur valorisation en tant qu'antioxydants.

IV.9.1. Estimation du pouvoir antiradicalaire (DPPH•)**➤ Principe :**

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine (DPPH•) est un radical organique libre, stable et de couleur rouge pourpre. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance [21]. Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la forme libre en solution dépend de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance antiradicalaire [22]. On peut résumer cette réaction par l'équation suivante :



Où (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH. (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H [23].

Le (DPPH•) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante, en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la

simplicité de l'analyse (**Figure IV.4**). Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm ^[24].

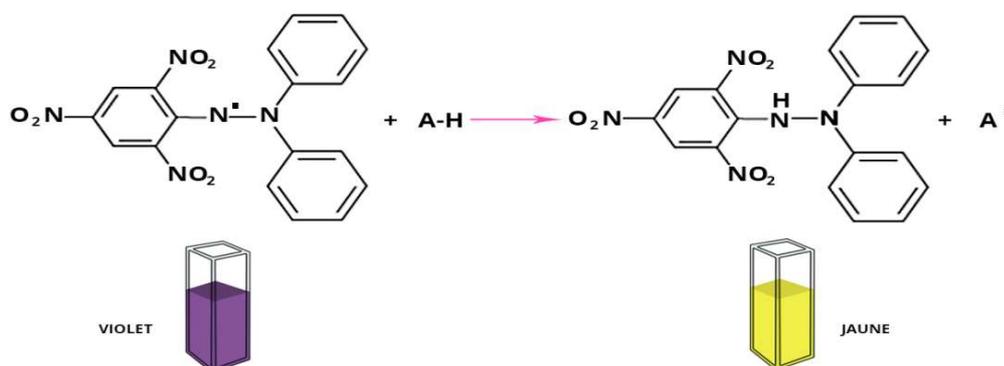


Figure IV.4 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant.

➤ Mesure de l'activité

Pour la mesure de cette activité antiradicalaire, une prise d'essai de 1 ml de chaque extrait (0.1mg/ml) et 250 µl de la solution méthanolique, est soumise au DPPH (0.2 mM). Après agitation au vortex, les tubes sont placés à l'obscurité et à température ambiante, pendant 30 minutes pour réagir ^[25]. L'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin négatif (sans extrait). Le témoin positif utilisé est un antioxydant de synthèse: le 2,6-di-*t*-butyl-4-méthylphénol ou butylhydroxytoluène (BHT) pour les extrait phénoliques et l'acide ascorbique pour les HE. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule suivante ^[26]:

$$PI = (DO \text{ témoin} - DO \text{ extrait} / DO \text{ témoin}) \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition.

DO témoin : absorbance du témoin négatif.

DO extrait : absorbance de la solution d'extrait acétonique.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits, permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI_{50}), une faible valeur de la CI_{50} correspondant à une grande efficacité de l'extrait.

Le calcul des IC₅₀ a été réalisé graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. La valeur de la CI₅₀ est exprimée en µg/ml (3 répétitions pour chaque concentration).

IV.10. Analyse statistique

Toutes les analyses ont été effectuées à trois reprises. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. Les données sont analysées statistiquement en utilisant le logiciel statistique Minitab.2000. Le test indépendant « *t* » a été utilisé pour la comparaison des moyennes entre les groupes. L'analyse de la variance à un facteur contrôlé (ANOVA) et le test de la différence significative de *Tukey* ont été utilisés pour comparer les moyennes des groupes. Le niveau de signification est fixé à $p < 0.05$.

IV.11. Étude de l'activité antibactérienne

C'est une méthode de mesure in-vitro, du pouvoir antibactérien des composés. La technique utilisée est celle du contact direct qui compte deux méthodes, la méthode des puits et la méthode de diffusion. Nous avons adopté la dernière, qui est une vieille méthode, mais toujours d'actualité puisqu'elle est encore utilisée fréquemment dans les laboratoires de bactériologie pour la mesure du pouvoir antibactérien des antibiotiques de synthèse [27]. Cette étude a été effectuée au laboratoire de bactériologie du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides (CRSTRA), Biskra (Algérie), sur les souches bactériennes pathogènes suivantes (**Tableau IV.4**):

Tableau IV.4: Souches bactériennes sélectionnées.

Souche	Groupe	Code ATCC
Salmonella	Gram -	13311
Staphylococcus aureus	Gram +	25923
Candida	levure	-
Enterococcus faecalis	Gram +	10541
Pseudomonas aeruginosa	Gram -	27893
Klebseila oxytoca	Gram -	13182
Escherichia coli	Gram -	25922
Vibrio cholerae	Gram -	14035

IV.11.1. Technique de diffusion sur milieu gélosé (Antibiogramme)

Le principe de cette méthode, consiste à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour d'une source d'antibiotique déposée à la surface de la gélose. La sensibilité des souches aux extraits de la plante a été réalisée par la technique, *in vitro*, de diffusion en milieu gélosé, ou méthode des disques [28]. Cette technique consiste à introduire le germe que l'on veut étudier à la surface du milieu gélosé (Muller Hinton), contenu dans des boîtes de pétri sur une épaisseur de 4 mm puis, on applique des disques imprégnés de substance chimique que l'on veut tester. On aperçoit les substances diffuses dans la gélose avec une forme circulaire. Après 18-24 heures, les disques apparaissent entourés d'une zone d'inhibition [29].

a) Repiquage des espèces bactériennes

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

b) Préparation de l'inoculum

Pour préparer l'inoculum, on racle 4 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir d'une culture de 18h, sur le milieu d'isolement puis déchargées dans de l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée à l'aide d'un vortex et sa turbidité est ajustée à 0,5 Mc Farland, soit une densité optique égale à 0,08 à 0,10 ; lue à une longueur d'onde de 625 nm correspondant à 10^8 UFC/ml [21].

c) Préparation des disques

Dans cette étude, on a utilisé le papier Wattman N°3, coupé en disques de 6 mm. Ces disques doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Ces derniers, une fois préparés, sont placés dans une boîte de pétri (en verre) contenant 10 ml d'eau distillée et auto-clavés pendant 20 mn à 120 °C [30].

d) Ensemencement

Des boîtes de pétri stériles, préalablement coulées, sontensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier

filtre, contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable. L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37° C [30].

Les extraits préparés sont dilués dans le DMSO. Ce choix a été fait, parce que ce dernier est le solvant préconisé par la majorité des auteurs qui ont prouvé qu'il n'a aucun pouvoir antibactérien puissant.

e) Lecture :

Après la culture, la lecture s'effectue en mesurant sur chaque disque le diamètre d'inhibition du principe actif. Cette distance millimétrique est ensuite reportée sur l'échelle de concordance afin que la souche soit interprétée sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis du principe actif étudié [31].

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis de l'huile essentielle étudiée est classée selon le diamètre d'inhibition et selon les critères suivants [32-33]:

- Non sensible (-) pour $\varnothing < 8$ mm;
- Sensible (+) pour 9-14 mm;
- Très sensible (++) pour \varnothing 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour $\varnothing > 20$ mm.

Les bactéries montrant une sensibilité aux extraits, sont sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Plus la zone d'inhibition mesurée est grande, plus le germe est sensible.

IV.11.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible ou la plus petite concentration de la substance qui peut inhiber le développement des bactéries pendant 18 à 24 h à 37 °C. On peut la déterminer, soit en milieu liquide soit en milieu solide [34,35], celle-ci est réalisée uniquement pour les extraits les plus actifs constatés lors des tests de sensibilité [36]. Elle est déterminée par la méthode de micro-dilution en milieu gélosé. Pour cela, on réalise une série de

dilutions à partir de la solution mère (**Tableau IV. 5**), cette solution a été préparée en solubilisant 20 mg de l'extrait dans le méthanol. Une même quantité de bactéries de densité 10^5 µg/ml répartie dans une série de tubes, contenant des concentrations croissantes de la substance, de volume de 2ml pour chaque tube. Après 18 heures

d'incubation, on observe une croissance bactérienne (se traduisant par une turbidité du milieu visible à l'œil nu), dans les tubes contenant une faible concentration de l'extrait [37].

Tableau IV.5 : Les différentes dilutions de la solution mère.

Concentration initiale ($\mu\text{g/ml}$)	Volume (ml)	Volume d'eau Distillée (ml)	Concentration finale ($\mu\text{g/ml}$)
2000	6.4	3.6	128
1280	2	2	64
	1	3	32
	0.5	3.5	16
	0.5	7.5	8
80	2	2	4
	1	3	2
	0.5	3.5	1
	0.5	7.5	0.5
5	2	2	0.25
	1	3	0.125

IV.11.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de substance qui laisse plus de 0,01% de germes survivants. C'est la plus petite concentration d'une substance qui peut tuer les bactéries après 18h de culture à 37°C. On peut la déterminer, soit en milieu liquide soit en milieu solide [38,39].

Pour déterminer la CMB nous avons procédé à des sous culture, à partir des tubes qui ne contiennent aucune croissance bactérienne visible. Donc c'est la concentration minimale d'une sous culture dont il n'y a pas de poussée bactérienne.

- ❖ Le rapport CMB/CMI nous a permis de déterminer les pouvoirs bactéricide et bactériostatique de l'huile essentielle étudiée. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'huile essentielle (l'extrait) a un pouvoir bactériostatique, il est bactéricide quand il est inférieur ou égal à 4 [40].

Références du chapitre IV

1. **Békro YA, Békro JAM, Boua BB, TRA BFH, Ehilé EE., (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpiniaceae). *Rev Sci Nat*; 4:217225.
2. **Béourou S, Tuo K, Ouattara K, Touré AO, Meité S, Ako AAB, et al., (2014).** Phytochemical screening of some medicinal plants used to treat malaria in Côte d'Ivoire (West Africa). *Intern J of Chem and Pharm Sc* ; 2:919-925.
3. **Spigno G. Faveri D.M., (2007).** Antioxidants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*. 78 : 793-801.
4. **Budic-Letoc I, Lovric T., Pezo I. et Klujuzuric J.G., (2005).** Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the babic grape variety. *Food Technology and Biotechnology*. 43(1) : 47-53.
5. **Torck, M.;Pinkas, M. (1992).** Les flavonoïdes du genre *Vicia*. *Biochemical systematics and ecology*, 20 (5), pp:453-457.
6. **Stocker, P.; Yousfi, M.; Djerridane, O.; Perrier, J.; Amziani, R.; El Boustani, S.; Moulin, A., (2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*. 86 (12), pp:919-925.
7. **Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traore A., Coulibaly K., Maiza A., (2004).** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali, *C.R.Chimie*, 7; pp:1073-1080.
8. **Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Vidal, N.; Lesgards, J.; Stocker, P., (2007).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 224 (6), pp:801-809.
9. **Levine S.G., (1990).** Identification of Unknowns by Melting Point and Thin-Layer Chromatography in Combination - *J. Chem. Ed.*, 67, p. 972.
10. **Benabdallah Hassiba, (2016).** Cours Techniques d'extraction, de purification et de conservation. Université Ferhat Abbas de Sétif, p 37.
11. **Hennebelle, T., (2006).** Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. Thèse de doctorat, Chimie Organique et Macromoléculaire, Lille1, pp 304.

12. **Debete Judith M., (2005).** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de doctorat de l'université de Bamako.
13. **NOLLET L.M.L. et TOLDRA F., (2013).** Food Analysis by HPLC, Third Edition, CRC Press. Taylor & Francis Group, London. p1063.
14. **Kuntie et al., (2007).** Isocratic RP-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (J PHARMACEUT BIOMED)
15. **Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M, (1999).** Lamuela-Raventos: Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Met. Enzym. 299, pp:152-178.
16. **Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2002).** Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. Journal of Food Composition and Analysis, 15, pp:655–665.
17. **Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H, (2002).** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50, 3010-3014.
18. **Kim D.O., Chun O.K., Kim Y. J., Moon H.Y., Lee C.Y., (2003).** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. J. Agric. Food Chem., Vol. 51(22); pp 6509-6515.
19. **Sun, B., Richardo-da-silvia, J.M., Spranger, I, (1998).** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46; pp:4267-4274.
20. **Hedi Mighri , Hafedh Hajlaoui , Ahmed Akrouf , Hanen Najjaa , Mohamed Neffati, (2010).** Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone.
21. **Gachkar, L.; Yadegari, D.; Rezaei, M. B.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S. A.; Rasooli, I., (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry. 102 (3), pp:898-904.
22. **Asadi S., Ahmadiani A., Esmaeili MA., Sonboli A., Ansari N., Hodaghli F., (2010).** In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study. Food Chem Toxicol. : 48(5):1341-9.

23. Wang S.Y., Wu J.H., Shyur L.F., Kuo Y.H. & Chang S.T., (2002). Antioxydant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. *Holzforschung*. 56(5): 487-492.
24. Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A.& Igc R., (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*. 111; pp:925-929.
25. T. Hatano, H. Kagawa, T. Yasuhara, (1988). OkudaTwo new flavonoids and other constituents in licorice root their relative astringency and radical scavenging effects *Chem. Pharm. Bull.*, 36, pp:2090-2097.
26. Matkowski A., Tasarz P. and Szypuła E., (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (11): 321-330.
27. P. Quezel et S. Santa, (1962). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertique miridionales ". Tome 1 Paris. pp:187 – 188.
28. Guérin-Faubleé, V.;Carret, G., (1999). L'antibiogramme: principes, méthodologie, intérêt et limites. *Journées nationales GTV-INRA*, 5-12.
29. Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K.H.C., (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, 100; pp: 553-559.
30. ADESOKAN A. A., AKANJI M.A., and YAKUBU M.T, (2007). Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark, *African Journal of Biotechnology*, 6 (22), pp: 2502 - 2505.
31. Henry N. Le HoueH rou, (2001). Biogeography of the arid steppeland north of the Sahara. *Journal of Arid Environments*. 48: pp:103–128
32. Ponce AG, Fritz R, Del Valle C, et al. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lwt-Food Sci Technol* 36(7): pp :679-84.
33. Derwich E., Benziane Z. et Boukir A., (2010). GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco; *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 6 (3):pp:191-198.

34. **Jorgensen, J.; Tumidge, J.; Washington, J., A, (1999).** Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D· C, pp:1526-1543.
35. **Orfila, J., Rickettsiales. Le Minor, L., Veron, M, (1989).** Bactériologie médicale. 2^{ème} Éd. Paris : Flammarion Médecine-Sciences 1989, pp:1069-1071.
36. **Skandamis, P. N.; Nychas, G. J., (2001).** Effect of oregano essential oil on microbiological and physico- chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 91 (6), pp:1011-1022.
37. **Yakhlef G, Laroui S, Hambaba L, et al., (2011).** Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*. 9: pp :209-18.
38. **Soussy, C., (2000).** Antibiotiques, généralités. Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. *Précis de bactériologie clinique*. Eska, Paris.
39. **Weber, M. (2003).** Les pièges de l'antibiogramme. *Revue Française des Laboratoires*. (352), pp :21-26.
40. **Canillac N. et Mourey A., (2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol*: 18: pp. 261-268.

Chapitre V

- RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

V.1.Criblage phytochimique

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante et d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Ces métabolites lui confèrent la protection contre les bactéries, les champignons et les attaques pesticides et sont donc responsables de l'effort d'activité antimicrobienne contre certains micro-organismes [1].

La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et du changement de couleur.

Les résultats obtenus au terme des tests préliminaires pour le criblage phytochimique, réalisés sur la partie aérienne de *Teucrium polium* L. sous espèce des *thymoïdes* sont résumés dans le **tableau V.1**. Ils révèlent la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires.

Réaction positive : (+) abondant ; Réaction négative : (-) absent

Tableau V.1.: Résultats des tests phytochimiques de la partie aérienne de *Teucrium polium* L. *Thymoïdes*.

Teste de	Résultats
Polyphénols	+
Flavonoïdes	+
Flavonoïdes libres	+
Glucoside de flavones	+
Coumarines	-
Alcaloïdes	+
Huiles essentielles	+
Tanins	+
Stérols non saturés et terpènes	+
Cardenolide	+
Saponosides	+
Amidon	-
Sucres réducteurs	-

A la fin de cette étude qualitative des différentes substances bioactives, nous remarquons l'absence totale des coumarines, de l'amidon et des composés réducteurs. Par contre nous apercevons l'existence des autres substances naturelles bioactives. D'après ces résultats, nous déduisons que la plante *Teucrium polium* L. sous espèce *Thymoides* de la région de Beni souik, Biskra, comme d'autres espèces de la famille **Lamiaceae**, est riche en divers métabolites secondaires, ce qui explique l'intérêt et l'attention particulière portée par les chercheurs, à travers les études scientifiques sur cette plante [2].

V.2. Contrôle d'une drogue végétale

V.2.1. Dosage de l'eau par Gravimétrie (Perte à la dessiccation) :

✧ Taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches en renferment de 60 à 80 %. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10% [3]. Nous avons donc utilisé la méthode pondérale pour en déterminer la teneur dans la poudre des feuilles sèches de notre plante. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

✧ Résultats:

Masse de l'échantillon avant le séchage $m = 2$ g

Masse de l'échantillon après le séchage $m' = 1,83$ g



$$X = \frac{2 - 1,83}{2} * 100\% = 8,5\%$$

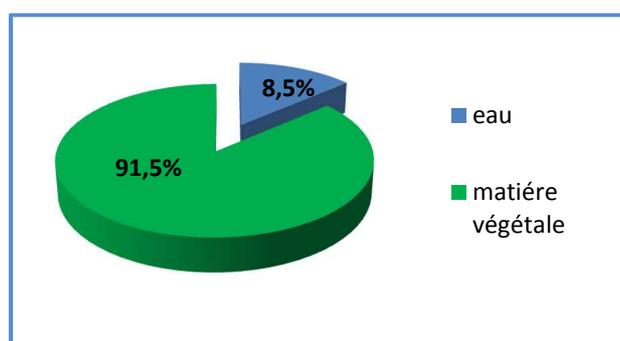


Figure V.1 : Teneur en eau dans le *Teucrium polium* L.

✧ Interprétation des résultats:

Les résultats de cette analyse ont révélé un taux d'humidité inférieure à 10%, dans la plante de *Teucrium polium* L, avec une valeur égale à **8,5%**. La teneur en eau, inférieure à 10% confère à notre poudre une meilleure conservation à long terme.

V.2.2. Dosage des cendres

Le dosage des cendres totales et cendres sulfuriques a été déterminé, après calcination dans l'étuve à 600°C pendant 6h, les résultats obtenus en utilisant les formules citées en annexe sont exposés dans la **figure V.2**.

❖ Résultats

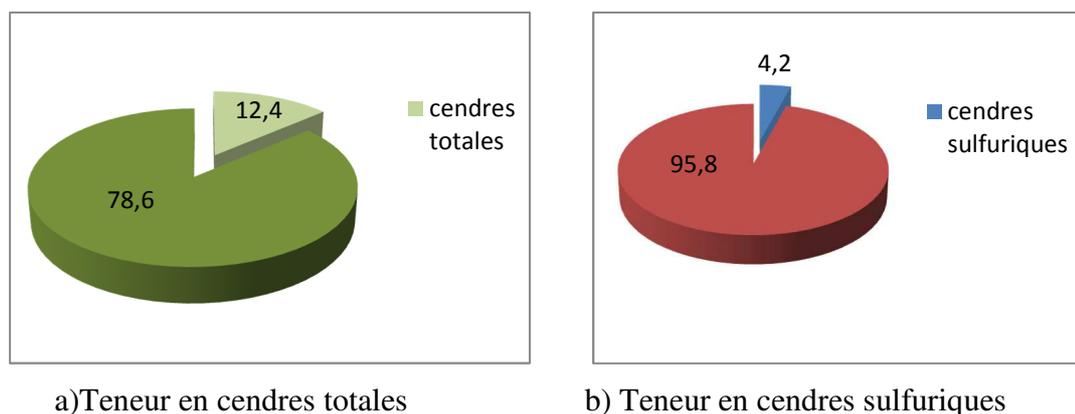


Figure V.2 : Résultat des cendres

❖ Interprétation des résultats :

- ✓ Le pourcentage de la quantité de substance non volatilisée est de **12,40%**, valeur n'ayant pas dépassé les normes décrites dans la pharmacopée européenne.
- ✓ Le pourcentage des cendres sulfuriques est de **4,20%**, valeur légèrement élevée, ce qui peut se justifier par une richesse en éléments minéraux de notre poudre.

V.3. Préparation des extraits

V.3.1. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation, en utilisant le chloroforme (CHCl_3), excellent solvant d'extraction pour de nombreux matériaux organiques tels que les graisses, l'huile ...etc. La densité de la phase organique est supérieure à celle de la phase aqueuse, ce qui donne une bonne séparation dans l'ampoule à décanter. Après évaporation, l'huile obtenue, a une masse de **1,37g**.

V.3.2. Extraction des composés phénoliques

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Dans la présente étude, la méthode utilisée est celle de l'extraction par macération, avec un gradient de polarité croissante, en utilisant des solvants de plus en plus polaires afin d'obtenir des extraits enrichis en molécules d'intérêt [4].

Cette méthode d'extraction menée à température ambiante, permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable, dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction [5]. Cette étape permet de séparer les polyphénols selon leur structure et leur degré de polymérisation; en les affrontant par plusieurs solvants spécifiques allant du moins polaire au plus polaire.

➤ **Affrontement par l'éther de pétrole**

Généralement utilisé pour dégraisser la drogue, surtout les lipides, la chlorophylle et les impuretés qui risquent de compliquer l'épreuve chromatographique. La masse obtenue est **0,44g**.

➤ **Affrontement par le dichlorométhane**

Les plantes sont donc extraites avec du dichlorométhane pour entraîner les terpénoïdes et les polyphénols aglycones (flavonoïdes, coumarines, tanins, et anthracenosides), (**m= 4,4g**).

➤ **Affrontement par l'acétate d'éthyle**

L'affrontement par ce solvant entraîne les aglycones, les mono-O-glycosides et partiellement les di-O-glycosides présents dans les extraits éthanoliques et les tannins dimériques. L'extrait brut obtenu a une masse de **7,47g**.

➤ **Affrontement par le n-butanol**

Le n-butanol va entraîner essentiellement le reste des di-o-glycosides, les tri-glycosides et les C-glycosides. La masse obtenue est **9,5 g**.

V.4. Caractéristiques des extraits obtenus

Les résultats de l'extraction des huiles essentielles et des polyphénols de la plante étudiée, incluent les rendements des extraits obtenus ainsi que leurs caractères organoleptiques.

V.4.1. Rendement de l'extraction :

La détermination des rendements est réalisée à partir du poids des extraits obtenus, après évaporation à sec par rapport au poids initial. Les rendements sont calculés par la moyenne des trois essais \pm l'écart-type pour chaque extraction et les résultats ainsi obtenus sont illustrés sur la **figure V.3**.

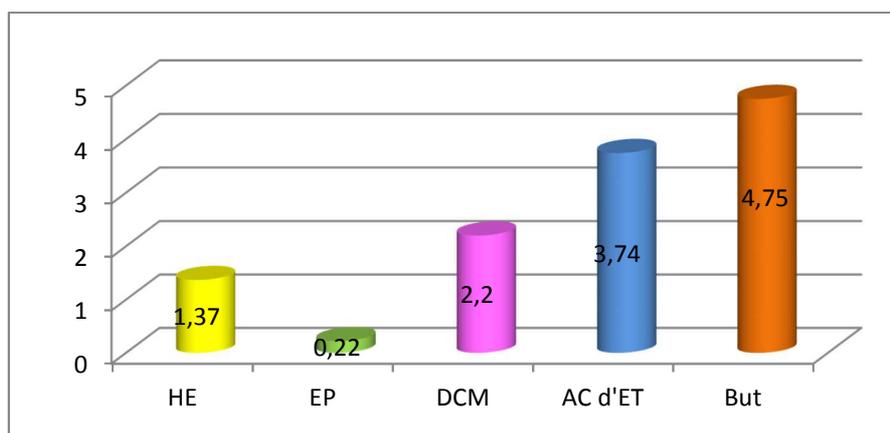


Figure V.3. : Rendements moyens des extraits de *Teucrium Polium L.* exprimés en % massique

- D'après ces résultats, on peut dire que la partie aérienne de *Teucrium polium L. ssp thymoides*, présente un rendement satisfaisant en huile essentielle (**1,37%**), en comparaison avec ceux obtenus pour les autres espèces de *Teucrium* étudiées et qui est de 0,55 % et 0,75 % pour **Kabouche A. et al** ^[6] et **Moghtader M.**^[7] respectivement, 0,37 % pour **Lograda T** ^[8], 0,21% trouvé par **Belmekki N.**^[9] et pour **Roukia H.**^[10], il est de l'ordre de 0,5%.
- Du point de vue rentabilité en poids, les extraits polaires (AcE et BuT), ont donné les proportions les plus élevées en comparaison avec les extraits moins polaires (EP et DCM).
- Ces résultats montrent que cette plante est riche en HE et en polyphénols et que le bon rendement est attribué à l'extrait butanolique qui contient les flavonoïdes glycosylés ^[11,12].

On peut déduire que le rendement, en extrait naturel d'une même espèce peut varier, et ceci en fonction de plusieurs paramètres comme des études l'avaient montré, d'une part, de l'influence de la technique d'extraction et d'autre part, de celle du cycle végétatif, ainsi que

la période de récolte et la localisation géographique. Le temps de séchage de la plante influe également sur le rendement des extraits [13,14,15].

V.4.2. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques d'un extrait sont des données nécessaires pour l'appréciation de la qualité de ce dernier. En effet, il est généralement admis que ces caractéristiques peuvent être corrélées avec la composition chimique [16]. Ces caractères sont résumés dans le **tableau V.2**.

Tableau V.2. : Caractéristiques organoleptiques des extrais bruts de l'espèce *Teucrium polium* L. de la région de Biskra.

Extrait	Aspect	Couleur	Odeur
HE	liquide –limpide	jaune	Forte
Ether de pétrole	visqueux	vert foncé	Agréable
Dichlorméthane	visqueux	vert foncé	Agréable
Acétate d'éthyle	Pâteux	vert jaunâtre	Faible
n- Butanol	Solide	marron foncé	Piquante

V.4.3. Analyse par la chromatographie sur couche mince :

Cette technique nous donne une indication sur le contenu des extraits analysés et procure les informations nécessaires pour la poursuite d'autres études.

Pendant l'analyse CCM, plusieurs systèmes de solvants ont été essayés sur les extraits bruts obtenus, en utilisant des plaques analytiques recouvertes de gel de silice. Chaque extrait, avec un système spécifique, donne une bonne séparation et une visibilité acceptable des spots, comme il est indiqué par les chromatogrammes illustrés dans la **figure V.4**.

La CCM nous a permis de contrôler la qualité de nos différents extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a aidé à obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de nos extraits (fluorescence, coloration, facteur de rétention...) comme il est indiqué dans l'**Annexe VI**.

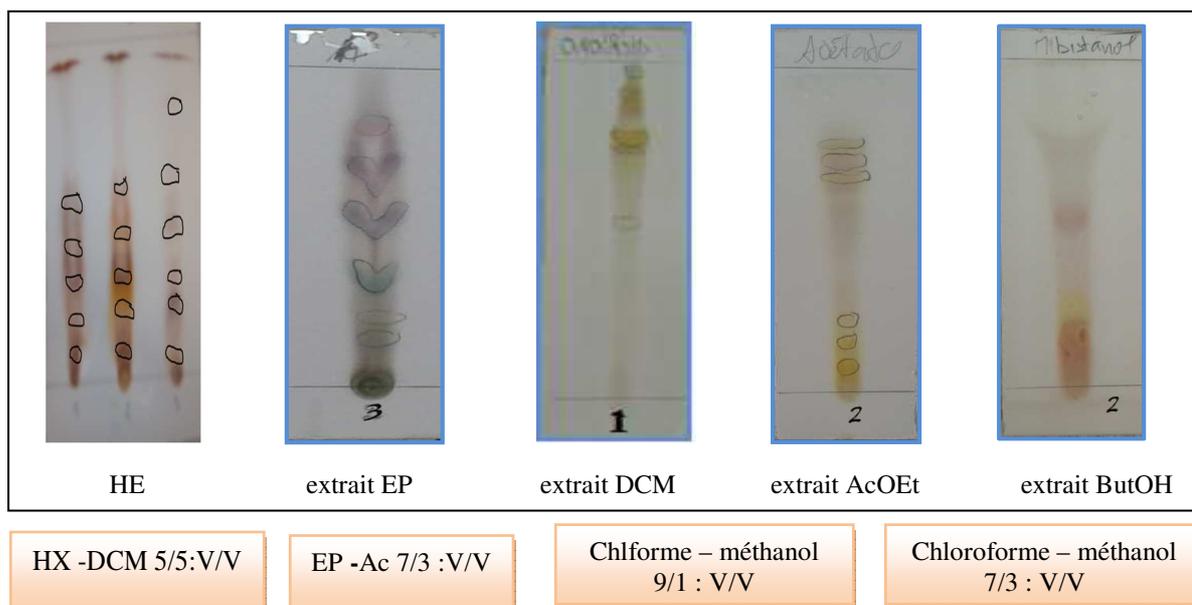


Figure V.4. : Résultats de l'analyse par CCM des extraits de *Teucrium Polium L.*

Ces résultats montrent l'existence de plusieurs taches de différents facteurs de rétention, ce qui nous a permis de révéler un polymorphisme chimique très important dans les extraits préparés de la plante sélectionnée.

- Le chromatogramme de l'huile essentielle montre une richesse en composés terpéniques.
- Les solvants éther de pétrole et dichlorométhane sont généralement utilisés pour dégraisser la drogue végétale. A l'œil nu, les taches apparaissent vertes dans la plaque CCM de ces fractions et sont typiques des chlorophylles, les taches mauves représentent les stérols.
- L'extrait acétate d'éthyle présente une bonne migration. Les taches sont bien distinctes avec un facteur de rétention qui diffère d'une tache à l'autre, tout cela montre que l'extrait analysé manifeste une richesse en composés phénoliques. L'extrait butanolique renferme les composés les plus polaires de type flavonoïdes glycosylés. Partant de leurs fluorescences, les échantillons (AcOET et ButOH) sont riches en flavones, en premier lieu. Celles-ci correspondent aux tâches violettes, brunes et grises. En 2^{ème} lieu, en flavonols et qui présentent la couleur jaune et ses dérivés : jaune pâle, jaune fluorescent, et jaune orangé.

Les profils chromatographiques des deux extraits *n*-ButOH et AcOEt *Teucrium polium L. thymoides*, montrent clairement leurs richesses en polyphénols et en particulier en

flavonoïdes. Ceci à travers les différentes taches visibles sous la lumière UV aux longueurs d'onde 254 nm et 366 nm, ainsi que leur révélation en jaune.

V.4.4. Résultats de caractérisation par HPLC

Le besoin de connaître les profils et d'identifier les composés individuels dans les échantillons exige le remplacement des méthodes traditionnelles par des techniques séparatives. L'HPLC est, sans doute la technique analytique la plus utile pour caractériser les composés polyphénoliques [17].

Les résultats de l'analyse HPLC-RP-C18, des extraits de la partie aérienne de la plante sélectionnée, sont repris dans le **tableau V.4**. Les chromatogrammes de cette analyse HPLC sont présentés dans la **figure V.5**, comme on peut l'observer (suivant le nombre de pics sur les chromatogrammes), afin de comparer leur profil chromatographique avec ceux des standards et d'obtenir une information sur la nature chimique de quelques constituants.

Huit composés phénoliques purs ont été utilisés dans l'analyse HPLC comme témoins et leurs temps de rétentions (Tr) sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau V.3.: Temps de rétention des différents témoins polyphénoliques obtenus après séparation par CLHP.

Standards	Temps de rétention (min)	Equation de la courbe d'étalonnage	Coefficient de corrélation
Acide ascorbique	4,21	$y = 211.7x - 1098$	$R^2 = 0,96144$
Acide gallique	5,23	$y = 23616x - 7232$	$R^2 = 0,99864$
Acide chlorogénique	13,62	$y = 39775x - 1881$	$R^2 = 0,9983$
Acide caféique	16,3	$y = 72328X$	$R^2 = 0,99864$
Quercétine	20,37	$y = 548.0x - 2832$	$R^2 = 0,9960$
Vanilline	21,46	$y = 82773x - 1423$	$R^2 = 0,99525$
Acide B coumarine	23,95	$y=157538x$	$R^2 = 0,9996$
Rutine	29,04	$y = 24112.98x - 1060$	$R^2 = 0,99842$

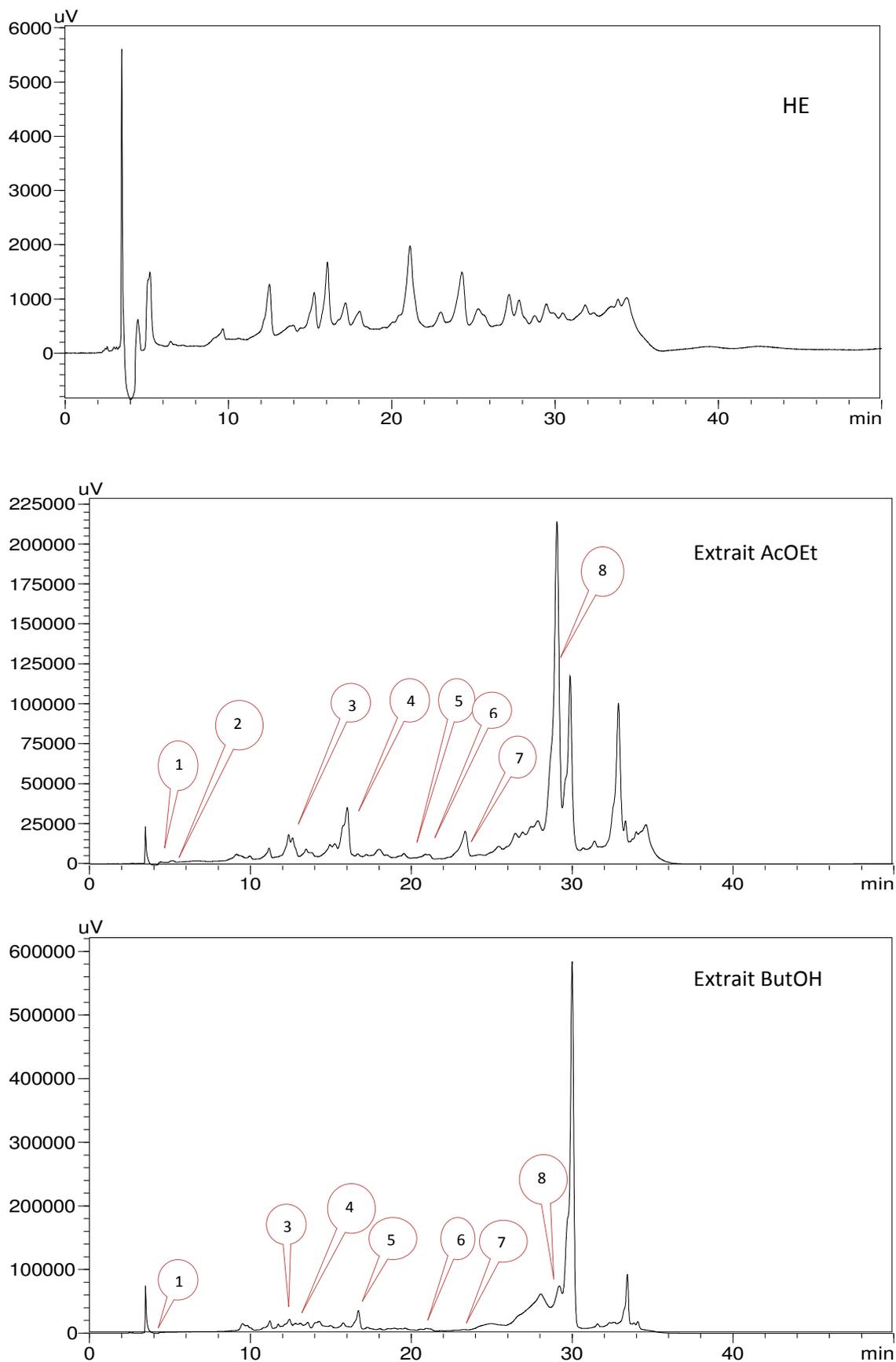


Figure V.5. : Résultats de l'analyse par HPLC des extraits de *Teucrium Polium L.*.

Tableau V.4 : Les phénols identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique

N° de composé	Composés phénoliques	AcOEt	T(nim)	ButOH	T(nim)
01	Acide ascorbique	+	4,43	+	4,44
02	Acide gallique	+	5,18	-	-
03	Acide chlorogénique	+	13,46	+	13,56
04	Acide caféique	+	16,01	+	16,71
05	Quercétine	+	20,19	+	20,11
06	Vanilline	+	21,10	+	21,15
07	Acide B coumarine	+	23,35	+	23,24
08	Rutine	+	29,05	+	29,20

(+) abondant ; (-) absent

- L'analyse de la fraction de l'huile essentielle montre qu'il ya une diversité de produits dans sa composition, révélés par plusieurs pics dont l'un est majoritaire à 3min, cependant tous non identifiables par manque de standards des huiles essentielles.
- L'extrait AcOEt est plus riche en substances chimiques que l'extrait butanolique, ce qui en accord avec les résultats obtenus par CCM.
- L'analyse CLHP nous a permis d'identifier huit composés phénoliques. L'extrait acétate d'éthyle montre trois autres pics majoritaires; le premier, avec un temps de rétention $Tr = 3,46\text{min}$; un deuxième, avec un temps de rétention $Tr = 30,69\text{min}$ et un dernier pic avec un temps de rétention $Tr = 32,287\text{min}$. Dans cette fraction, la teneur la plus élevée est attribuée à la rutine.
- L'extrait butanolique montre aussi trois pics majoritaires; le premier, avec un temps de rétention $Tr = 3,47\text{min}$, un deuxième, avec un temps de rétention $Tr = 30\text{min}$ qui est la plus forte et un dernier pic avec un temps de rétention $Tr = 33,42\text{min}$, alors que les autres composés phénoliques identifiés sont les moins représentatif.

V.5. Quantification des composés phénoliques

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en polyphénols dans l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de **Dewanto et al.**^[18], en utilisant le réactif de Folin-Siocalteu, tandis que les flavonoides ont été quantifiés par le dosage direct par le trichlorure d'aluminium d'après une méthode adaptée de **Dewanto et al.** Pour les Tanins condensés, le dosage s'est fait par le test de vanilline selon la méthode de **Sun et al.** ^[19].

Tous les résultats de dosages sont rassemblés dans les tableaux de l'**Annexe VII**.

V.5.1. Dosage des Polyphénols totaux

La détermination de la quantité des composés phénoliques a été faite à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax+b$), réalisée avec des solutions étalons de l'acide gallique à différentes concentrations.

La teneur en polyphénols totaux de chaque extrait a été calculée, à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait, la mesure de la densité optique a été effectuée à une longueur d'onde de 760nm. Les résultats sont rassemblés dans le tableau A de l'**Annexe VII**.

L'étude statistique montre que la quantité des composés phénoliques extraits à partir de *Teucrium polium L. ssp thymoides* présente des différences significatives selon le solvant utilisé. Les résultats sont représentés dans la **figure V.6**.

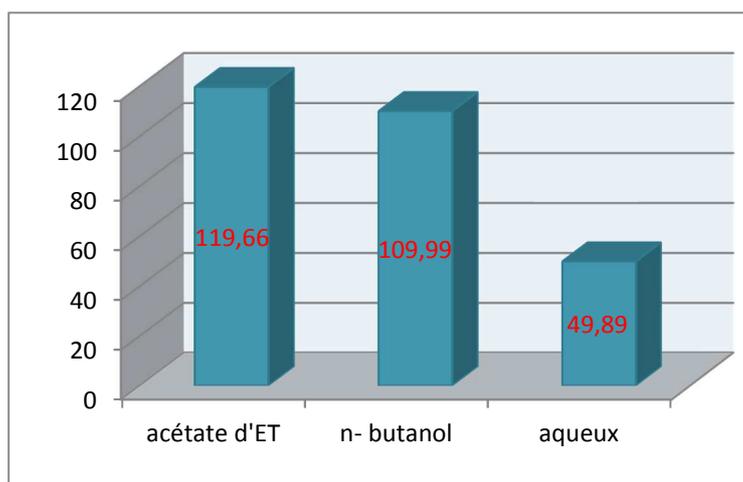


Figure V.6. : Teneurs en PPT des extraits de l'espèce *Teucrium polium L.*.

Concernant les teneurs en composés phénoliques obtenus, nous avons enregistré une variabilité claire en fonction du solvant. On remarque d'après ces résultats que la quantité des composés phénoliques varie entre 119,66, 109,99 et 49,89 mg EAG /g d'extrait.

Le taux des composés phénoliques le plus élevé est détecté dans l'extrait acétate d'éthyle (119,66 mg EAG/g d'extrait), suivi par l'extrait butanolique (109,99 mg EAG/g d'extrait). Tandis que l'extrait aqueux présente la plus faible teneur (49,89 mg EAG/g d'extrait).

D'une manière générale, l'estimation de la teneur en polyphénols totaux, en utilisant le réactif du Folin Ciocalteu, indique que cette plante est riche en ces composés.

V.5.2. Dosage des flavonoïdes :

La détermination du dosage des flavonoïdes a été faite selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax+b$) et est réalisée avec des solutions étalons de la catéchine à différentes concentrations.

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en mg d'équivalents catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g d'extrait). La mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 510 nm, les résultats sont portés sur le tableau B **Annexe VII**. Les valeurs de ce tableau sont reprises en histogramme dans la figure suivante:

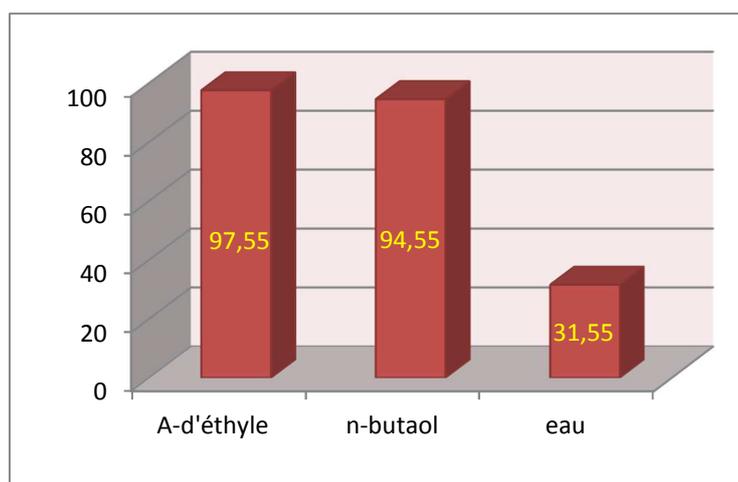


Figure V.7. : Teneurs en flavonoïdes des extraits de l'espèce *Teucrium polium* L..

Comme cité précédemment, les flavonoïdes suivent aussi la même tendance. Nous remarquons, d'après ces résultats, que la quantité de flavonoïdes est comprise entre 31,55 et 97,55 mg EC/ g d'extrait. Il paraît clairement que le taux de flavonoïdes le plus élevé a été détecté dans l'extrait d'acétate d'éthyle (97,55 mg EC/ g d'extrait), par contre la quantité enregistrée pour l'extrait aqueux (31,55 mg EC/g d'extrait) reste la plus faible par rapport à l'extrait acétate d'éthyle et le n-butanol (94,55 mg EC/g d'extrait), ces deux derniers sont 3 fois plus riche que l'extrait aqueux.

V.5.3. Dosage des tanins condensés

Les teneurs en tanins condensés de l'espèce étudiée ont été déterminées, en utilisant le réactif de la vanilline, à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax+b$) réalisée avec des solutions étalons de la catéchine à différentes concentrations.

La teneur en tanins condensés de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en mg d'équivalents catéchine par g d'extrait (mg EC/g Ext). La mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 550 nm et les résultats obtenus sont présentés dans la **figure V.8** et les valeurs sont indiquées dans le tableau C **Annexe VII**.

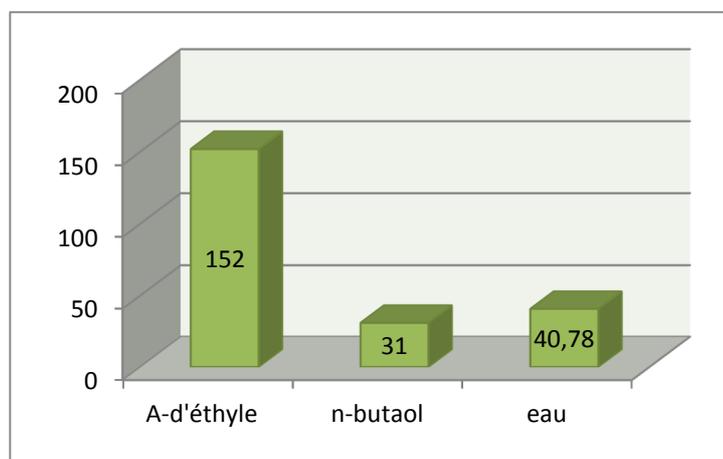


Figure V.8. : Teneurs en tanins condensés des extraits de *Teucrium polium L.*

D'après les résultats présentés par l'histogramme, nous avons enregistré une variabilité significative. Nous notons que la quantité des tanins condensés varie entre 31 et 152 mg EC/g d'extrait, elle est la plus élevée (152 mg EC/g d'extrait) dans l'extrait acétate d'éthyle, cependant elle est faible dans ceux rapportés dans les extraits n-butanol et aqueux avec 31 et 40 (mg EC/g d'extrait) respectivement.

Tous les résultats obtenus montrent que la partie aérienne de notre plante présente une quantité intéressante des composés phénoliques. Toutefois, la plus forte concentration est notée pour la fraction acétate d'éthyle. Ces résultats sont en accord avec ceux mentionnés dans l'analyse par CCM et HPLC, qui montre la richesse de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *Teucrium polium L. Thymoides* en ces composés.

La comparaison des teneurs des extraits de notre plante en polyphénols avec les autres espèces de *Teucrium*, a montré que notre plante présente une teneur élevée. Par exemple, les résultats trouvés par **R. Mahmoudi** ^[20] montrent que l'extrait acétate d'éthyle obtenu par macération, renferme la plus grande quantité de phénols totaux 89.05 ± 0.50 mg EAG/ g MS de la plante *Teucrium polium geyrii*. Ils sont nettement inférieurs à nos résultats, par contre la plante de *Teucrium polium L. Capitatum* de Biskra semble renfermer une grande quantité en polyphénols totaux, soit en moyenne $206,54 \pm 58,17$ mg éq.AG/g MS et $146,13 \pm 18,95$ mg éq. AG/g MS pour la plante de Sétif, ce sont les résultats trouvés par **S.MALKI** ^[21], tandis que **DJERIDANE et al.** ^[22], rapportent que la plante *Teucrium polium* provenant de Tamanrasset est riche en composés phénoliques.

Les dosages par spectrophotométrie UV-visible ont montré que les extraits acétate d'éthyle, butanolique et aqueux de la plante sélectionnée contiennent des composés phénoliques (PPT, FVT et TC) mais avec des quantités différentes. Plusieurs facteurs influencent la teneur en composés phénoliques d'une plante. D'une part, les facteurs externes ou exogènes qu'ils soient de natures biotiques ou abiotiques et d'autre part, les facteurs internes ou endogènes tels que les facteurs génétiques conduisant à des différences importantes entre les espèces du même genre ^[23]. Ils peuvent être d'origine géographique, où dues aux conditions climatiques ou de stockage, à la période de maturité à la récolte, et aussi à la technique d'extraction employée ^[24-25].

Les travaux conduits par **Katalinic et al.** ^[226] et **Koffi et al.** ^[27] confirment nos résultats en indiquant que le milieu hydro-alcoolique permet une meilleure extraction des polyphénols totaux. L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant organique. La solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, du poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique du squelette de base ^[28].

V.6. Activités biologiques des extraits

L'étude des activités biologiques des substances bioactives des plantes médicinales se trouve à la base des médecines dites alternatives, de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou cuits et des substances actives exploitées dans les produits pharmaceutiques. L'étude précédente confirme la richesse de la plante médicinale *Teucrium polium* L. *Thymoides* en métabolites secondaires ce qui nous a incité à explorer biologiquement leurs extraits.

La présente étude, s'intéresse particulièrement à l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits naturels issus de cette plante^[29].

V.6.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans cette étude, la méthode choisie pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits préparés de cette plante, est le piégeage du radical libre DPPH car cette technique est reconnue comme étant simple, rapide et efficace, en raison de la grande stabilité du radical^[30]. L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH à 515 nm qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H, par les antioxydants présents dans l'extrait végétal^[31,32].

L'effet de piégeage des extraits sur le radical DPPH est exprimé en valeurs de IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$). On rappelle que la IC_{50} représente la quantité de réactifs nécessaire à l'inhibition de la moitié de la quantité initiale de radicaux présents. En effet, la IC_{50} est inversement liée à la capacité anti-oxydante d'un composé, plus cette valeur est basse, plus l'activité anti-oxydante est grande.

Cette concentration est calculée graphiquement par les régressions linéaires des tracés: pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des échantillons testées.

Les résultats obtenus du test de mesure de l'absorbance du radical libre DPPH (**Annexe VIII**), nous a permis de tracer l'histogramme de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque extrait de la plante étudiée (**Figure V.9**).

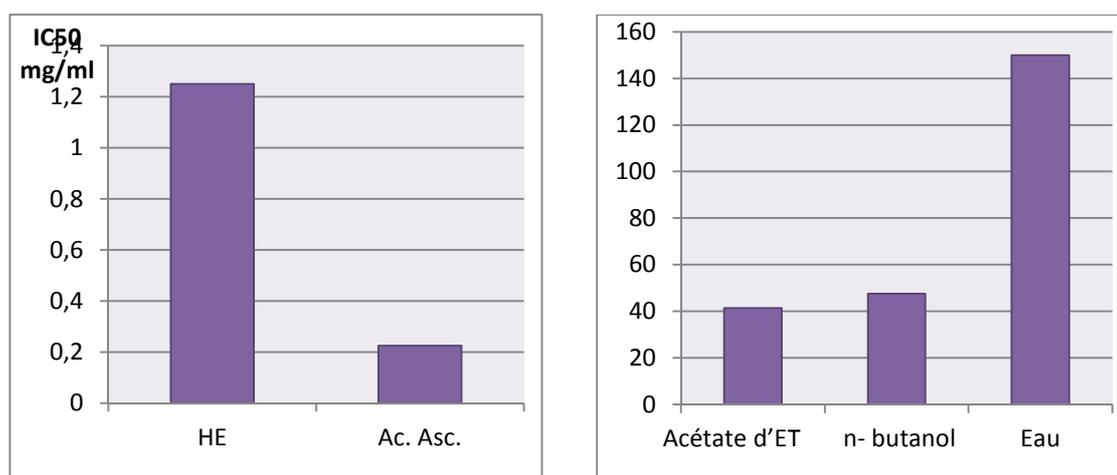


Figure V.9: Valeurs des CI₅₀ du test DPPH (µg/ml) de HE et polyphénols.

- À la lumière de ces résultats, on constate que l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. ssp *thymoïdes* peut ramener le radical libre stable 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenyl-picrylhydrazine jaune-coloré avec un IC₅₀ de 1250 µg/ml montrant une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide ascorbique.

Khaled-Khodja N. et al. [33], ont trouvé une valeur d'IC₅₀ de 95 µg/ml, en étudiant l'effet antioxydant de l'huile essentielle de *Teucrium polium* de (Bejaïa, Algérie), ce qui est supérieur au pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de la plante étudiée. Pour le *Teucrium polium geyrri*, le résultat trouvé par **Hammoudi R.** est 19,46 µg/ml [34], malgré que ce sont les mêmes espèces. D'autre part, à comparer avec d'autres espèces comme *Teucrium marum* (Lamiaceae), **Ricci, D., et al.** [35] trouvent une valeur d'IC₅₀ de 13,13 µg/ml ainsi que **Bencheikh S. E.** [36] qui obtient avec un IC₅₀ de 58,6336 µg/ml montrant une valeur inférieure à celle signalée dans notre étude.

D'une manière générale, l'huile essentielle de l'espèce étudiée possède une activité antioxydante très faible en comparaison avec celle des autres espèces de *Teucrium*.

- Dans le cas des polyphénols, en comparant les IC₅₀ des différents extraits testés de notre plante par rapport à celle de standard butylhydroxytoluène **BHT** (11,5 µg/ml). Nous remarquons, en premier lieu que tous nos extraits ont des activités moins importantes que la substance de référence. En second lieu, l'extrait Acétate d'éthyle est généralement le plus actif par rapport aux autres extraits.

Selon les valeurs indiquées dans le tableau B (**AnnexeVIII**) qui sont reprises en histogramme de la concentration d'inhibition à 50% (CI₅₀). Nous notons une divergence évidente dans les valeurs obtenues entre les différents solvants utilisés dans le processus

d'extraction des polyphénols. Les profils d'activité anti-oxydante révèlent que l'extrait acétate d'éthyle a manifesté un pouvoir antioxydant important (41, 47 $\mu\text{g/ml}$), suivi par l'extrait n-butanol d'une valeur égale à (47,56 $\mu\text{g/ml}$). Tandis que l'extrait aquatique est le moins actif avec une valeur égale à (149,92 $\mu\text{g/ml}$). Ce résultat peut être expliqué par la richesse de l'extrait AcOEt en composés phénoliques comme les flavonoïdes qui sont des antioxydants puissants.

Nos résultats se révèlent plus importants que ceux trouvés par **Malki S. et Hamoudi R.** [21,34], qui ont enregistré des valeurs de CI_{50} plus élevées pour les deux sous espèces *Teucrium polium L. Capitatum* et *Teucrium polium geyri* respectivement.

Il est important de noter que les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes sont corrélées avec l'activité anti-oxydante.

En effet, dans ce sens et d'une manière générale, le pouvoir antioxydant est fortement tributaire de la concentration en composés phénoliques (**Hanson et al., 2004**) [38]. Ces données sont corroborées par les travaux de (**Trabelsi et al. 2010**) [39], qui ont montré une corrélation significative et positive entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante. Néanmoins dans le cas de nos résultats relatifs à l'activité antiradicalaire DPPH, cette relation n'est pas toujours évidente, puisqu'elle peut être non significative voire même négative dans certains cas. En effet, (**Djeridane et al. 2006**) [40] estiment que l'existence d'une synergie entre les différents composés phénoliques peut être déterminante dans la capacité antioxydante d'une plante donnée. Ainsi cette activité ne dépend pas seulement de la teneur en polyphénols mais aussi de la structure et de l'interaction entre les différents composés [41,42].

V.6.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits obtenus est déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Elle nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien vis-à-vis de huit bactéries de références. Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC). La gentamicine et le DMSO ont servi de témoins positif et négatif, respectivement.

V.6.2.1. Résultats de l'antibiogramme

La détermination de la zone d'inhibition permet une estimation du caractère de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne vis-à-vis des extraits testés. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés par un pied à coulisse en mm (**Annexe X**). Les résultats obtenus après 24h d'incubation à l'étuve à 37 °C, sont rassemblés dans le **tableau V.5**. D'après **Ponce et al. (2003)** ^[43], la sensibilité d'un extrait a été classée par le diamètre des halos d'inhibition : non sensible (-) pour les diamètres de moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres de plus de 20 mm.

L'extrait est considéré comme bactéricide si aucune colonie n'est observée dans la zone d'inhibition. Par contre, il est dit bactériostatique quand quelques colonies sont présentes, même en densité faible.

Tableau V.5.: Zones d'inhibition en mm des extraits de *Teucrium polium* L. sur les souches bactériennes testés.

Les bactéries / Les extraits	HE	EP	DCM	Ac-Et	ButOH	T +
Entero	D 16	00	00	00	00	22
	S ++	-	-	-	-	+++
Pseudomonas	D 10	00	00	00	00	25
	S +	-	-	-	-	++++
E. Colie	D 11	00	00	00	00	21
	S +	-	-	-	-	+++
Salmonelle	D 12	07	00	11	10	23
	S +	+	-	+	+	+++
Vibrio	D 14	00	00	00	00	22
	S +	-	-	-	-	+++
Staph NCTC	D 16	08	08	16	14	30
	S ++	-	-	++	+	+++++
Candida	D 14	00	00	00	00	22
	S +	-	-	-	-	+++
K.O.	D 16	00	00	00	00	23
	S ++	-	-	-	-	+++

D : diamètre de la zone d'inhibition ; S : Sensibilité ; - : Résistante ; + : Sensible ; ++ : Très sensible.

V.6.2.2. Résultats de la CMI et la CMB

Les valeurs obtenus des CMI et CMB de l'huile essentielle et des extraits acétate d'éthyle et celle de n- butanol de la plante étudiée, sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont illustrés dans le **tableau V.6**.

On appelle **CMI**, la plus faible concentration d'une substance, qui peut inhiber le développement des bactéries pendant 18 à 24 h à 37 °C et la **CMB**, la concentration d'antibiotique qui laisse moins de 5% de survivants après 18 heures. Les antibiotiques classés comme bactéricides sont ceux pour lesquels il y a peu d'écart entre la CMI et la CMB ^[44],

Tableau V.6. : Résultats des CMI et CMB des extraits actifs de *Teucrium polium* L.

Extrait	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	HE	Ac-Et	But
CMI (µg/ml)	1	0.125	0.125
CMB (µg/ml)	2	0.25	0.25

V.6.2.3. Interprétation des résultats

Les résultats portés sur le tableau V.6, montrent que les réponses sont très variables, ils permettent de mentionner :

- Il apparaît un effet antibactérien de la plante *Teucrium polium* L.ssp *Thymoïdes* sur différentes souches bactériennes Gram positif ou négatif. Lequel effet est due à la présence des huiles essentielles et des flavonoïdes qui sont des métabolites secondaires, réputés pour leur activité antibactérienne.
- Le diamètre de la zone d'inhibition variant de 7 à 16 mm, diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antibactérienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.
- Les résultats de ce travail ont démontré que l'huile essentielle de *Teucrium Polium* L. présente un potentiel antimicrobien contre une gamme de microorganismes (bactéries testés).

- Pour les composés phénoliques, nous constatons que *Salmonelle* et *Staphylococcus aureus* sont les bactéries les plus sensibles. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les bactéries à G+ possèdent des dispositifs structuraux qui sont plus susceptibles aux extraits naturels [45].
- Il est clair que l'extrait acétate d'éthyle présente le meilleur résultat sur un diamètre élevé de la zone d'inhibition (16 mm) avec une CMI de 0,125 µg/ml et une CMB de 0,25 µg/ml. Son effet inhibiteur couvre aussi bien les bactéries Gram positif que celles Gram négatif.
- L'extrait butanolique est doué d'une activité non négligeable sur *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de la zone d'inhibition (14 mm), une CMI de 0,125 µg/ml, et une de CMB de 0,25 µg/ml.
- Une faible réactivité est présentée par les deux extraits éther de pétrole et dichlorométhane, ceci peut s'expliquer par leur richesse en composés les moins actifs.
- Vis-à-vis des bactéries à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebseila oxytoca*, *E.coli* et *Vibrio cholerae* ainsi qu'envers la levure *candida*, elles se sont avérées les plus résistantes.
- La présence d'une zone d'inhibition bien appréciable autour des extraits testés permet de constater une activité relativement importante vis-à-vis des Cocci Gram + *Staphylococcus aureus* et *salmonelle* et Bacille Gram -.
- On peut dire que cette espèce de *Teucrium* est significativement sensible aux extraits avec des CMI extrêmement faibles montrant un effet *bactériostatique*.
- Les CMB obtenues pour les extraits étudiés, sont plus proches des CMI, ce qui explique que les deux extraits testés ont un pouvoir *bactéricide*.

Selon la bibliographie disponible, il n'existe pas de travaux déjà réalisés sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et des polyphénols de *Teucrium Polium L.* sous espèce *Thymoïdes*. Pour cela, les résultats de cette étude sont comparés à ceux obtenus pour d'autres espèces de *Teucrium*. Les résultats obtenus par **R. Hammoudi et M.H. Mahammed** [46] montrent une activité sur *E.coli* et une résistance envers *Pseudomonas* par contre ceux de **S. Benchikh** [35], ne présentant pas d'activité sur *E.coli* et *Leisteria* mais sont actives sur *Pseudomonas* et d'autres bactéries. Les résultats portés par **Özkan G** [47] révèlent une activité antibactérienne des extraits de *Teucrium montbretii*. Selon **Derwich et al.** [48], l'activité antimicrobienne des produits naturels est expliquée par la

présence de groupes d'hydroxyles phénoliques capables de former des liaisons hydrogènes avec les emplacements actifs des enzymes de la cellule ciblée.

Le mode d'action des extraits dépend du type de microorganismes, du type d'extrait et de sa concentration. En général, les bactéries Gram(-) sont plus résistantes que les bactéries Gram(+) et ce grâce à la structure de leur membrane externe ^[49]. Plusieurs travaux ont confirmé la grande résistance des bactéries G- par rapport aux G+. Ce constat peut être dû à l'action de certains composés, d'une part et à la présence d'une couche de lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries G- qui pourrait fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule entrante, d'autre part ^[50]. L'activité des principes actifs et des extraits végétaux peut dépendre de leur composition chimique. Elle peut être liée à la polarité des substances bioactives, aux conditions de séchage, de broyage de la plante ^[51] et dépend également de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs ^[52].

Par conséquent, il est suggéré que les extraits phénoliques et les huiles essentielles soient utilisés comme source potentielle d'agents antibactériens naturels contre les bactéries multi-résistantes ^[53].

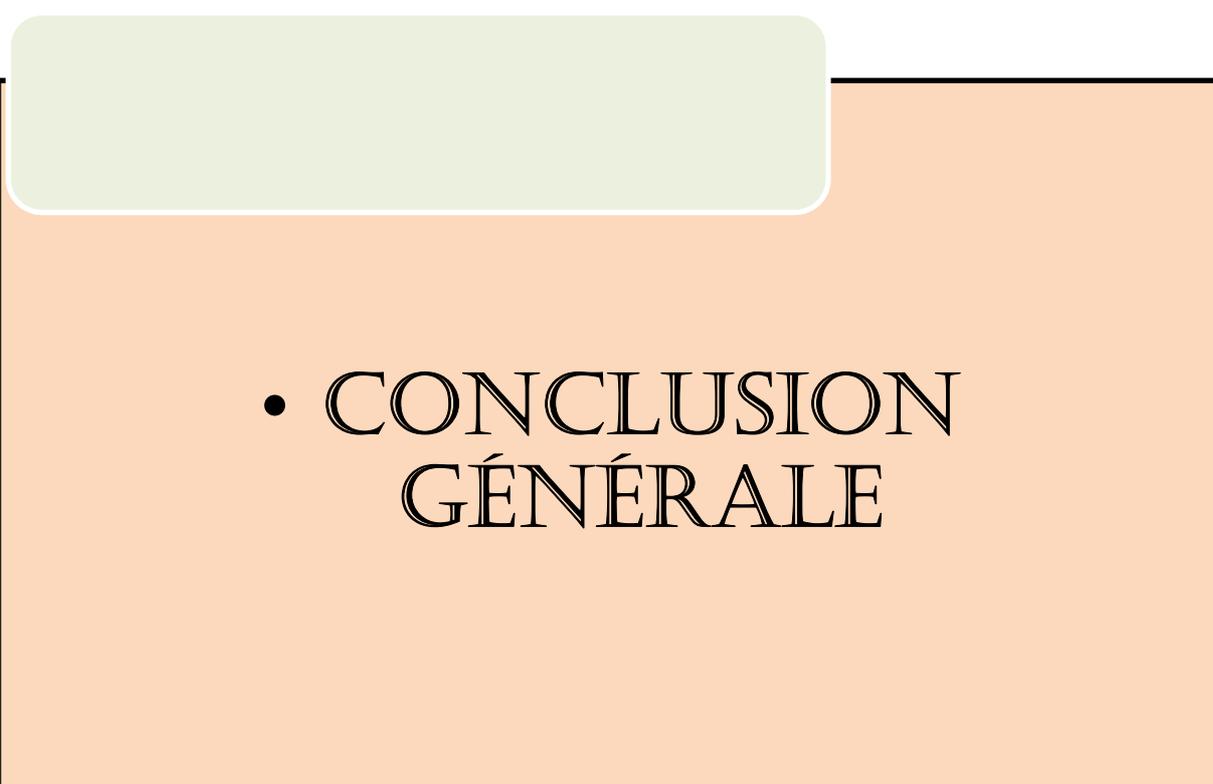
Références du chapitre V

1. **Marjorie M.C., (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology Reviews*, 12, 564-582.
2. **Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi Motamed S & Ghorbani A. (2005).** Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology, *Iran, J. Pharm. Res.* 2, 63-79.
3. **Paris R. et Moyse M. (1965).** Précis de matière médicale. Edit. Masson. Paris. 412 p.
4. **Venturini N., (2012).** Contribution chimique a la définition de la qualité : exemples des spiritueux de Myrte (*Myrtus communis L.*) et de Cedrat (*Citrus medica L.*) de corse», Thèse de Doctrat en Chimie, Université De Corse-Pascal Paoli.
5. **Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traore A., Coulibaly K., Maiza A., (2004).** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana Lam* (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali, *C.R.Chimie*, 7:1073-1080.
6. **Kabouche, A., et al., (2007).** Analysis of the essential oil of *Teucrium polium ssp. aurasiacum* from Algeria. *Journal of essential oil Research.* 191, 44-46.
7. **Moghtader, M., (2009).** Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium L.* from Iran. *Am-Eurasian J Agric Environ Sci.*, 56, 843-846.
8. **Lograda T. et al., (2014).** Chemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Teucrium polium L.* Essential Oil from Eastern Algeria. *American Journal of Advanced Drug Delivery.*697-710
9. **Belmekki Nacéra, Nassima Bendimerad, Chahrazed Bekhechi, Xavier Fernandez. (2013).** Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium L.* essential oil from Western Algeria, *Journal of Medicinal Plants Research*; 7(14): 897–902. 10.
10. **Mahmoudi R, Nosratpour S., (2013).** *Teucrium polium L.* essential oil: phytochemical component and antioxidant properties, *International Food Research Journal*; 20(4): 1697–1701
11. **Naghibi, F.; Mosaddegh, M.; Mohammadi Motamed, M.; Ghorbani, A., (2010).** Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 63-79.
12. **Havsteen, B. H., (2002).**The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology&therapeutics*,96 (2), 67-202.
13. **Abdallah h. M., Ezzat, S.M., (2011).** Effect of the method of preparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Pituranthos tortuosus*, *Z Naturforsch C.*, 66(3-4):143-148.
14. **Boukhatem M.N., Hamaidi M. S., Saidi F., Hakim Y. (2010).** Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du *Géranium Rosat* (*Pelargonium graveolens L.*) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie), *Revue Nature et Technologie* , n° 03: 37 -45.
15. **Michel T. (2011).** Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse doctorat Université Orléans

16. **Michel T, (2011)**, Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). Thèse Doctorat Université Orléans. p261.
17. **Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., (2006)**. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.
18. **Dewanto,V., WuX.,Adom,K.K.,Liu,R.H, (2002)**. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agriculture and food chemistry*,50,3010-3014.
19. **Sun,B., Richardo-da-silvia, J.M., Spranger, I, (1998)**. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of agriculture and food chemistry*,46:4267-4274.
20. **Hammoudi R., Hadj Mahammed M., Ramdane F. et Khodir A. A., (2012)**. Activite Antibacterienne Des Extraits Phenoliques De La Plante *Teucrium polium geyrii*. *Algerian journal of arid environment vol. 2, n°1*,:49-55
21. **Malki Samira, THESE DOCTORAT EN SCIENCES, (2017)**. Etude Morphologique, Biochimique, Physiologique et Biologique de quelques populations de *Teucrium polium L. Capitatum* dans l'Est algérien,116-118.
22. **A.Djeridane, M. yousfi, B. Nadjemi, N. vidal, JF. Iesgard and P. stocker, (2007)**. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 224(6), 801-809.
23. **Ksouri, R., Megdiche, W., Koyro, H.W., Abdelly C., (2010)**. Responses of Halophytes to Environmental Stresses with Special emphasis to Salinity. *Adv. Bot. Res.* 53: 117-145.
24. **Jane Roche, (2005)**. Composition de la graine de tournesol(*Helianthus annuus L.*) sous l'effet conjugué des contraintes agri environnementales et des potentiels variétaux ; Sciences des Agroressources ; Le Titre De Docteur De L'institut National Polytechnique De Toulouse.
25. **Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Esin Çelik S., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Özyurt D., (2007)**. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496-1547
26. **Katalinic V., Mozina S., Skroza D., Generalic I., Abramovic H., Milos M., Ljubenkovic I., Piskernik S., Pezo I., Terpin P. and Boban M., (2010)**. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *J. Food. Chem.*, 119: 715-723.
27. **Koffi E., Sea T., Dodehe Y. and Soro S., (2010)**. Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *J. Animal & Plant Sci.*, 5: 550-558.
28. **Mohammed Z. and Atik F., (2011)**. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla (L.) karst.* *Inter. J. Pharma. Bio. Sci.* 2 : 609-615.

29. **Chikhoun A.et al., (2015).** In-vitro effects of Thymus munbyanus essential oil and thymol on human sperm motility and function, Reproductive biomedicine online 31 (3), 411-420
30. **Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A.& Igc R.,(2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*. 111: 925-929.
31. **Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J.C. and Camara, J.S., (2007).** Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose´ and white wines. *Food Chemistry* 105: 204–214.
32. **Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R., (2007).** Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry* 100: 1409–1418.
33. **Khaled-Khodja, N., L. (2014).** Boulekbache-Makhlouf, and K. Madani, Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, 61, 41-48.
34. **Hammoudi Roukia, (2015).** THESE de Doctorat ès sciences en biologie, Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien.
35. **Ricci, D., et al., (2005).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of ethnopharmacology.*, 981, 195-200.
36. **Salah Eddine Bencheikh Segni Ladjel, Mohamed Bilal Goudjil, Mouna Mehani and Souad Zighmi, (2015).** Chemical analysis, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium polium* ssp *aurasianum* Labiatae. *Der Pharma Chemica*, 7(12):308-314
37. **Subhasree, B., Baskar, R., Keerthana, L., Lijina, R., Susan, R., Rajasekaran, P. (2009).** Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. *Food chem.* 15: 1213-1220.
38. **Hanson, P.M., Yang, R.Y., Wu, J., Chen, J.T., Ledesma, D., Tsou, S.C.S., Lee, T.C. (2004).** Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 129: 704-711.
39. **Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Bourgou, S., Hajlaoui, H., Abdelly, C. (2010).** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT*. 43: 632-639.
40. **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *J. Food Chem.* 97: 654-660.
41. **Verdan A.M., Wang H.C., García C.R., Henry W.P. and Brumaghim J.L., (2011).** Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105: 1314-1322.
42. **Sakthidevi G., Mohan V. R., Jeeva S., (2014).** In vitro antioxidant studies of tuber of *Jatropha maheshwarii* Subram. & Nayar. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 29(1): 6 - 10

43. **Ponce, A., et al.,(2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*. 367, 679-684.
44. **Havsteen B. H., (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology et Therapeutics*, vol. 96: 67–202
45. **Sosa M. E. et Tonn C. E., (2006).** Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. *Phytochem Rev*, DOI 10.1007/s11101-006-9056-7.
44. **Nauciel C., Vilde J-L., (2005).** *Bactériologie médicale*. 2ème dition. Masson, Paris., p.78. 97
45. **M. A. B Gamal, Rajab A Atraiki (2015).** Phytochemical constituents of *Ferula communis* plant extracts and their antimicrobial and antioxidant activity. *Lebda Medical Journal*, vol. 1, p. 6-9
46. **Hammoudi, R. and M.H. Mahammed,(2014).** Contribution à l'Etude de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de la Plante *Teucrium polium* ssp. *geyrii* (Lamiaceae).
47. **Özkan G., Kuleaoan H., Çelik S., Gokturk R.S., Ünal O., (2007).** Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities. *Food Control*, 18: 509–512.
48. **Derwich, E., et al., (2010).** GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal*., 810, 1267-1276.
49. **Pool EK (2001).** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria *Curr Opin Microbiol* 4: 500-08
50. **Sarker S., Latif Z., Gray A., (2005).** Natural products isolation. Humana Press, Totowa, pp. 1-23
51. **Moussaid M, Elamrani AA, Berhal C, et al., (2012).** Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: *Marrubium vulgare* (L.) and *Origanum majorana* (L.). *Int J Nat Prod Res* 1(1): 11-13
52. **Thangara JHS, Adjei O, Allen BW, et al (2000).** In-vitro activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *J Antimicrob Agents Chemoter* 45(2): 231-33
53. **Farhad Sharafati Chaleshtori, (2018).** Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of *Bunium persicum*, *Eucalyptus globulus*, and Rose Water on Multidrug-Resistant *Listeria* Species,25 *Journal of evidence-Based integrative Medicine*.

- 
- CONCLUSION
GÉNÉRALE

Conclusion Générale

La majorité des médicaments actuels sont des copies concentrées de remèdes végétaux. Notre pays est doté d'une biodiversité végétale immense qui reste à découvrir. Une grande partie de cette flore est constituée par des espèces médicinales et c'est dans le cadre de la recherche de molécules à activités biologiques nouvelles, d'origine végétale, que notre travail s'inscrit. L'objet de cette étude est, en l'occurrence, l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits organiques de la partie aérienne de la plante médicinale *Teucrium polium* L. sous espèce *thymoïdes*, de la wilaya de Biskra.

La sélection de la plante est basé sur quelques données ethno-pharmacologiques. Le screening phytochimique réalisé, a mis en évidence la présence de divers métabolites secondaires tels que: huiles essentielles, polyphénols, flavonoïdes, tanins, stérols, terpènes, saponosides et alcaloïdes dans cette plante. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la qualification, par analyse chromatographie CCM et HPLC qui a révélé la présence de l'acide ascorbique, gallique, chlorogénique, caféique, quercétine, vanilline, béta coumarine et la rutine et d'autres composés majoritaires non identifiés.

L'analyse semi-quantitative des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés des extraits phénoliques a été réalisée par dosage colorimétrique. Celle-ci nous a permis de confirmer que cette plante est riche en composés phénoliques. La teneur en polyphénols totaux estimée, par la méthode de Folin Ciocalteu est comprise entre 119,66 et 49,89 mg EAG/g d'extrait. Le dosage des flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 a révélé, que l'extrait acétate d'éthyle détient la quantité la plus élevée (**97,55** mg EC/ g d'extrait), suivi par l'extrait butanolique (**94,55** mg EC/g d'extrait). La teneur la plus élevée en tanins condensés par la vanilline est attribuée à l'extrait acétate d'éthyle (**152** mg EC/g d'extrait). Les résultats de cette quantification prouvent la richesse de l'extrait d'acétate par les composés phénoliques.

La détermination de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de cette plante est effectuée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, elle a donnée des résultats acceptables, avec une valeur de **1.250** mg/ml donc l'huile essentielle de notre plante présente une capacité de réduction du DPPH non négligeable, mais celle-ci reste moyenne par rapport au pouvoir antioxydant des huiles essentielles des autres espèces de la famille des Lamiacées. Par contre celle des polyphénols, réalisée toujours par la même méthode (piégeage de radical libre DPPH) sur les extraits phénoliques, a montré que la fraction

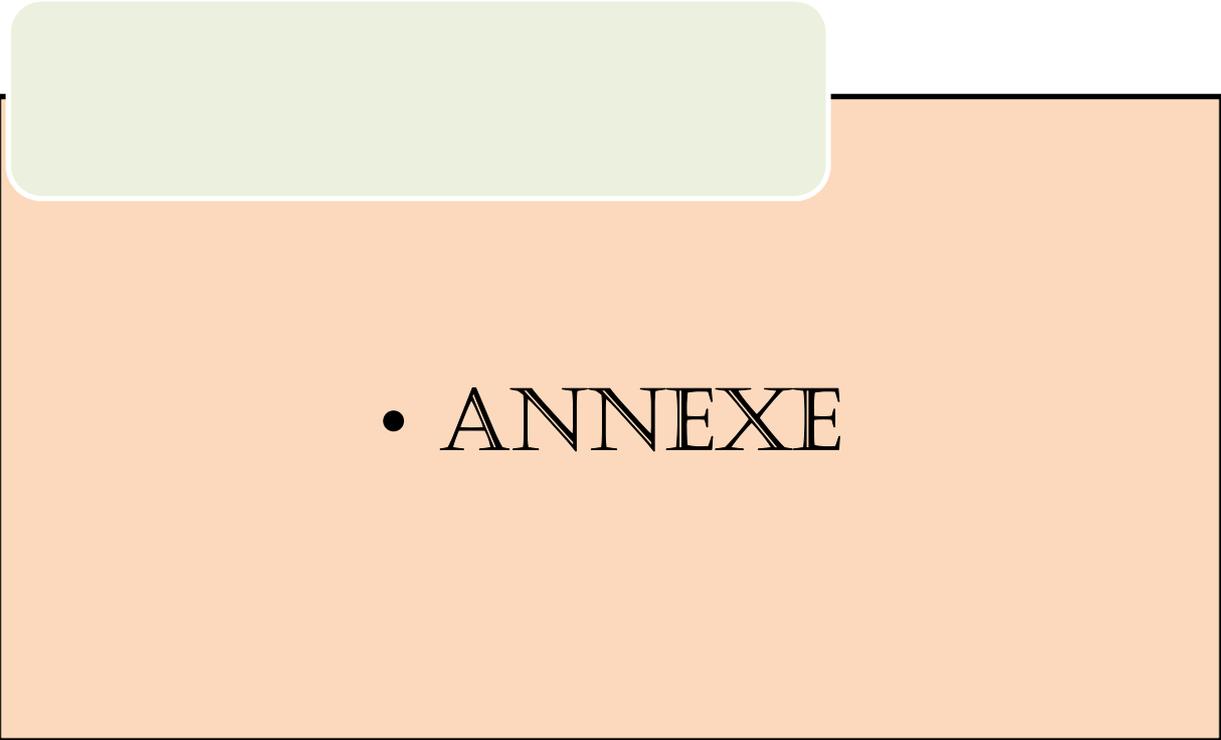
acétate d'éthyle présente un pouvoir antioxydant plus important que les autres extraits, avec une valeur de **41, 47** µg/ml.

En parallèle, l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits préparés a été évaluée *in vitro*, en utilisant l'antibiogramme standard et la micro-dilution en milieu liquide; L'huile essentielle de la partie aérienne de *Teucrium polium L. Thymoïdes*, présente une excellente sensibilité vis-à-vis des huit microorganismes sélectionnées. Pour le pouvoir antibactérien des polyphénols, seule la souche *Staphylococcus aureus* a montré une bonne activité pour les extraits testés suivi par *Salmonella*, qui exhibe une activité moyenne. Les autres souches bactériennes *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebseila oxytoca* et la levure *Candida* se sont révélées insensibles aux extraits phénoliques de notre plante. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait acétate d'éthyle a manifesté une activité modérée contre *S.aureus* et une faible activité contre *Salmonella*. En revanche l'extrait butanolique a présenté une faible activité vis-à-vis de ces bactéries.

Concernant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits phénoliques et de l'huile essentielle de *Teucrium Polium L. Thymoïdes*, envers la souche bactérienne la plus sensible, varient entre **0,125** et **2** µg/ml. L'étude des concentrations minimales bactéricides (CMB) a permis de mettre en évidence l'effet bactériostatique de ces extraits, permettant de les classer comme agents antibactériens "*bactéricides*".

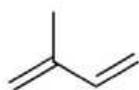
Pour la continuité des travaux entamés avec plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- ☞ élargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo*.
- ☞ élargir le spectre d'activités biologiques ciblées, en incluant l'activité cytotoxique, anti-inflammatoire, antifongique et anticancéreuse, ou autres...
- ☞ isoler et caractériser les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques.
- ☞ approfondir l'étude phytochimique, en utilisant des techniques plus performantes pour la détermination de la structure chimique de ces composés par différentes méthodes de séparation et d'identification.
- ☞ étudier la toxicité des extraits pour déterminer leur utilisation.
- ☞ investigation phytochimique, pharmaceutique et ethnobotanique des autres plantes médicinales algériennes.

- 
- ANNEXE

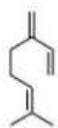
Annexe I : Structure de quelques composés terpéniques

Hemiterpenoids



Isoprene

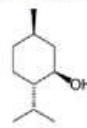
Monoterpenoids



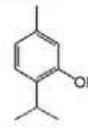
Myrcene



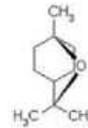
Linalool



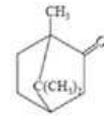
Menthol



Thymol

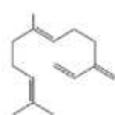


Eucalyptol

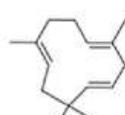


Camphor

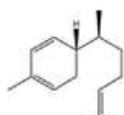
Sesquiterpenoids



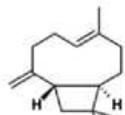
β -franescene



α -humulene

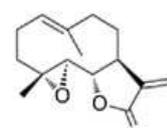


Zingiberene

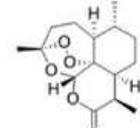


Caryophyllene

Sesquiterpenoid lactones

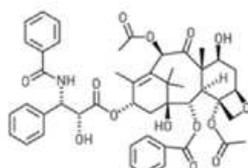


Parthenolide



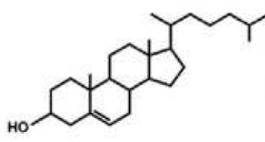
Artemisinin

Diterpenoids

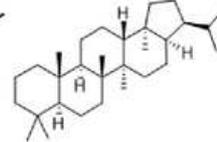


Taxol

Triterpenoids

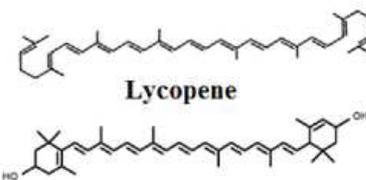


Cholesterol

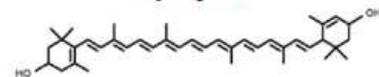


Hopane

Tetraterpenoids



Lycopene



Zeaxanthin

Annexe II: Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Teucrium*

Espèce	Principes actifs isolés	Références
<i>Teucrium polium</i> L	Polyphénols, flavonoïdes	ABDOLLAHI et al., 2003
<i>Teucrium hyrcanicum</i> L.	5, 6, 4'-trihydroxy-7-éthoxyflavone (7méthylscutellareine). cirsiol (6-hydroxyluteolin derivatives	OGANESYAN, 2005
<i>Teucrium polium</i> subsp. <i>Pilosum</i>	19-acétylteupoline	LA TORRE et al., 1986
<i>Teucrium podium</i>	Teupoline	MALAKOV et al., 1982
<i>Teucrium orientale</i>	Flavone : cirsilineol (5,4'-dihydroxy-6,7,3'trimethoxyflavone).	OGANESYAN, 2007
<i>Teucrium tomentosum</i>	3-acétoxy-4,18:15,16-diepoxy-6,12-dihydroxyneocleroda-13(16),14-dien-19,20olide,	SOUNDARYA et al., 2003

Teucrium frutican	Diterpènes, flavonoïdes	SOSA et TONN, 2006 ; COLL et TANDRO, 2004
Teucrium lusitanicum et T. algarbiensis	α -pinène, sabinène, β -pinène, limonène, germacrène D et élémol.	CAVALEIRO et al., 2004
Teucrium divaricatum	villosine B, villosine A, teuvincenone D	ULUBELEN et al., 1994
Teucrium arduini L. (Croatie)	Sesquiterpène (β - caryophyllène (35.2 %) et germacrène D (18,7 %)). Composés phénoliques (quercétine, acide férulique et acide rosmarinique)	KREMER et al., 2013
Teucrium chamaedrys	Steroides	ULUBELEN et al,1993 ; LOPEZ et al., 2007
Teucrium cylindrunium	neoclerodane diterpènes	OLGUIN et al., 1998
Teucrium marum (Sardinia)	Isocaryophyllène, β -bisabolèn, β sesquiphelletrene, α -santalene dolichodial et, A-caryophyllene.	RICCI et al., 2005
Teucrium Iberian (Peninsula et Balearic islets)	Terpènes	VELASCO- NEGUERUELA et PEREZ-ALONSO, 1990

Annexe III: Les réactifs utilisés pour le criblage phytochimique

Réactif de MAYER

Chlorure mercurique.....1,35g
Iodure potassium.....5 g
Eau distillée.....30 ml
Agiter jusqu'à dissolution puis ajouter :
Eau distillée.....q.s.p 100 ml

Réactif DE BOUCHARDAT

Iode.....2 g
Iode de potassiu.....2 g
Eau distillée.....q.s.p 100 ml

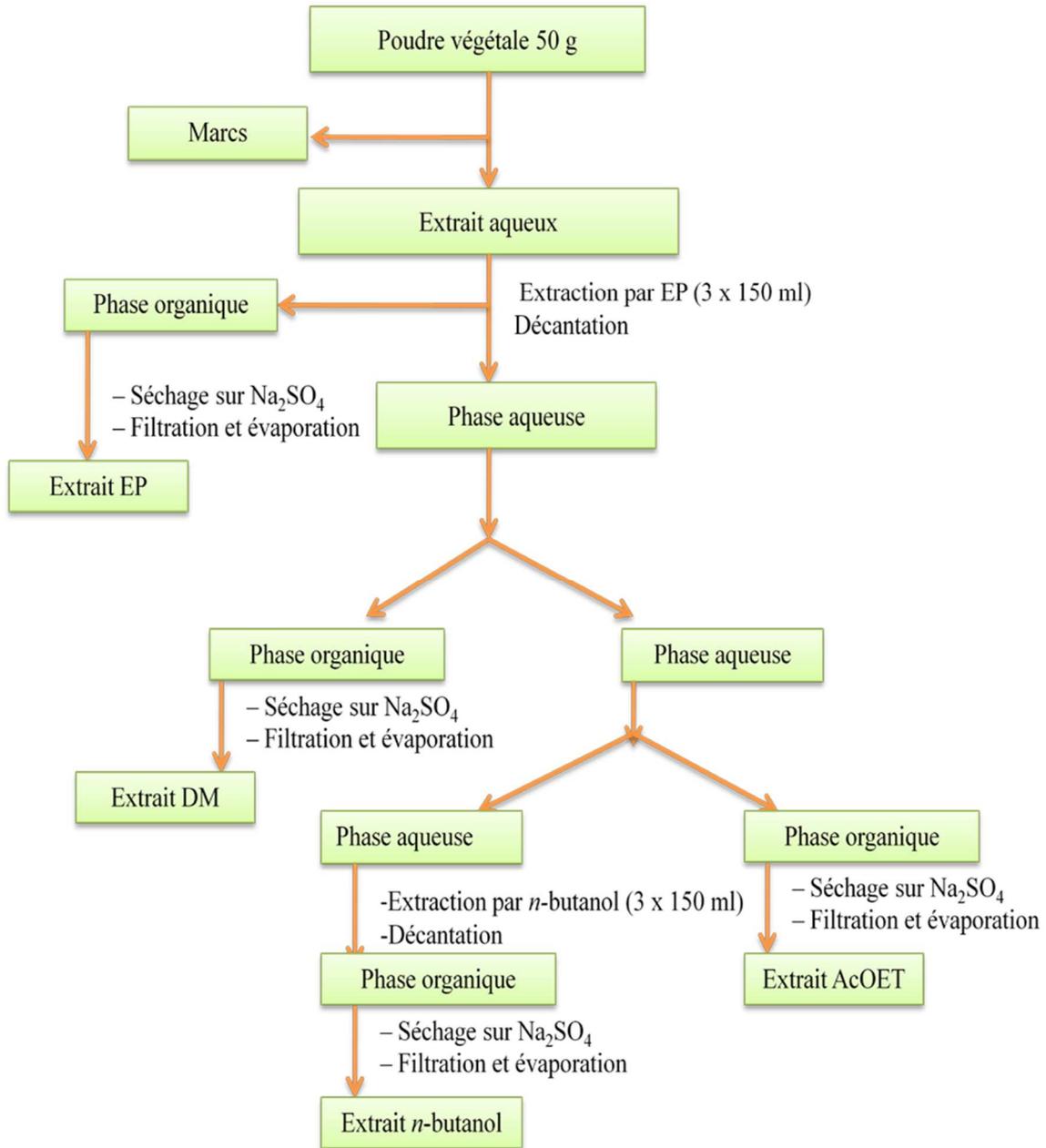
Réactif de DRAGENDORFF

Sous nitrate basique de bismuth.....0.85 g
Iodure potassium.....8 g
Acide acétique glacial..... 10 ml
Eau distillée.....70 ml
Chauffer et filtrer sur verre fritté, si nécessaire.

Réactif de STIASNY :

Formol.....6 ml
Acide chlorhydrique.....3 ml

Annexe IV: Organigramme de l'extraction des polyphénols



Annexe V: Calcul des cendres totales (CT) et cendres sulfuriques (CS)

La masse finale (totale) M= 60,83g

La masse de creuset vide M'= 60,21

La prise d'essais de la matière PE= 5g



$$CT = \frac{60.83 - 60.21}{5} * 100\% = 12,4 \%$$



$$\% CS = \frac{0,084}{2} * 100\% = 4,20 \%$$

Annexe VI : Relation entre structure et couleur de flavonoïdes

Couleur de tache	Type de flavonoïde
Brun	3-OH absent ou 3-substitué
Violet	Flavone 5-OH et 4-OH Flavone 3-OR et 5-OH ; 4-OH Flavone 6 ou 8 OH Chalcone, isoflavone, dihydroflavonol, flavanones.
Bleu clair	Flavone sans 5-OH libre Flavonol sans 5-OH libre avec 3-OH substitué
Jaune terne, jaune, fluorescence orangée	Flavonol 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre.
Jaune vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	avec 3-OH libre Aurone, chalcone, flavanone.
Jaune pâle	Dihydroflavonol
Couleur de tache	Type de flavonoïde
Brun	3-OH absent ou 3-substitué
Violet	Flavone 5-OH et 4-OH Flavone 3-OR et 5-OH ; 4-OH Flavone 6 ou 8 OH Chalcone, isoflavone, dihydroflavonol, flavanones.
Bleu clair	Flavone sans 5-OH libre Flavonol sans 5-OH libre avec 3-OH substitué
Jaune terne, jaune, fluorescence orangée	Flavonol 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre.
Jaune vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	avec 3-OH libre Aurone, chalcone, flavanone.
Jaune pâle	Dihydroflavonol

Annexe VII : Résultats de dosage des composés phénoliques

GAMME D'ETALLONAGE				
Gamme Acide gallique	R1	R2	R3	MOY
25	0,067	0,08	0,057	0,068
50	0,16	0,152	0,142	0,151
100	0,451	0,458	0,449	0,453
200	0,809	0,806	0,793	0,803
300	1,137	1,141	1,039	1,106

valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

		Polyphenoles totaux				
		R1	R2	R3	Moy	Cal
Absorbance à 760 nm	acétate d'éthyle	0,37	0,389	0,318	0,359	119,66
	N-butanol	0,289	0,327	0,329	0,315	106,99
	aqueux	0,143	0,153	0,353	0,149	49,89

Valeurs moyennes de l'absorbance d'étalonnage de la catéchine.

Catéchine	MOY
0	0
50	0,187
100	0,371
200	0,64
300	1,056
500	1,645

Valeurs moyennes de l'absorbance de la courbe d'étalonnage de la catéchine.

		FLAVONOIDES				
		R1	R2	R3	MOY	Cal
Absorbant à 510 nm	acétate d'éthyle	0,333	0,308	0,291	0,310	97,55
	n-butanol	0,302	0,317	0,289	0,302	94,55
	aqueux	0,112	0,122	0,104	0,084	31,55

Valeurs moyennes de l'absorbance de la courbe d'étalonnage de la catéchine.

		TANNIN CONDENSE				
		R1	R2	R3	Moy	Cal
Absorbant à 550 nm	acétate d'éthyle	0,425	0,438	0,559	0,474	152
	n-butanol	0,071	0,132	0,130	0,111	31
	Aqueux	0,133	0,152	0,136	0,140	40,78

Dosage des polyphénols

	Concentrationv(mg/ml)	R1	R2	R3	Moy	Cal	PI%	
Absorbance à 695	acétate d'éthyle	[10]	0,326	0,345	0,321	0,330	0,173	17,3
		[20]	0,264	0,232	0,234	0,243	0,34	39,19
		[50]	0,198	0,191	0,192	0,193	0,5158	51,58
		[150]	0,194	0,260	0,179	0,166	0,5341	53,41
		[250]	0,198	0,183	0,188	0,189	0,5258	52,58
	n-butanol	[20]	0,293	0,294	0,277	0,288	0,28	28
		[50]	0,197	0,194	0,204	0,197	0,506	50,6
		[150]	0,191	0,168	0,171	0,176	0,558	55,8
		[250]	0,178	0,173	0,179	0,176	0,558	55,8
	aqueux	[20]	0,354	0,371	0,369	0,364	0,088	8,8
		[50]	0,280	0,249	0,250	0,250	0,3508	35,08
		[150]	0,201	0,201	0,190	0,193	0,5066	50,66
[250]		0,197	0,180	0,188	0,188	0,529	52,9	

Tableau A: Quantité des phénols totaux dans les différents extraits.

Extrait	Polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait)
Acétate d'éthyle	119.66 ±12.25
n-butanol	109.99 ±7.53
Eau	49.89 ± 1.93

y Tableau B: Quantité des flavonoïdes totaux dans les différents extraits.

Extrait	flavonoïdes totaux (mg EAG/g d'extrait)
Acétate d'éthyle	97.55 ±7.04
n-butanol	94.55 ±5.17
Eau	31.55 ± 3.01

Tableau C : Quantité des tanins condensés (mg EC/g d'extrait).

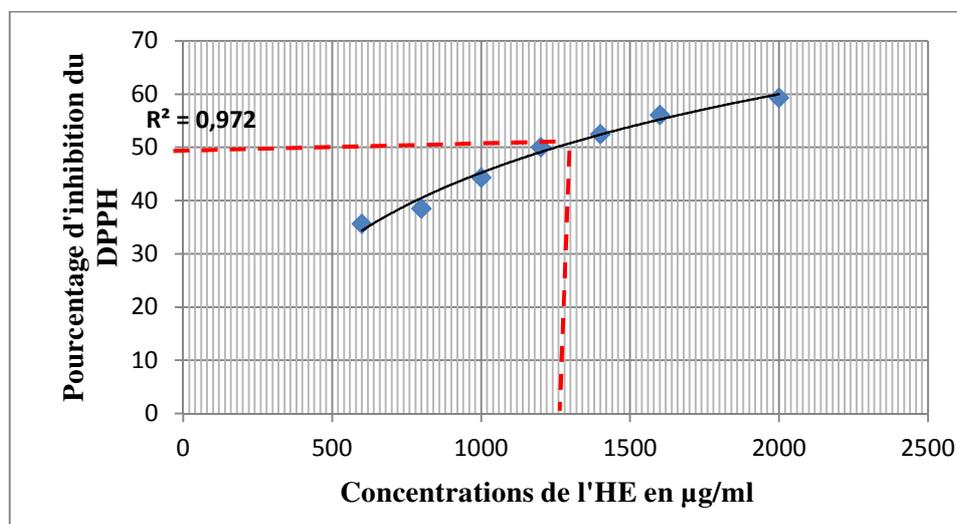
Extrait	tannins condensé (mg EAG/g d'extrait)
Acétate d'éthyle	152,00 ±24,63
n-butanol	31,00 ±11,55
Eau	40,00 ± 3,40

Annexe VIII : Résultats de l'activité antioxydante de l'HE de *Teucrium polium ssp thymoides*

Concentrations (µg/ml)	Pourcentage d'inhibition du DPPH
600	35.68 ± 0.17
800	38.54 ± 0.77
1000	44.37 ± 0.46
1200	50.10 ± 0.77
1400	52.45 ± 1.40
1600	56.13 ± 0.61
2000	59.40 ± 0.78

Tableau A: IC_{50} du test DPPH (µg/ml) des différents extraits

ntioxydants	Valeur de IC_{50} (mg/ml)
HE de TP	1,250
Acide ascorbique	0.225



Annexe VIII : Résultats de l'activité antioxydante des polyphénols de *Teucrium polium ssp thymoïdes*

Extrait	Répétition	CI50
acétate d'éthyle	R1	49,5
	R2	38,82
	R3	36,08
n-butanol	R1	48,54
	R2	43,13
	R3	51,01
aqueux	R1	152
	R2	155
	R3	142,76

Tableau B: Valeurs des CI50 de différents extraits étudié

Extrait	Valeurs de (IC 50 en µg/ml)
Acétate d'éthyle	41,47
n-butanol	47,56
Eau	149,92
BHT	11,5

Annexe X : Antibiogramme des extraits préparés

