

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée

MEMOIRE présenté en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie et Biologie moléculaire

Thème :

**Etude de certaines activités biologiques des composés phénoliques
extraits à partir d'*Artemisia herba halba* de la région de Tébessa**

Présente par :

DJABALLAH Bilal

TALBI Abdelali

Devant le jury :

| | | | |
|-----------------|-----|-------------------------------------|------------|
| ZEGHIB Assia | MCB | Université Larbi Tébessi de Tébessa | Président |
| DJABRI Belgacem | MCA | Université Larbi Tébessi de Tébessa | Rapporteur |
| ZIANI Sawssen | MAA | Université Larbi Tébessi de Tébessa | Examineur |

Date de soutenance : 30/05/2016.

Note : 16/20 Mention : Très bien



Abstracts

Within the general framework of valorization of the medicinal plants in the Algerian and Mediterranean area, we was interested in the study of *Artemisia herba alba* species. The principal aim is to studing the antioxydants and antimicrobic activities extracts of the *Artemisia herba alba* collected in the area of Tébéssa.

The study started by evaluating extraction output of phenolic compounds starting from solvents non-polar solvents (EP and DCM) then by polar solvents (AE and MeOH). The proportioning of total polyphenols was made in a quantitative way by using the reagent of Folin-Ciocalteu. The study of the anioxydante activity was made *in vitro* according to the method of trapping of free radical DPPH in a qualitative (CCM) and quantitative (determination of pi). The antimicrobic activity was studied by adopting the method of diffusion in gélosé medium. An antibiogramme of comparison was also carried out by using 08 different antibiotics.

The methanolic extract represents the highest output (11,45 %). The phytochimic tests revealed the presence of Saponin, Flavonoïde, Tannins and Terpenoïde. The results of this study show a high antiradicalaire capacity polar extracts (especially methanoïc, 93,84 %) and a weaker capacity of the non-polar extracts. The four extracts of *Artemisia herba alba* have a considerable inhibiting effect on *Pseudomonas aeruginosa*.ATCC 27853. Five antibiotics out of eight presented an inhibiting capacity comparaison with our extracts whereas the three remainders presented only one weak inhibiting capacity. The results of this study confirm the use of *Artemisia herba alba* for these therapeutic capecity.

Key words:

Artemisia herba alba, phenolic compound, antioxidant activity and antimicrobial activity.

RÉSUMÉ

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la flore Algérienne et méditerranéenne. Nous nous sommes intéressé à l'étude d'une espèce d'*Artemisia herba alba*. Le but principal est d'étudier les activité antioxydante et antibactérienne des extraits des rameaux d'*Artemisia herba alba* récoltés dans la région de Tébessa.

L'étude a commencé par évaluer le rendement d'extraction des composés phénoliques à partir des solvants apolaire : EP et DCM puis par les solvants polaire : AE et MeOH. Le dosage des polyphénols totaux a été fait de façon quantitative en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu des composée phénolique par la méthode de DPPH. L'étude de l'activité anioxydante a été faite *in vitro* selon la méthode de piégeage du radical libre DPPH de façon qualitative (CCM) et quantitative (détermination du PI). L'activité antibactérienne a été étudiée en adoptant la méthode de diffusion en milieu gélosé. Un antibiogramme de comparaison a été également réalisé en utilisant 08 antibiotiques différents.

L'extrait méthanolique représente le rendement le plus élevé (11,45 %). Les essais phytochimiques ont révélé la présence des Saponines, des Flavonoïdes, des Tannins et des Terpenoides. Les résultats de cette étude montrent un pouvoir antiradicalaire élevé des extraits polaires (surtout méthanoïque, 93,84 %) et un pouvoir plus faible des extraits apolaires. Les quatre extraits d'espèces *Artemisia herba alba* possèdent un effet inhibiteur considérable sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Cinq antibiotiques sur huit ont présenté un pouvoir inhibiteur comparable à nos extraits alors que les trois restants ne présentaient qu'un pouvoir inhibiteur faible. Les résultats de cette étude confirme l'utilisation d'*Atemisia herba alba* pour ses vertus thérapeutiques.

Mots-clés :

Artemisia herba alba, composées phénoliques, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A ma source de tendresse, l'être le plus chère dans le monde, ma mère.

A mon père

A mes chères sœurs

A mes frères.

A tous mes amis

A tous ceux que j'aime.

Djaballah Bilal

Remerciements

Avant tout nous remercions « ALLAH » le tout puissant de nous avoir accordé

la force, le courage et la patience pour terminer ce travail

Nous remercions notre encadreur "Dr: DJABRI Belgacem" pour son aide

durant la réalisation de notre travail, ses orientations, ses connaissances et

son

encouragement tout au long de notre travail,

Nos plus vifs remerciements à tous nos enseignants surtout Dr. ZEGHIB

Assia qui a suivi ce travail depuis les premiers instants .

N'oublions pas de présenter nos remerciements à tous qui ont contribué de

prés on de loin à la réalisation et l'accomplissement de ce Travail.

Liste des tableaux

| Tableau N° | Titre | Page |
|------------|--|------|
| 01 | Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées | 06 |
| 02 | Mode d'action de quelques antioxydants | 07 |
| 03 | Principales classes des flavonoïdes | 16 |
| 04 | Activité biologique de quelque composée phénolique | 18 |
| 05 | Liste des appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction. | 24 |
| 06 | Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour le Screening phytochimique. | 25 |
| 07 | Liste d'appareils ,verreries et produits utilisés pour Détermination du taux des composés phénoliques totaux | 28 |
| 08 | liste d'appareils ,verreries et produits utilisés pour CCM | 30 |
| 09 | liste d'appareils ,verreries et produits utilisés pour Détermination de l'activité antioxydant (Test d'activité anti DPPH). | 31 |
| 10 | liste d'appareils ,verreries et produits utilisés pour. Détermination de l'activité antibactérienne (diffusion en milieu gélosé) | 33 |
| 11 | Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition | 37 |
| 12 | Aspect et couleur des extraits d'étude | 39 |
| 13 | le screening phytochimique des principaux principes actifs chez l' <i>Artemisia herba alba</i> | 41 |
| 14 | Teneur des polyphénols totaux (en µg EAG/mg d'extrait) des quatre extrait du éspece <i>herba alba</i> | 42 |
| 15 | L'activité antiradicalaire contre le DPPH des extraits methanolique et acétate d'ethyle d' <i>Artemisia herba alba</i> | 44 |
| 16 | Caractères morphologiques de <i>Pseudomonas aeruginosea</i> utilisée comme germes-tests. | 44 |

Liste des tableaux

| | | |
|-----------|---|----|
| 17 | Diamètres des Zones d'Inhibition(mm) de la Croissance Bactérienne par les extraits d'étude: | 45 |
| 18 | Antibiogramme des bactéries sensibles aux extraits d'étude, étudiées en présence des différents antibiotiques | 47 |

Liste des figures

| Figure N° | Titre | Page |
|-----------|---|------|
| 01 | Sites de production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène | 04 |
| 02 | Structure du radical-cation ABTS ⁺ | 09 |
| 03 | Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe. | 14 |
| 04 | <i>Artemisia herba-alba</i> dans son milieu naturel au début de la saison de fleuraison | 20 |
| 05 | Carte géographique de la région Hammamet montrant la station de récolte | 23 |
| 06 | Forme libre et réduite du DPPH | 32 |
| 07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au microscope électronique à balayage | 35 |
| 08 | représentation des rendements des composés phénoliques | 39 |
| 09 | courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols. | 41 |
| 10 | Effet inhibiteur de quatre extraits d'espèce <i>herba alba</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 46 |
| 11 | Effet inhibiteur des antibiotiques sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 47 |

Liste des photos

| Photo N° | Titre | Page |
|-----------------|--|-------------|
| 01 | Résultats du Test DPPH-CCM sur des concentrations d'extraits et des spots non déterminés | 43 |
| 02 | Résultats du Test DPPH-CCM sur des concentrations de 1mg/ml d'extraits et des spots de 250 μ l | 43 |

Table des matières

| | |
|------------------------------------|--|
| ABSTRACT | |
| RESUME | |
| REMERCIEMENTS | |
| DEDICACES | |
| LISTE DES TABLEAUX | |
| LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES | |

INTRODUCTION

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Activité biologique

| | |
|---|----|
| I.1. Stress oxydatif | 3 |
| I.2. Radicaux libres | 3 |
| I.2.1. Production de radicaux libres | 4 |
| I.2.1.1. Production intracellulaire | 4 |
| I.2.1.2. Production extracellulaire | 4 |
| I.2.2. Mécanisme d'action des radicaux libres | 5 |
| I.3. Antioxydants | 5 |
| I.3.1. Sources d'antioxydants | 5 |
| I.3.1.1. Antioxydants naturels | 5 |
| I.3.1.2. Antioxydants synthétiques | 6 |
| I.3.2. Types d'antioxydants | 6 |
| I.3.3. Mécanisme d'action des antioxydants | 7 |
| I.3.4. Méthodes de détermination de l'activité antioxydant | 8 |
| I.3.4.1. Test du DPPH | 8 |
| I.3.4.2. Test d'ABTS | 8 |
| I.3.4.3. Test TPTZ | 9 |
| I.5. Activité antibactérienne | 9 |
| I.5.3. Mécanismes d'action antibactérienne | 9 |
| I.5.3.1. Action germicide | 9 |
| I.5.3.2. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique) | 10 |
| I.5.1. Principales substances antimicrobiennes | 10 |
| I.5.1.1. Agents physiques | 10 |
| I.5.2.1.2. Agents chimiques | 10 |
| I.5.2.1.2. Antibiotiques | 11 |
| I.5.1.2. Huiles essentielles | 11 |
| I.5.2. Autres agents antimicrobiens | 11 |
| I.5.4. Méthodes de détermination de l'activité antibactériennes | 12 |

Chapitre II composés phénoliques

| | |
|---|----|
| II. Composés phénoliques | 13 |
| II.1 Structures chimiques et classification | 13 |
| II.1.1. Non flavonoïdes | 14 |
| II.1.1.1. Acides phénoliques | 14 |
| II.1.1.2. Stilbènes | 15 |
| II.1.1.3. Lignines | 15 |
| II.1.1.4. Lignanes | 15 |
| II.1.1.5. Coumarines | 15 |
| II.1.2. Flavonoïdes | 15 |
| II.1.3. Tannins | 17 |

Table des matières

| | |
|---|----|
| II.2 Biosynthèse des polyphenols | 17 |
| II.3 Rôle et intérêt des composés phénoliques | 18 |
| Chapitre III : Genre <i>Artemisia</i> | |
| III. <i>Artemisia herba-alba</i> | 91 |
| III.1. Genre <i>Artemisia</i> | 91 |
| III.2. Présentation de l'espèce <i>Artemisia herba-alba</i> | 91 |
| III.2.1. Nomenclature et taxonomie | 20 |
| III.2.2. Description botanique | 20 |
| III.2.3. Répartition géographique | 29 |
| III.2.4. Terpènes de l' <i>Artemisia herba-alba</i> | 29 |
| III.2.5. Flavonoïdes de l' <i>Artemisia herba-alba</i> | 22 |
| III.3. Intérêt thérapeutique d' <i>Artemisia herba-alba</i> | 22 |
| MATERIELSET METHODES | |
| I. Matériellet méthode | 23 |
| I.1. Matériel végétal | 23 |
| I.1.1. Echantionage | 23 |
| I.1.2. Identification | 23 |
| I.2. Préparation des extraits | 24 |
| I.2.1. Matériel | 24 |
| I.2.2. Extraction par les solvants organiques à polarité croissante | 24 |
| I.3. Screening phytochimique | 25 |
| I.3.1. Matériel | 25 |
| I.3.2. Recherches des polyphénols | 25 |
| 3.I.2.1.Recherche des tanins | 25 |
| I.3.2.1.1. Principe | 25 |
| I.3.2.1.2. Mode opératoire | 26 |
| 3.I.I.2.Recherche des leucoanthocyanes | 26 |
| I.3.2.2.1. Principe | 26 |
| I.3.2.2.2. Mode opératoire | 26 |
| I.3.2.3. recherche des flavonoïdes | 26 |
| I.3.2.4.recherche des saponines | 26 |
| I.3.2.4.1. Principe | 26 |
| I.3.2.4.2. Mode opératoire | 27 |
| I.3.2.5. Recherche des alcaloïdes | 27 |
| 3.I.I.IRecherche des terpenoïdes et des stéroïdesdes | 27 |
| I.3.2.6.1. Principe | 27 |
| I.3.2.6.2. Mode opératoire | 27 |
| I.3.2.7. Recherche des quinones | 28 |
| I.3.2.7.1. Principe | 28 |
| I.3.2.7.2. Mode opératoire | 28 |
| I.4. Détermination du taux des composés phénoliques totaux | 28 |
| I.4.1. Matériel | 28 |
| I.4.2. Principe | 29 |
| I.4.3. Mode opératoire | 29 |
| I.4.4. Méthode de calcul | 29 |
| I.5. Tests par CCM(Chromatographie sur couche mince) | 29 |
| I.5.1. Matériel | 29 |
| I.5.2. Principe | 30 |
| I.5.3. Mode opératoire | 30 |
| I.5.4. Lecture | 31 |

Table des matières

| | |
|---|----|
| I.6. Tests d'activités biologiques | 31 |
| I.6.1. Détermination de l'activité antioxydant (Test d'activité anti DPPH) | 31 |
| 3.I.1.1. Matériel | 31 |
| I.6.1.2. Principe | 32 |
| I.6.1.3. Mode opératoire | 32 |
| I.6.1.4. Méthode de calcul | 33 |
| I.6.2. Détermination de l'activité antibactérienne (diffusion en milieu gélosé) | 33 |
| I.6.2.1. Matériel | 33 |
| I.6.2.2. Principe | 34 |
| I.6.2.3. Bactéries d'étude | 34 |
| I.6.2.4. Coloration de Gram | 35 |
| I.6.2.4.1. Principe | 35 |
| I.6.2.4.2. Mode opératoire | 35 |
| I.6.2.4.2.1. Préparation et fixation du frottis microbien | 35 |
| I.6.2.4.2.2. Coloration | 35 |
| I.6.2.5. Préparation des inoculums | 36 |
| I.6.2.5.1. Enrichissement | 36 |
| I.6.2.5.2. Préparation de la suspension bactérienne | 36 |
| I.6.2.5.3. Ensemencement / Test antibactérien | 36 |
| I.6.2.5.4. Lecture | 37 |
| I.7. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme | 37 |
| I.7.1. Matériel | 37 |
| I.7.2. Principe | 37 |
| I.7.3. Mode opératoire | 38 |
| I.8. Analyses statistiques des données | 38 |
| RESULTAT ET DISCUSSION | |
| II. Résultats et Discussion | 39 |
| II.1. Rendement de l'extraction | 39 |
| II.2. Le screening phytochimique | 40 |
| II.3. Dosage des phénols totaux | 41 |
| II.4. Activité antioxydante | 43 |
| II.4.1. Tests par CCM(Chromatographie sur couche mince) | 43 |
| II.4.2. Détermination des pourcentages d'inhibition | 43 |
| II.5. Etude de l'activité antibactérienne | 44 |
| II.5.1. Résultats de la coloration Gram | 44 |
| II.5.2. Sensibilité Pseudomonas aeruginosa aux extraits d'étude | 45 |
| II.6.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme | 47 |
| CONCLUSION | |
| | 48 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | |
| | 49 |
| ANNEXES | |

Introduction

En dépit des avancées scientifiques faites par la médecine moderne, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 80% de la population africaine a toujours recours à la médecine traditionnelle en matière de soins de santé primaires (Alice, 2012).

Aujourd'hui les plantes jouent encore un rôle très important dans les traditions thérapeutiques et la vie des habitants, mais les règles de leur utilisation manquent parfois de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences de la thérapeutique moderne (Muthu *et al.*, 2006). Ces dernières années, beaucoup de recherches se sont orientés vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sûreté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes (MEZITI, 2011).

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (Boudjouref, 2011).

Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Artemisia*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions semi arides. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Artemisia herba alba*. Cette plante est largement utilisée pour traiter les troubles digestives, les douleurs articulaires et musculaires, contre l'anorexie, les spasmes l'insomnie ainsi que pour l'expulsion des vers intestinaux...etc. (Nabli, 1989). Afin d'expliquer ces différents effets, il serait intéressant d'investiguer l'éventail des activités biologiques des extraits de cette plante.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits des rameaux d'*Artemisia herba alba* récoltés dans la région de Tébessa en vue de leur valorisation sur le plan médicinal et ceci pour une meilleure exploitation.

Introduction

Ce travail sera divisé en deux principales parties:

- La première partie bibliographique sera consacré à une présentation de la plante d'*Artemisia herba alba* de la famille des *Asteraceae*, une étude sur les composés phénoliques et les activités recherchées.
- La deuxième partie sera dédié aux travaux personnels, comprenant la méthodologie de travail et les différents résultats obtenus, discussion, conclusion.

Depuis quelques années le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du (stress oxydant) c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygènes toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (**Favier, 2003**). Les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydant en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, cancer, diabète, hypertension et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**Meddourr et al., 2013**).

I.1. Stress oxydatif

Dans des conditions physiologiques normales, il existe un équilibre entre la génération et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO en quantité faible et contrôlée sont nécessaires au bon fonctionnement des cellules et interviennent dans des processus de signalisation cellulaire. En quantité trop importante ils sont nocifs pour la cellule et participent au processus de vieillissement cellulaire et à certaines pathologies (**Ames et al., 1993 ; Simonian et Coyle, 1996 ; Madamanchi et al., 2005**) en effet, les ERO sont des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et instables induisant un vieillissement des protéines, une peroxydation lipidique et un endommagement de l'ADN (**Negre-salvayre et salvayre, 2005 ; Baudin, 2006**). Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité des radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas des ressources antioxydants suffisantes pour les éliminer (**pincemail et al, 1999**).

I.2. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif (**Vansant, 2004**). Ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Ils sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente avec l'élévation de la consommation d'oxygène (**Gauche et housswirth, 2006**).

Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologiques une variété de radicaux libres dérivés de l'oxygène tel que (l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical superoxyde O_2^- , les peroxyde alkyles ROOH et les radicaux hydroxyles OH , les peroxydes ROOH et alkoxyles RO (**Cavina., 1999**).

I 2.1. Production de radicaux libres

Les espèces radicalaires sont naturellement synthétisées dans les organismes vivants. Cette synthèse peut être morbide et elle va généralement de pair avec le métabolisme cellulaire de l'oxygène ainsi que les réactions d'oxydo-réduction (Allane, 2009). En outre, elle est susceptible de s'avérer intracellulaire ou extracellulaire.

I.2.1.1. Production intracellulaire

La production des ERO dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles (Figure 01) mais elle est essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire. La production de ce radical est liée à l'intensité d'oxygénation (activités physiques). D'autre part les désordres mitochondriaux génétiques, inflammations ou nutritionnels (carence en ubiquinone) peuvent être des facteurs amplificateurs de cette synthèse (Sampayo *et al*, 2003).

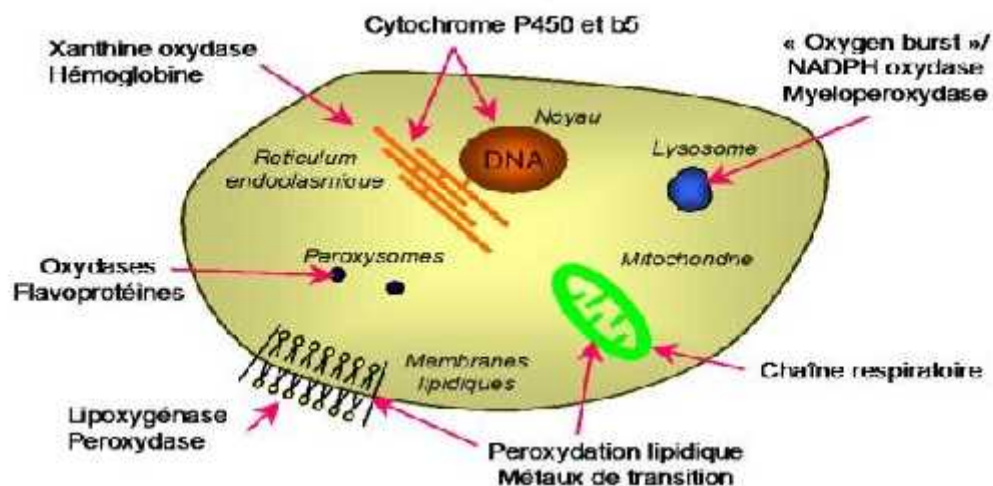


Figure 01 : Sites de production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (Aira., 2012).

I.2.1.2. Production extracellulaire

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme. L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) présents dans notre mode de vie (polluants industriels...), ainsi que les cigarettes, les produits chimiques, les pesticides et la consommation d'alcool, sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (Aira., 2012).

I.2.2. Mécanisme d'action des radicaux libres

Les ERO et ERN (espèces réactives azotée) sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants (**Valko et al., 2004**). Quelles que soient leurs fonctions, ces molécules jouent donc un rôle indispensable chez tous les êtres vivants. En résumé, les mécanismes d'action principaux des ERO sont alors de déclencher ou d'amplifier un signal intracellulaire par deux mécanismes principaux (par modification de l'équilibre rédox intracellulaire et par modification oxydative des protéines). Les ERO sont également à l'origine de l'action bactéricide par les leucocytes (**Aira, 2012**).

I.3. Antioxydants

Les antioxydants sont des substances ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme (**tang, Halliwell, 2010**). Ainsi, ils servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (**Wenqtang, 2007**). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (**Goudable, 1997**).

I.3.1. Sources d'antioxydants

Selon leur origine, on distingue deux sources, les antioxydants naturels (synthétisés dans l'organisme ou amenés par l'alimentation) et les antioxydants synthétiques (**Allane, 2009**).

I.3.1.1 Antioxydants naturels

Les aliments végétariens sont sources de nombreuses substances à potentiel antioxydant, elles incluent le beta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E... etc. Ils peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et ils ont également une capacité de lier les acides gras libres (**Mouhmmmedi, 2006**).

Tableau 01 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (Mohmmedi Z, 2013).

| Principaux nutriments antioxydants | Sources alimentaires |
|------------------------------------|---|
| Vitamine C | Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron |
| Vitamine E | huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix |
| -carotène | Légumes et fruits |
| Sélénium | Poisson, œufs, viandes, céréales, volaille |
| Zinc | Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers |
| Flavonoïdes | Fruits, légumes, thé vert |
| Acides phénoliques | Céréales complètes, baies, cerises |
| Tannins | Lentilles, thé, raisins |

I.3.1.2 Antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, de nombreux antioxydants de synthèse (butylhydroxyanisole, butylhydroxytoluène, propylgallate) sont utilisés comme additifs alimentaires pour empêcher les aliments gras de rancir et pour protéger les vitamines liposolubles (A, D, E et K) contre l'oxydation (Negre-Salvayre et Salvayre, 2005). Les vitamines C et E ont également des propriétés antioxydantes et ont l'avantage d'augmenter la valeur nutritive des aliments (Maamri S, 2008).

I.3.2 Types d'antioxydants

Il existe deux types d'antioxydants :

Les antioxydants primaires ou radicalaires ou vrais, qui permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique : $AH + R\bullet \rightarrow A\bullet + RH$.

La molécule : AH est antioxydante si le radical formé $A\bullet$ est plus stable.

La stabilité du radical $A\bullet$ peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires : $A^* + A' \rightarrow A-A$ ou $A\bullet + R^* \rightarrow A-R$.

Les antioxydants secondaires ou préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des substances décomposant les hydroperoxydes en alcool, des thiols

(glutathion, acides aminés soufrés) ou les disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes, des chélatants des métaux promoteurs d'oxydation type fer et cuivre, comme l'acide citrique et les lécithines) ou enfin de séquestrants d'oxygène comme l'acide ascorbique (Rolland, 2004).

I.3.3 Mécanisme d'action des antioxydants

Dans les conditions dites physiologiques, il y a un équilibre entre la production des radicaux libres et les mécanismes endogènes de défense antioxydante constitués par le système enzymatique, les trois systèmes principaux de défense enzymatique impliquent les superoxydes dismutases (SOD), les catalases et les glutathion peroxydases (Tableau 02) (Sekli-Belaidi, 2011) le système non enzymatique possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques, du fait de leur petite taille. Ils peuvent, en effet, pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques. Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances hydrophiles ou lipophiles et ils sont, en partie, produits par l'organisme au cours de processus biosynthétiques, (Piquet et Hébuterne, 2007).

Tableau 02 : Mode d'action de quelques antioxydants (Justine, 2005).

| | Nature | Mode d'action |
|-------------------------|--------------------------|--|
| Défense non enzymatique | Vitamine E | Protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant |
| | Vitamine C | Piégeur de radicaux libres marqueur de la consommation de fruits valeur plasmatique basse associée avec l'apparition de diverses pathologies |
| | Beta carotène | Fixation des métaux de transition |
| | Ubiquinone, acide urique | inhibiteur de la peroxydation lipidique implication dans la chaîne respiratoire mitochondriale |
| Défense enzymatique | Superoxyde dismutase | Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde |
| | Catalase | Métabolise H ₂ O ₂ |
| | Glutathion peroxydase | Action réductrice sur H ₂ O ₂ et hydroperoxydes |

I.3.4 Méthodes de détermination de l'activité antioxydant

Il existe une grande diversité de méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité antioxydant des extraits naturels. Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang *et al.*, 2005).

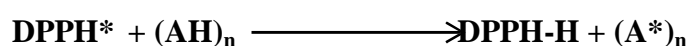
Selon Ozgen *et al.* 2006 il y a plusieurs méthodes spectrophotométriques de détermination de l'activité antioxydant. Les tests courants utilisés à cet effet sont :

- ✓ le test de l'acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS).
- ✓ le test du 2,2-diphényl picrylhydrazyl (DPPH).
- ✓ le test utilisant le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) = ferric reducing antioxidant power.

I.3.4.1 Test du DPPH

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution. Il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picrylhydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno C, 2002).

On peut résumer la réaction sous la forme :



AH : représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picrylhydrazine (jaune) (Brand-Williams *et al.*, 1995).

I.3.4.2 Test d'ABTS

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation $\text{ABTS}^{+\bullet}$, acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (**Figure 02**), qui présente une bande d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm. Le radical est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le dioxyde de manganèse (MnO_2) (Miller *et al.*, 1996), la métmyoglobine (Miller *et al.*, 1993), le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) (Cano *et al.*, 2002) ou le persulfate de potassium (Re *et al.*, 1999). Le composé à tester est ajouté au radical préformé et, 1 minute après, l'absorbance résiduelle du

radical $ABTS^{+\bullet}$ est mesurée à 734 nm. L'activité des composés est exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1 mM du composé testé. Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace (Schlesier *et al.*, 2002).

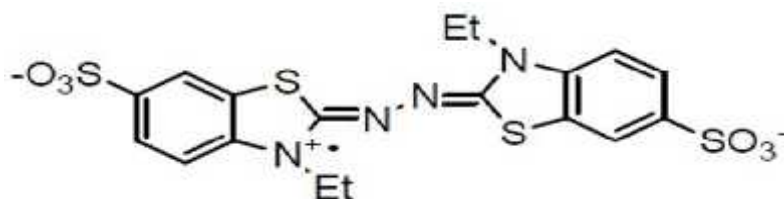


Figure 02 : Structure du radical-cation $ABTS^{+\bullet}$ (Schlesier *et al.*, 2002).

I.3.4.2 Test TPTZ

La réduction des ions ferriques est aussi utilisée pour déterminer le potentiel antioxydant. Le réactif est fraîchement préparé en mélangeant une solution de 10 mM de 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) et de 20 mM de chlorure ferrique dans un tampon acétate (0,25- 0,3 M) à pH = 3,6 dans le rapport 1 / 1 / 10. L'absorbance du mélange (extrait de plante et réactif) est lue à 593 nm après incubation à la température ordinaire. L'activité antioxydante de l'extrait de plante est comparée à celle d'un antioxydant de référence en terme d'équivalence ou en terme d'inhibition (Donatien, 2009).

I.5. Activité antibactérienne

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (Hellal, 2011).

I.5.3 Mécanismes d'action antibactérienne

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et leur spécificité d'action qui peut être germicide ou germistatique.

I.5.3.1. Action germicide

Cette action caractérise les agents ayant une action létale sur les microorganismes. En fonction de la catégorie de microorganismes ciblés, les agents antimicrobiens exercent une action bactéricide (agent antibactérien), algicide (agent anti-algues), fongicide (agent anti-

champignons), virucide (agent anti-virus) ou antiparasitaire (agent anti- protozoaires) (**Bousseboua, 2006**).

I.5.3.2. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique)

Dans ce cas, les agents inhibent la croissance du microorganisme sans le tuer (bactérie ou champignon) (**Bousseboua, 2006**). Les substances bactériostatiques inhibent temporairement le développement microbien, les microorganismes recommenceront à se développer dès que la concentration de la substance aura diminué ou dès que l'application du procédé physique sera interrompue (**Guiraud, 1998**).

I.5.1. Principales substances antimicrobiennes

I.5.1.1. Agents physiques

De nombreux agents physiques exercent un effet antagoniste vis-à-vis des microorganismes. La chaleur ou certains types de radiations ont une action létale qui permet leur emploi dans la stérilisation de différents milieux. D'autres agents moins agressifs, comme la dessiccation limitée sont utilisés à d'autres fins.

Les principaux agents physiques sont la chaleur (humide ou sèche), les radiations (micro-ondes, rayons ultra-violets, rayons gamma, rayons bêta, rayons alpha ; rayons X). Chaque type de radiation a une longueur d'onde spécifique qui détermine son énergie, son mécanisme d'action et son domaine d'application (**Bousseboua 2001**).

I 5 2 1 2 Agents chimiques

Ils correspondent aux substances utilisées comme désinfectants et antiseptiques. Les désinfectants sont des agents antimicrobiens utilisés sur les matériaux inertes ; leur action est létale ou inhibitrice de la croissance microbienne. Les antiseptiques ont la même nature chimique que les désinfectants mais leur toxicité plus réduite permet leur emploi sur les tissus vivants. Les désinfectants et antiseptiques les plus largement employés sont les alcools, les composés phénoliques qui agissent par dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaire, les aldéhydes, les halogènes et les détergents (**Bousseboua 2001**).

Les alcools sont les désinfectants et antiseptiques les plus largement employés, notamment comme désinfectants de la peau. Les composés phénoliques ont une utilisation avantageuse en raison de leur efficacité, de leur persistance dans le temps et de leur insensibilité relative à la présence de matière organique dans le milieu. L'aldéhyde de plus commun est le formaldéhyde, souvent commercialisé en solution à 40% (formol). Les

halogènes sont des composés dérivés du chlore, du brome et de l'iode : hypochlorites et chloramines, hypobromites, iodures, qui ont une action bactéricide par l'oxydation dénaturante des protéines et d'autres composés cellulaires. Les détergents enfin, ont la propriété de solubiliser les résidus normalement peu solubles. Seuls les détergents cationiques sont des désinfectants efficaces (**Guiraud, 1998**).

I 5 2 1 2 Antibiotiques

Les antibiotiques sont définis par Turpin et Velu comme : « Tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutiques élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose, 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 » (**SEDRATI, 2014**).

I.5.1.2. Huiles essentielles

Les HEs sont définies comme étant des extraits volatils et odorants, que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qu'ils les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire, les HEs ont des propriétés et des modes d'utilisations particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (**Bruneton, 1999**).

I 5 2 Autres agents antimicrobiens

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes (**Asada et al., 1998**). Ces substances ayant une affinité pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus fort que les dommages qu'elles causent à l'organisme. Ce qui rendra possible la destruction des parasites sans perturbation sérieuse de l'organisme (**Perry et al., 2002**).

Un agent chimiothérapeutiques est un composé chimique ou de synthèse qui inhibe le développement des microorganismes. Ce composé agit à faibles doses, il exerce une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective. Il inhibe le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensif pour l'hôte. Dans ce groupe, on retrouve les antibiotiques, les antifongiques et les antiviraux (**Guillaume, 2000**).

Il existe actuellement deux grandes catégories d'agents chimiothérapeutiques antibactériens : les sulfamides et les antibiotiques ; ils ont des modes d'action comparables et

se distinguent principalement par leur origine. Les sulfamides sont des produits de synthèse alors que la majorité des antibiotiques sont d'origine naturelle (les plus anciens) d'autres de synthèse ou d'hémisynthèse. Les agents chimiothérapeutiques comprennent cinq groupes selon qu'ils affectent la synthèse de la paroi, les échanges cellulaires, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines ou certaines réactions du métabolisme intermédiaire (Prescott *et al.*, 1995).

I.5.4. Méthodes de détermination de l'activité antibactériennes

On cite souvent ces 02 méthodes car considérées comme fournissant des résultats reproductibles : la méthode de la diffusion en disques et la **méthode de dilution en bouillon et gélose**. La méthode plus utilisée c'est la diffusion en disque.

Les disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé (milieu de Muller-Hinton), préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose, sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration). Après incubation du milieu de culture (18 h à 37 °C), chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des microorganismes s'arrête là où il existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI.

Le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne est mesuré, et la valeur approchée de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée est déduite (l'aire circulaire qui entoure le disque et qui ne montre aucune culture visible, permet de mesurer le diamètre d'inhibition qui indique le degré de sensibilité de la bactérie) (Toudert, 2011).

II. Composés phénoliques

Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Les polyphénols (principalement, flavonoïdes, acides phénoliques, tannins) sont présents dans toutes les parties de la plante (Nkhili, 2009).

Les composés phénoliques ou polyphénols sont caractérisés par un élément structural fondamental qui est le cycle aromatique (benzoïque) portant au moins un groupement hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (Bruneton, 1993 ; Hopkins, 2003). Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes, etc...). Certains d'entre eux sont responsables d'amertume et d'astringence (Hopkins, 2003).

II.1 Structures chimiques et classification

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. La structure de ces composés varie, des molécules simples (acides phénoliques simples) aux molécules hautement polymérisées (tanins condensés). Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relie. On distingue les phénols simples (parmi eux les acides phénoliques), les flavonoïdes, les lignanes, les stilbènes et coumarines (Hopkins, 2003 ; Boros, 2010). En plus de cette diversité, les phénols sont présents naturellement sous forme conjuguée : avec des sucres, des acides organiques, entre eux. Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes (Figures 03).

- ✓ Les phénols simples (C6) : un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C6–C1).
- ✓ Les flavonoïdes (C6-C3–C6): 2 noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.
- ✓ Les tanins hydrolysable et non-hydrolysable.
- ✓ Les stilbènes (C6–C2–C6).
- ✓ Les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phénylpropane.

- ✓ Autres phytoestrogènes
- ✓ Les saponines (triterpénoïdes)
- ✓ Les phytostérols et les phytostanols (**Paraskevi, Moutsatsou, 2007**). Bien qu'ils ne soient pas des polyphénols, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates, qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates (**Dacosta, 2003**).

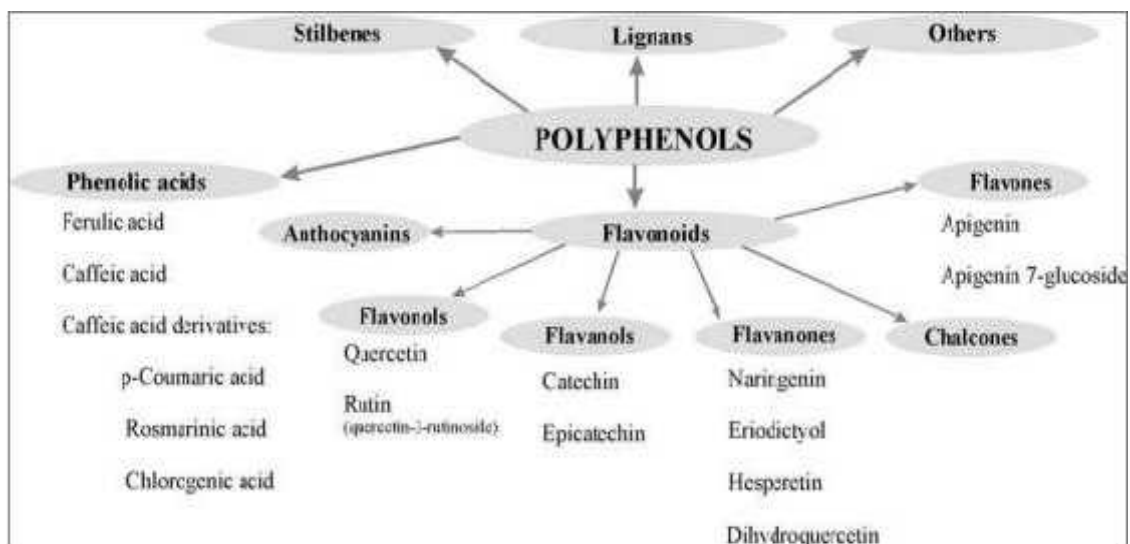


Figure 03 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe. (**Boros et al., 2010**).

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes. Le premier groupe concerne les non flavonoïdes, dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines (**Hoffmann, 2003**). Le deuxième groupe concerne les flavonoïdes, dont, on caractérise principalement : les flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavonones, les anthocyanines, les proanthocyanidines et les flavanols (**Pincemail et al., 2007**).

II.1.1. Non flavonoïdes

II.1.1.1. Acides phénoliques

Ils appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (**Kebbab, 2014**).

- **Les acides hydroxybenzoïques**

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆ - C₁. Ils sont particulièrement représentés chez les gymnospermes et les angiospermes. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides (**Bruneton, 1993 ; Macheix et al., 2005**).

- **Les acides hydroxycinnamiques**

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆ – C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique grâce à des substitutions au niveau du cycle aromatique (**Richeter, 1993 ; Guignard, 1974 ; Psotova et al., 2003**).

II.1.1.2. Stilbènes

Les stilbènes présentent une structure en C₆-C₂-C₆, contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué (**Belkheiri, 2010**).

II.1.1.3. Lignines

La lignine est un polymère fortement ramifié, formés par trois alcools phénoliques simples. Les alcools sont oxydés en radicaux libres par une enzyme ubiquiste chez les plantes, la peroxydase. Les radicaux libres réagissent, ensuite, spontanément et au hasard pour former la lignine. Elle assure la rigidité des parois cellulaires végétales et l'imperméabilité des tissus conducteurs (**Hopkins, 2003**).

II.1.1.4. Lignanés

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C₆-C₃)₂. L'unité (C₆-C₃) est considérée comme un propylbenzène. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs et non caloriques (**Peterson et al., 2010**). Ils ont été défini comme étant les dimères des phénylpropanoïdes où deux unités de phénylpropane C₆-C₃ sont liés par leur carbone 8 (**Sainvitu et al., 2012**).

II.1.1.5. Coumarines

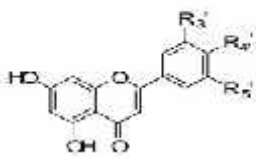
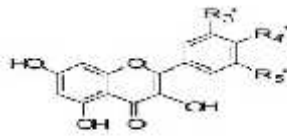
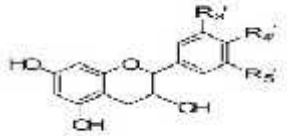
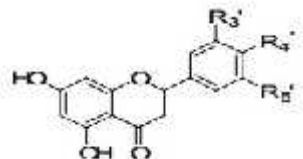
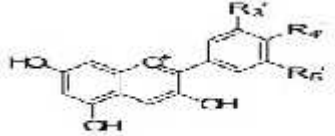
Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés, ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (**Lacy et O'Kennedy, 2004**). La cyclisation de l'acide hydroxy-cinnamique conduit à la formation des coumarines, ils sont très répondeu surtout chez les dicotylédones, notamment dans les racines et dans les écorces (**Hopkins, 2003**).

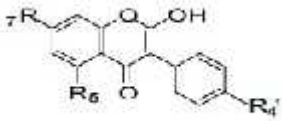
II.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont responsables en particulier de la coloration des fleurs, des fruits et même des feuilles, et ils assureraient aussi la protection des tissus superficiels contre les effets nocifs des rayonnements ultraviolets (**Cartier et Roux, 2007**). Par définition, ce sont les composés qui ont en commun la structure du diphenyl propane C₆-C₃ C₆ (**Tableau 03**) ; les trois carbonés servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment

généralement un hétérocycle oxygéné C (**kone, 2009**). Le squelette originel du groupe est une flavone, dans laquelle la liaison C3 a formé un noyau hétérocyclique pyrane (**Hopkins, 2003**).

Tableau 03 : Principales classes des flavonoïdes (**Narayana et al., 2001**).

| Classes | Structures chimiques | R3 | R4 | R5 | Nom |
|-----------------|---|----|------------------|----|---------------|
| Flavones |  | H | OH | H | Apigénine |
| | | OH | OH | H | Lutéonine |
| | | OH | OCH ₃ | H | Diosmétine |
| Flavonols |  | H | OH | H | Herbacétine |
| | | OH | OH | H | Quercétine |
| | | OH | OH | OH | Myrecétine |
| Flavanols |  | OH | OH | H | Catéchine |
| Flavanones |  | H | OH | H | Naringénine |
| | | OH | OH | H | Eriodictyol |
| Anthocyanidines |  | H | OH | H | Pelargonidine |
| | | OH | OH | H | Cyadinine |
| | | OH | OH | OH | Delphinidine |

| Isoflavones |  | R ₅ | R ₇ | R _{4'} | Nom |
|-------------|---|----------------|----------------|-----------------|------------|
| | | OH | OH | OH | Génistéine |
| | | H | O-Glu | OH | Daidzéine |

II.1.3. Tannins

Les tannins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant, en commun, la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible (**Roux et Catier, 2007**). De masse moléculaire en 500 et 3000 et qui outre les réactions habituelles des phénols, provoquent la précipitation des protéines (**Iserin et al., 2001**). Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Macheix et al., 2005**).

- **Les tanins hydrolysables**

Les tanins hydrolysables sont les tanins galliques et tanins ellagiques. Ils peuvent diminuer la dégradation des parois dans le rumen et être hydrolysés dans l'intestin, en libérant des produits toxiques pour le foie et le rein (**Jarrige et Ruckebusch, 1995**).

- **Les tanins condensés**

Les tanins condensés sont non hydrolysables ou tanins catéchiques. Ils sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigments rouges et, pour cette raison, les formes dimères et oligomères sont dénommées « proanthocyanidines » (**Macheix et al., 2005**). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (**Guignard, 2004**).

II.2 Biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par de deux voies biosynthétiques :

- ✓ celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (**Knaggs, 2003**).

- ✓ celle issue de l'acétate, qui conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphthoquinones (**Bruneton, 1999 ; Naczk, et Shahidi, 2004**).

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

II.4 Rôle et intérêt des composés phénoliques

Les polyphénols sont importants pour la santé. Ce sont des antioxydants qui piègent les radicaux libres toxiques, ainsi ils diminuent le stress oxydatif des cellules, responsable du vieillissement, et réduisent les risques de cancers et de maladies cardio-vasculaires (**Barel, 2009**). Ils ont aussi de nombreuses autres activités biologiques, tels que l'antihistaminique, l'anti-inflammatoire, l'antibactérien, et des activités antivirales (**Rémésy, 2005 ; Perron, 2008**). Ils sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (**Cowan, 1999**). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (**Scalbert, 1991**). Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le **Tableau 04** (**Kebbab, 2014**).

Tableau 04 : Activité biologique de quelque composée phénolique (**Kebbab, 2014**).

| Composés phénoliques | Activité biologique |
|----------------------|--|
| Acides phénols | Antifongique, antioxydante Antibactérienne |
| Tanins | Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, Antidiarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur. |

| | |
|----------------------------------|---|
| Flavonoïdes | Antitumorale, anticarcinogène; anti-inflammatoire, antioxydante; antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur, diurétique. |
| Coumarines | Anticoagulante, antioxydante, protectrice vasculaire et antioedémateuse. |
| Anthocyanes | Protectrices capillaro-veineux, anti oxydant. |
| Proanthocyanidines | Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, antitumoraux, antifongiques et anti-inflammatoires. |
| Tannins galliques et catéchiques | Antioxydantes. |
| Lignanes | Anti-inflammatoires, analgésiques. |

III. *Artemisia herba-alba*

III.1. Genre *Artemisia*

Le genre *Artemisia* est l'un des plus importants de la famille des *Asteraceae*. Il comporte plusieurs espèces en grande partie utilisées pour leurs diverses propriétés médicinales par les pharmacopées locales. Ce genre se trouve essentiellement dans la zone tempérée boréale les régions du monde avec le sud de la possible extension vers les tropiques (Talbi, 2014).

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* sont des arbustes aromatiques, qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, surtout dans les zones semi arides et le bassin méditerranéen. Elles s'étendent jusqu'à l'Himalaya, dans l'hémisphère sud elles sont trouvées en Afrique du sud, l'Australie et l'Amérique du sud, d'après Kyeong (Boudjouref, 2011).

Plusieurs espèces appartiennent à ce genre. On peut citer notamment, *A. herba alba*, *A. keiskeana*, *A. annua*, *A. arborescens*, *A. scoparia*, *A. monospermia*, *A. mongolica*, *A. cina*, *A. vesta*, *A. giraldii*...etc. Les plantes du genre *Artemisia* ont été employées dans la médecine classique en tant que analgésique, hémostatique, antibiotique, pour le traitement des maladies rhumatismales, les inflammations le froid...etc (Messai, 2011). Elles sont utilisées également pour leurs effets antiparasitaires contre les vers ronds, en particulier les ascarides (Younes, 2014), pour le traitement des infections fongiques telles que le Tenea et la grive (Messai, 2011) et comme spasmolytique.

III.2. Présentation de l'espèce *Artemisia herba-alba*

Connue depuis des millénaires, l'*Artemisia herba-alba* (armoise herbe blanche) a été décrite par l'historien grec Xénophon, dès le début du IV^e siècle av. J.-C., dans les steppes de la Mésopotamie. Elle a été répertoriée en 1779 par le botaniste espagnol Ignacio Jordán Claudio de Assoy del Rio. C'est une plante essentiellement fourragère, très appréciée par le bétail comme pasturage d'hiver. Elle présente une odeur caractéristique d'huile de thymol et un goût amer d'où son caractère astringent (Eloukili, 2013).



Figure 04: *Artemisia herba-alba* dans son milieu naturel au début de la saison de fleuraison (Messai, 2011).

III.2.1. Nomenclature et taxonomie

Artemisia est le nom de genre des armoises, il provient de celui de la déesse grecque de la chasse Artémis; *herba-alba* signifie herbe blanche (Messai, 2011).

- **Phylum :** Angiospermeae.
- **Sous Phylum :** Dicotylédones
- **Ordre :** Gampanulatae
- **Famille :** Asteraceae.
- **Sous-famille :** Asterioideae.
- **Tribu :** Anthemideae.
- **Sous-tribu :** Artemisiinae.
- **Genre :** *Artemisia*.
- **Espèce :** *herba-alba*.

Son nom scientifique est *Artemisia herba-alba* asso. ou *Artemisia inculta* del.

III.2.2. Description botanique

Artemisia herba-Alba est une plante herbacée à tiges ligneuses et ramifiées, de 30 à 50 cm, très feuillées avec une souche épaisse. Les feuilles sont petites, sessiles, pubescentes et à aspect argenté. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites (3/1,5mm) et ovoïdes. L'involucre est à bractées imbriquées, les externes orbiculaires et pubescentes. Le réceptacle floral est nu avec 2 à 5 fleurs jaunâtres par capitule toutes hermaphrodites (Eloukili, 2013).

III.2.3. Répartition géographique

Artemisia herba alba est une plante spontanée très répandue en Afrique du nord et au moyen orient, elle affectionne les climats secs et chauds, et existe sous forme de peuplements importants dans les zones désertiques. C'est une plante steppique des régions irano-touraniennes, prédominante dans les steppes d'Espagne ainsi que dans le désert de Sinaï (Segal et al., 1987).

En Algérie, l'*artémisia herba alba*, connue sous le nom de « chih » ou encore appelé semen-contra de barbarie, couvre près de six millions d'hectares dans les steppes, elle se présente sous forme de buissons blancs, laineux et espacés (Eloukili, 2013). Au Maroc, *Artémisia herba alba* se rencontre à l'état spontané, il n'est pas rare de trouver des zones de plusieurs dizaines de kilomètres de rayon où seule l'armoise blanche règne dans un paysage quasi-désertique. Le Maroc attache beaucoup d'importance à cette plante qui constitue un excellent moyen naturel de lutte contre l'érosion et la désertification (Bendjilali et Richard, 1980).

III.2.4. Terpènes de l'*Artemisia herba-alba*

Les terpènes sont des polymères constitués d'unités en C5. Les monoterpènes (en C10) sont des substances légèrement volatiles qui forment les huiles essentielles. Ils protègent les végétaux contre les parasites, inhibent la croissance bactérienne et attirent les animaux pollinisateurs. (Messai, 2011). Les principaux monoterpènes identifiés dans l'*Artemisia herba-alba* sont le thujone (monoterpène lactone), le 1,8-cinéol et le thymol (Duke, 1992). Des monoterpènes alcooliques (yomogi alcool, santoline alcool) ont été mis en évidence. On a aussi identifié des sesquiterpènes (3 unités en C5) et des sesquiterpènes lactones dans plusieurs chémotypes du Moyen-Orient. Le thujone est probablement l'un des constituants terpéniques les plus bioactifs de l'Armoise. Son nom provient de Thuya (*Thuja occidentalis*) plante de laquelle il a été extrait pour la première fois. On l'a identifié également dans d'autres espèces, comme l'Absinthe (*Artemisia absinthium*) et l'Armoise romaine (*Artemisia pontica*). Structurellement lié au menthol, il est constitué d'un cycle en C6 (cyclohexane) avec en plus un groupement exocyclique isopropyl et un groupement lactone. Le thujone est un composé chiral présent à l'état naturel sous forme de deux stéréoisomères : l'alphathujone et le bêta-thujone (Messai, 2011).

III.2.5. Flavonoïdes de l'*Artemisia herba-alba*

Ce sont des composés phénoliques qui contribuent à la pigmentation de la plante. Très ubiquitaires, certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines, métabolites synthétisés par la plante pour lutter contre diverses parasitoses. Les flavonoïdes sont rencontrés à l'état libre (soluble) ou liés à un sucre (glycosides) dans le liquide vacuolaire. La coloration des dérivés dépend des différentes substitutions de l'atome d'hydrogène sur divers cycles, de la formation de complexes avec les ions métalliques (Fe^{3+} , Al^{3+}) et du pH (Lüttge *et al.*, 1992). Les principaux flavonoïdes isolés à partir de l'*Artemisia herba-alba* sont l'hispiduline, la cirsimaritrine. Des flavones glycosides comme la 3-rutinoside-quercétine et l'isovitexine ont été mis en évidence chez des chémotypes du Sinaï (Saleh *et al.*, 1985).

III.3. Intérêt thérapeutique d'*Artemisia herba-alba*

L'*Artemisia herba alba* est très utilisée en médecine traditionnelle lors d'un désordre gastrique tel que la diarrhée et les douleurs abdominales. Elle est aussi utilisée en tant que remède de l'inflammation du tractus gastro-intestinal (Ghrabi et Sand, 2008). Plusieurs études scientifiques ont également prouvées l'efficacité de l'armoise blanche en tant qu'agent antidiabétique, leishmanicide, antiparasitaire, antibactérien, antiviral, antioxydant, antimalarien, antipyrétique, antispasmodique et antihémorragique (Tastekin *et al.*, 2006).

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Echantionnage

Les parties aériennes de l'*Artemisia herba-alba* sauvage ont été récoltée au stade végétatif, en juin 2015 dans la zone de Hammamet (Tébessa) **Figure 05**. Les parties aériennes ont été nettoyées, lavées avec de l'eau du robinet et séchées à l'ombre. Elles ont été ensuite pesées, broyées et récupérées dans des sacs propres. La plante a été collectée, lavée, séchée et conservée par notre collègue GATTOUTE Saliha.



Figure 5 : Carte géographique de la région Hammamet montrant la station de récolte.(google Map).

I.1.2. Identification

L'espèce végétale faisant l'objet de notre étude a été identifié selon **Quezel P et Santa(1963)** par Madame Hioun S Departement des êtres vivants, Faculté des Science Exactes et Sciences de la Nature et de la vie, Université Larbi Tebessi, TEBESSA. Un spécimen a été déposé au laboratoire des biomolécules actives et Applications, Université Larbi
Tebéssi,
TEBESSA.

I.2 Préparation des extraits

I.2.1. Matériel

Le **tableau 05** rapporte les la liste des appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction. Les manipulations ont été conduites au niveau du Laboratoire de recherche sur les molécules bioactives et application appartenant à l'Université de Tébéssa.

Tableau 05 : Liste des appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction.

| Appareils | Verrerie et autres | Réactifs et autres |
|--------------------------------------|-------------------------|--------------------|
| Rotavapeur (BUCHI R 210) | Ampoule à décanter 1 L. | Eau distillée |
| Balance de précision (ALS 286 4N) | Béchers. | Ethanol, méthanol |
| Etuve (Mettler) | Eprouvettes graduées. | Ether de petrol |
| Balance (DHAUS Scout SE) | Entonnoirs. | Éthyle d'acétate |
| | Flacons en verre. | Déchlorométhane |
| | Ecouillons. | |
| | Couton | |
| | Papier aluminium | |
| | Papier absorbant | |
| | Picettes. | |

I.2.2. Extraction par les solvants organiques à polarité croissante

L'extraction a été effectuée par épuisement successif du matériel végétal, en utilisant quatre solvants de polarité croissante : éther de pétrole (EP), dichlorométhane (DCM), éthyle d'acétate (EA) et méthanol (MeOH). Le protocole d'extraction adopté a été élaboré dans le laboratoire de recherche des molécules bioactives et applications par **Dr Zeghib A.** Le calcul des rendements des extraits se fait selon la formule suivante :

$$R (\%) = [PER / PV] \times 100$$

PV : Poids du végétal utilisé (grammes); PER : Poids de l'extrait récupéré (grammes).

I.3. Screening phytochimique

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques (**Selon Harborne, 1998**).

I.3.1. Matériel

Les appareils, la verreries et les produits et solvants utilisés pour l'extraction sont présenté dans le **tableau 06**.

Tableau 06 : Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour le Screening phytochimique.

| Appareil | Verrerie et autres | Réactifs et autres | Solvants et solutés |
|--|-----------------------|---|----------------------|
| Balance (DHAUS Scout SE) | Tubes à vis 16x160mm. | Réactif de Mayer | Ethanol |
| | Papier absorbant | | Eau distillé stérile |
| Bain-marie agitatif (GFL 1083) | Béchers | Acide chlorhydrique HCl | Méthanol |
| Plaque chauffante agitative (IKA RH basic 2) | Fioles | Acide acétique C ₂ H ₄ O ₂ . | Chloroforme |
| Bain de sable (WITEG CAT D 7813 staufen) | Eprouvettes | Acide acétique glacial | Ether de pétrole |
| | Graduées | Acide sulfurique H ₂ SO ₄ | |
| | Entonnoirs | Chlorure ferrique FeCl ₃ | |
| | ErlenMayers | Chlorure de mercure HgCl ₂ | |
| | Flacons en verre | Iodure de potassium KI | |
| | Pipettes en verre | Hydroxyde de sodium NaOH | |
| | Pipettes en plastique | | |
| | Cristallisoirs. | | |
| | Couton | | |
| | Papier aluminium | | |
| Picettes | | | |

I.3.2. Recherches des polyphénols

3..I2.1. Recherche des tannins

I.3.2.1.1. Principe

En présence de Chlorure ferrique à 1% ; les extraits aqueux tanniques donnent des colorations bleu-vert, bleu-sombre et verte ou des précipités.

I.3.2.1.2. Mode opératoire

Cinq gramme (5 g) de matériel végétal sont infusée dans 50 ml d'eau bouillante contenue dans un Erlen Meyer pendant 30 minutes. 2ml de l'infusés sont prélevés et mis dans un tube essai dans lequel on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à 1%. Prendre encore 2 ml de l'infusé et les placer dans un tube à essai saturé en acétate de sodium et y ajouter quelques gouttes de FeCL3. La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques (**Rizk, 1982**).

I.3.2.2. Recherche des leucoanthocyanes

I.3.2.2.1. Principe

En présence de NaOH 1N, de HCl concentré et des coupeaux de Magnésium, on une mise en évidence des flavonoïdes. La même réaction effectuée au bain marie en absence de coupeaux de Magnésium confirme la présence des leucoanthocyanes si la coloration rouge.

I.3.1.2.2. Mode opératoire

Cinq gramme (5 g) de matériel végétal placés dans un Erlen Meyer sont infusées dans 50 ml d'eau distillée pendant 30 minutes. Après filtration, prélever 6 ml d'infusé et les introduire dans 3 tubes à essai à raison de 2 ml par tube. Additionner respectivement à l'infusé contenu dans les 3 tubes à essai, 1 ml de NaOH, 1 ml d'eau distillée et 1 ml de HCL concentré et de coupeaux de Magnésium (**Dohou et al., 2003 ; Luhata et al., 2008**).

I.3.2.3. Recherche des flavonoïdes

Cinq gramme (5 g) de matériel végétal placés dans un Erlen Meyer sont infusées dans 50 ml d'eau distillée pendant 30 minutes. Après filtration, prélever 6 ml d'infusé et les introduire dans 3 tubes à essai à raison de 2 ml par tube, l'un est témoin. Additionner respectivement à l'infusé contenu dans les 2 tubes à essai, 1 ml de NaOH, 1 ml d'eau distillée et 1 ml de HCL concentré (**Dohou et al., 2003 ; Luhata et al., 2008**).

I.3.2.4. Recherche des saponines

I.3.2.4.1. Principe

Par agitation, une mousse persistante dont la hauteur est mesurable apparait dans les solutions de saponines.

I.3.2.4.2. Mode opératoire

Cinq gramme (5 g) de matériel végétal trituré sont mis dans un Erlen Meyer dans lequel on y ajoute 50 ml d'eau distillée pour réaliser une décoction pendant 30 minutes. Après refroidissement, filtrer et prélever 5 ml du décocté et les introduire dans un tube à essai de 16 mm de diamètre et 160mm de hauteur après agitation. L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines (**Luhata et al., 2008 ; Dohou et al., 2003**).

I.3.2.5. Recherche des alcaloïdes

Prendre 1 g de poudre de matériel végétal sèche qu'on met à macérer dans 10 ml de méthanol à la température ambiante pendant 24 heures, puis à l'étuve à 50 °C pendant 4 heures. La solution obtenue est filtrée, lavée avec des portions de méthanol chaud. Ensuite, on évapore à sec la solution obtenue à l'étuve à 50 C. le résidu est recueilli deux fois par 2 ml de solution chaude d'acide chlorhydrique 1% et est filtré. La solution acide obtenue est basifiée par l'ammoniaque concentrée dans une ampoule à décanter. On y ajoute 15 ml de Chloroforme qui sera à l'aire libre et le résidu obtenu, est repris par 0,5 ml de HCL 1%. (**Bouquet, 1972**).

I.3.3.I Recherche des terpenoïdes et des stéroïdesdes

I.3.2.6.1. Principe

En présence de l'acide acétique anhydre et de l'acide sulfurique concentré (réactif de LIEBERMAN-BURCHARD), l'extrait organique étheré contenant les stéroïdes donne des colorations mauves et vertes. L'identification des terpénoïdes suit le même schéma en plus de l'ajout du réactif de Hirschson (acide trichloracétique). La couleur jaune virant au rouge indique la présence de terpénoïdes.

I.3.2.6.2. Mode opératoire

Prendre 5 g de matériel végétal qu'on met à macération pendant 24 heures dans l'éther de pétrole (40ml). Après filtration et introduction dans un Erlen Meyer, le solvant est évaporé au bain de sable à température (0 à 90 C°). Le résedu estdissout dans 0.5ml d'acide acétique (CH₃COOH) et (1 ml) de l'acide sulfurique concentrie. Il se produit une coloration violette devenant progressivement verte. La coloration verte se stabilise au bout de 30 minutes et indique la présence des stéroïdes. Par ailleurs, 2 ml de la solution acidifiée sont traités par quelques gouttes de réactif de HIRSCHSON. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des terpénoïdes.

I.3.2.7. Recherche des quinones

I.3.2.7.1. Principe

En présence de Na OH à 10%, les solutions des quinones présentent une caractéristique rouge violet.

I.3.2.7.2. Mode opératoire

L'ajout du 5 g de matériel végétal et les humecter de quelques gouttes de HCl. Mettre à macération ce matériel végétal pendant une heure ou 24 heures dans un Erlen Meyer ou un bécher et contenant 10 ml d'éther de pétrole. Après filtration, 2 ml de filtrat sont agités avec 2 ml de Na OH à 10%. La coloration rouge virant au violet apparait en présence des quinones. (Dohou *et al.*, 2003 ; Luhata *et al.*, 2008).

I.4. Détermination du taux des composés phénoliques totaux

I.4.1. Matériel

Le **tableau 07** rapporte les la liste des appareils, verreries et produits utilisés pour pour Détermination du taux des composés phénoliques totaux.

Tableau 07 : Liste d'appareils ,verreries et produits utilisés pour Détermination du taux des composés phénoliques totaux.

| Appareil | Verrerie et autres | Réactifs et autres | Solvants et solutes |
|---|---------------------------|---|----------------------------|
| Spectrophotomètre UV-VISIBLE 1700 (PharmaSpec SHIMADZU) | Tubes à hémolyse de 5 ml. | Réactif de Folin-Ciocalteu | Ethanol |
| Balance de précision (ALS 286 4N) | Embouts jaunes et bleus | Acide gallique | Méthanol |
| Plaque chauffante agitative (IKA RH basic 2) | Eprouvettes graduées | Carbonate de sodium Na ₂ CO ₃ | Eau distillée sterile |
| Etuve (Memmert) | Entonnoirs | | Diméthyle sulfoxyde |
| Micropipettes 100-1000µl | Flacons en verre | | |
| Vortex (VWR VV3) | Spatules | | |
| | Portoirs | | |
| | Picettes | | |

I.4.2. Principe

Les polyphénols sont estimés par une méthode effectuée adaptée par **Singleton et Rossi (1965)** avec le réactif de Folin-Ciocalteu (**Marian et Fereidoon, 2004**). Que est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$, qui sont réduits lors de l'oxydation des polyphénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3), ce qui nous aide à doser les polyphénols dans le visible à une longueur d'onde de l'ordre 765 nm.

I.4.3. Mode opératoire

Un volume de 200 μ L des solutions d'extraits : méthanoliques (1mg /ml), DM (0,5 mg/mL) , EA (0.25mg/ml), est ajouté à 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans l'eau distillée), Après 4 mn, 800 μ L d'une solution de carbonates du sodium (75 g de Na_2CO_3 dans 1 litre d'eau distillée) sont ajoutés. Après agitation, l'ensemble est incubé à l'ombre pendant 2 heures, puis la lecture est faite à 765 nm par un spectrophotomètre UV.

L'acide gallique (00-200 μ g/mL) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage, à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée (**Li et al., 2007**). Répéter les opérations en triplicata pour chaque expérience.

I.4.4. Méthode de calcul

La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($y = 0,0095 x - 0,0103$). Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EqAG/mg d'extrait) et selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type (SD).

I.5. Tests par CCM (Chromatographie sur Couche Mince)

I.5.1. Matériel

Les appareils, la verreries et les produits et solvants utilisés pour CCM sont présentés dans le **tableau 08**.

Tableau 08 : liste d'appareils ,verreries et produits utilisés pour CCM.

| Appareil | Verrerie et autres | Réactifs et autres | Solvants et solutes |
|--|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| sèche-cheveux | Tubes à hémolyse de 5 ml. | 2.2 diphényl-1 picrylhydrazyl (DPPH) | Ethanol |
| Balance de précision (ALS 286 4N) | Crayon | | Méthanol |
| lampe UV | Règle | | |
| Micropipettes 100-1000µl (LaborgerateGmbH) | Embouts jaunes et bleus | | |
| | plaque de silice : (20×20cm, 60F254). | | |
| Micropipettes 5-50µl (SPINREACT A050804) | Portoirs | | |
| Vortex (VWR VV3) | | | |

I.5.2. Principe

Il s'agit de déposer des extraits, fractions ou produits purs à tester, sur des plaques CCM de gel de silice en aluminium et développées dans le système approprié. après séchage, les plaques CCM sont giclées avec une solution méthanolique. Des activités antiradicalaires apparaissent sous forme de spots de couleur jaune-blanc sur fond violet (**Cowan, 1999**)

I.5.3. Mode opératoire

Nous avons dissous 1 mg des extraits dans 1ml de solvant approprié.

- ✓ l'extrait EP dans le mélange MeOH-EP
- ✓ l'extrait DCM dans le mélange DMSO-MeOH
- ✓ l'extrait AE dans le mélange éthanol-AE
- ✓ l'extrait MeOH dans du MeOH

Les dépôts ont été faits sur la plaque de CCM avec une capillaire. Nous avons déposé 250 µl de la solution de chaque extrait sur la plaque CCM de gel de silice en aluminium et développées dans le système approprié. Après Séchée, la plaque CCM est giclée avec une solution méyhanolique à 2 mg/ml de DPPH.

I.5.4. Lecture

Les zones d'activités ont été déterminées par l'apparition d'une coloration jaune sur fond violet.

I.6. Tests d'activités biologiques

I.6.1. Détermination de l'activité antioxydant (Test d'activité anti DPPH)

I.I.a.a..1.1.6.I

Matériel destiné à la réalisation de l'activité antioxydant sont présenté dans le **tableau 09**.

Tableau 09 : liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour Détermination de l'activité antioxydant (Test d'activité anti DPPH).

| Appareil | Verrerie et autres | Réactifs et autres | Solvants et solutes |
|---|---------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Spectrophotomètre UV-VISIBLE 1700 (PharmaSpec SHIMADZU) | tubes à hémolyse de 5 ml. | 2.2 diphényl-1 picrylhydrazyl (DPPH) | Ethanol |
| Balance de précision (ALS 286 4N) | Béchers | | Méthanol |
| Plaque chauffante agitative (IKA RH basic 2) | Eprouvettes graduées | | |
| Etuve(HeraeusTyp 5042) | Embouts jaunes et bleus | | |
| | Entonnoirs | | |
| Micropipettes100-1000µl (LaborgerateGmbH) | Flacons en verre | | |
| Micropipettes 5-50µl (SPINREACT A050804) | Portoirs | | |
| Vortex (VWR VV3) | Spatules | | |
| | Vaporisateur | | |
| | Plaques CCM | | |
| | Papier absorbant | | |
| | Papier aluminium | | |

I.6.1.2. Principe

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant, peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm, provoquée par la présence des extraits (Wu, 2007). Le DPPH, initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie :



AH : représente un composé capable de céder un H au radical DPPH(violet) pour le transformer en diphényle picrylhydrazine (jaune) (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres, indépendamment de toutes activités enzymatiques. Dans ce test, le substrat est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydant, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm. Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu éthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé car il est rapide, facile et non couteux (Figure 06) (Hadbaoui, 2012).

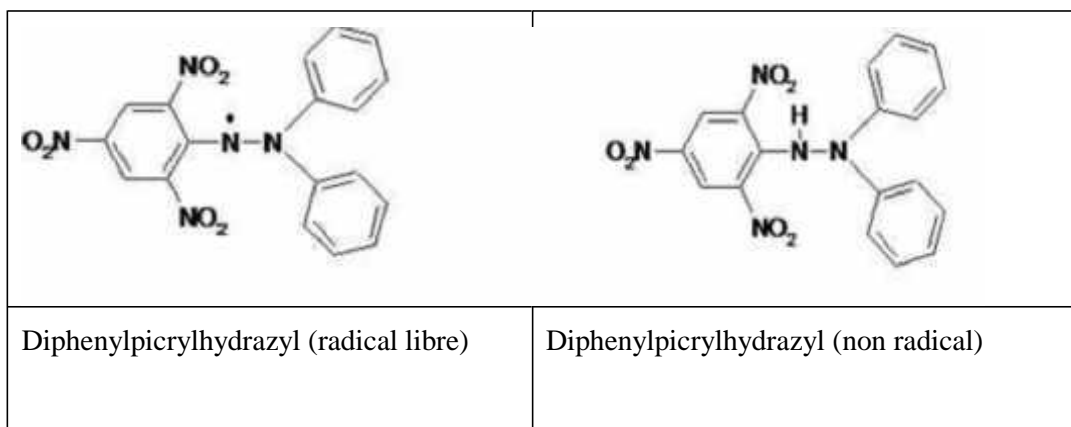


Figure 06: Forme libre et réduite du DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995).

I.6.1.3. Mode opératoire

La méthode est réalisée par un test antiradicalaire contre le DPPH mesuré au spectrophotomètre selon le protocole de Shimada *et al.* (1992), légèrement modifié. Des dilutions en cascade des solutions mères de 5 mg/mL de chaque extrait de l'*Artimisia herba alba* a été réalisée. La solution DPPH est préparé à l'avance au moins 1 à 2 h car sa solubilisation est difficile.

Une solution méthanolique de 3 mL de DPPH (3,94 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol) est mise dans un tube à essai sec et stérile. Par la suite, 100 µL de chaque concentration des extraits : E-AE et E-MeOH sont ajoutés. Le mélange est vigoureusement agité pendant 30 secondes à l'aide du vortex. Après une incubation pendant 30 mn à l'abri de la lumière et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc, qui contient 100 µL de méthanol et 3 mL de solution DPPH. Les opérations ont été répétées en triplicata pour chaque expériences.

I.6.1.4. Méthode de calcul

L'évaluation de l'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

Abs_{blanc} : Absorbance du blanc, **Abs_{extrait}** : Absorbance de l'extrait.

Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues ± l'écart type (SD). La concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50 % de la forme réduite du radical DPPH (CI50), est également déterminée.

I.6.2. Détermination de l'activité antibactérienne (diffusion en milieu gélosé)

I.6.1.2. Matériel

Matériel destiné à la réalisation de l'activité antibactérienne sont présenté dans le **tableau 10**.

Tableau 10 Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour. Détermination de l'activité antibactérienne (diffusion en milieu gélosé).

| Appareil | Verrerie et autres | Réactifs et autres | Solvants et solutes |
|--|-------------------------|------------------------------------|---------------------|
| Balance de précision (ALS 286 4N) | Tubes à vis 16x160mm. | Tween 20 | Ethanol. |
| Plaque chauffante agitative (IKA RH basic 2) | Embouts jaunes et bleus | Milieu solide Mueller-Hinton (MH). | Méthanol |

| | | | |
|--|----------------------|------------------------|---------------------------|
| Microscope optique (OPTICA AXIOM 2000) | Eprouvettes graduées | Gélose nutritive | Eau distillée sterile |
| Etuve (DLAB TECH DAI HAN co LTD) | Entonnoirs | Bouillon nutritif (BN) | Eau physiologique stérile |
| Etuve (HeraeusTyp 5042) | Ecouvillons | Violet de gentian | |
| Bec bunzen | Pipettes Pasteur | Lugol | |
| Micropipettes 100-1000µl (LaborgerateGmbH) | Boîtes de Pétri | Fushine | |
| Micropipettes 5-50µl (SPINREACT A050804) | Cristallisoirs | | |
| Vortex(VWR VV3) | Papier aluminium | | |
| | Papier absorbant | | |

I.6.2.2. Principe

Les diamètres des zones d'inhibition (DZI) ont été déterminés *in vitro* sur différentes bactéries, selon la méthode de diffusion en milieu solide sur milieu gélose de Mueller Hinton, telle que décrite par **Kirby-Bauer *et al.* (1966)** et reprise par **Kechkar (2008)**.

I.6.2.3. Bactéries d'étude

La souche bactérienne ATCC (American Type Culture Collection), nous ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie, université Badji Mokhtar, ANNABA. Il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 que nous avons conservé à 4 C° dans des tubes à vis contenant de la gélose nutritive inclinée.

Le germe *Pseudomonas* appartient à la famille des Pseudomonadaceae. Bacille à Gram négatif, aérobie, aspérulé très mobile par un ou plusieurs flagelles polaires. Il s'agit de bactéries d'altération ou pathogènes (parfois même redoutable ou mortelle). *Pseudomonas aeruginosa* est capable de pousser à des températures entre 4-42 C° (**Figure 07**) (**Mann *et al.*, 2000**).

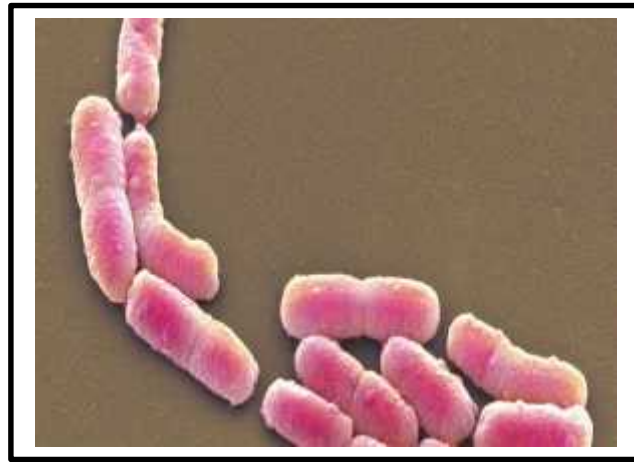


Figure 07 : *Pseudomonas aeruginosa* au microscope électronique à balayage (Mann *et al.*, 2000).

I.6.2.4. Coloration de Gram

La pureté des bactéries d'étude a été confirmée par la coloration de Gram.

I.6.2.4.1. Principe

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries Gram positif (+) et les bactéries Gram négatif (-). Elle doit son nom au bactériologiste Danois Hans Christian Gram qui a mis au point le protocole en 1884. C'est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale. Elle permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu, tant sur le type que sur la forme (Beveridge, 1990).

I.6.2.4.2. Mode opératoire

I.6.2.4.2.1. Préparation et fixation du frottis microbien

Un ensemencement d'une colonie de la souche à analyser est fait par une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame de verre propre. Le frottis obtenu est séché à proximité de la flamme d'un bec Bunsen, puis fixé par des passages rapides de la lame sur la même flamme.

I.6.2.4.2.2. Coloration

La préparation est recouverte de colorant (bleu de gentiane) et laissée en contact avec ce dernier pendant 1 mn. Après rinçage à l'eau de robinet, la lame est recouverte

d'une solution de lugol (1 %) pendant 1 mn, puis décolorée avec de l'éthanol durant 1 mn. Après rinçage à l'eau de robinet, la lame est recolorée par la fushine pendant 1 mn. La préparation est de nouveau lavée à l'eau de robinet, puis séchée entre deux couches de papier buvard. Elle est finalement recouverte d'une goutte d'huile d'immersion et observée sous microscope optique au grossissement x 100.

- Les microorganismes Gram (+) apparaissent violets.
- Les microorganismes Gram (-) apparaissent roses.

I.6.2.5. Préparation des inoculums

I.6.2.5.1. Enrichissement

Une colonie bien séparée et uniforme de l'espèce bactérienne concernée a été prélevées à l'aide d'une anse de platine pour être homogénéisée dans 5 mL de bouillon nutritif (25 g de BN dans un litre d'eau distillée stérile), puis portées à l'incubation pendant 18-24 h à 37°C dans l'étuve a été réalisée en double cette expérimentation.

I.6.2.5.2. Préparation de la suspension bactérienne

Pour la souche bactérienne enrichie dans le BN, un volume 500 µL de la suspension bactérienne a été mis dans 5 mL d'eau physiologique stérile, puis porté à incubation pendant 18-24 h à 37°C.

I.6.2.5.3. Ensemencement / Test antibactérien

Mettre 13 mL de la gélose MH dans chaque boîte de pétri (épaisseur de 5 mm) et laisser sécher pendant 15 mn à température ambiante de laboratoire, dans la zone stérile du bec bunsen. A l'aide d'un écouvillon stérile, ensemenecer, sous forme de stries serrées, la bactérie d'étude. Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boites de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois. Ensuite, inonder la surface de la gélose avec 1 mL de la suspension bactérienne et laisser pendant 15 mn à température ambiante. Par la suite, éliminer l'excès de la suspension bactérienne.

Creuser trois puits (diamètre 6 mm) dans chaque boîte de pétri, à l'aide d'une pipette pasteur stérile, dans lesquels 15 µL d'extrait d'étude (10 mg/mL) sont introduits. Laisser à température ambiante, pendant 30 mn, pour la prédiffusion et incuber pendant 18-24 h à 37 °C dans l'étuve. Les essais ont été effectués en triplicata pour chaque extrait, vis-à-vis d'une bactérie donnée, pour deux expériences.

Remarque : La paillasse de travail ainsi que les mains du manipulateur sont nettoyées préalablement à l'alcool. Quant aux manipulations, elles sont effectuées autour de la flamme de bec Bunsen.

I.6.2.7.4. lecture

L'apparition d'une zone claire autour des puits (à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée), indique l'action antibactérienne de l'extrait de la plante vis-à-vis la souche bactérienne testée. Les diamètres sont mesurés à l'aide d'une règle graduée. Les résultats obtenus sont exprimés en millimètre. Les bactéries seront classées selon le diamètre d'inhibition dans l'une des catégories suivantes : résistance, sensibilité limitée, sensibilité moyenne et très sensible (**Duraffourd et Lapraz, 2002**) comme le montre le **Tableau 11**.

Tableau 11: Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition (**Duraffourd et Lapraz, 2002**).

| Diamètre du halo d'inhibition (X) | Degré de sensibilité des germes | Résultat |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------|
| X \geq 8 mm | Résistante | - |
| 8 mm < X < 14 mm | Sensibilité limitée | + |
| 14 mm < X < 20mm | Sensibilité moyenne | ++ |
| X \geq 20 mm | Très sensible | +++ |

I.7. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

I.7.1. Matériel

Le matériel utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme est le même que celui utilisé dans l'étude de l'activité antibactérienne (paragraphe VI.1.2.) présenté dans le **Tableau 11**. Les antibiotiques testés sont : la Ticaracilline + acide clavulanique, la Ceftazidime, la Gentamycine, l'Amikacine, la Colistine, la Aztreonam, l'Ampicilline et la Ceftaxime.

I.7.2. Principe

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard de souches utilisées et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

I.7.3. Mode opératoire

L'antibiogramme est réalisé sur la bactérie sensible à nos extraits d'étude : *Pseudomona aeruginosa*. Les quantités d'antibiotiques utilisés sont : Ticaracilline + acide clavulanique 85 µg, Ceftazidime 30 µg, Gentamycine 10 µg, Amikacine 30 µg, Colistine 10 µg, Aztreonam 30 µg, Ampicilline 10 µg et Ceftaxime 30 µg. Déposer les disques d'antibiotiques dans des boîtes de pétri contenant 13 mL de milieu de MH gélifié,ensemencée avec la bactérie d'étude. Incuber pendant 18-24 h à 37°C dans l'étuve.

Les résultats obtenus sont exprimés en millimètre (diamètres des zones d'inhibition). Les essais ont été effectués en deux expériences pour chaque antibiotique. Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type (SD).

I.8. Analyse statistique des données

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm SD. Les valeurs PI sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Pour tester les différences entre ces moyennes, nous avons utilisé le test ANOVA à un seul facteur suivi le test de Tukey pour la comparaison entre les extraits de *l'Artemisia herba-alba* elles-mêmes.

Concernant résultats relatifs au dosage des polyphénols totaux, les moyennes ont été test comparées à l'aide du test de student.

Ces différents calculs ont été réalisés sur le logiciel de MINITAB 17.

II. Résultats et Discussion

II.1. Rendement de l'extraction

L'extraction de plante de l'*Artemisia herba alba* a été faite à l'aide de la méthode de macération à froid. La série d'extraction a permis d'obtenir quatre extraits organiques (extraits bruts) : E-EP, E-DCM, E-AE et E-MeOH. Chaque extrait a été caractérisé par un aspect et une couleur appropriés (Tableau 12).

Tableau 12: Aspect et couleur des quatre extraits d'*Artemisia hrba alba*.

| Extrait | Aspect | Couleur |
|---------|---------------|--------------|
| EP | Pâte collante | Vert clair |
| DM | Pâteux | Vert foncé |
| AE | solide | noir |
| MeOH | Pâteux | Marron clair |

Le diagramme présenté dans le figure 08 montre le rendement de chacun des quatre extraits d'*Artemisia herba alba* par rapport à 25g de matière sèche.

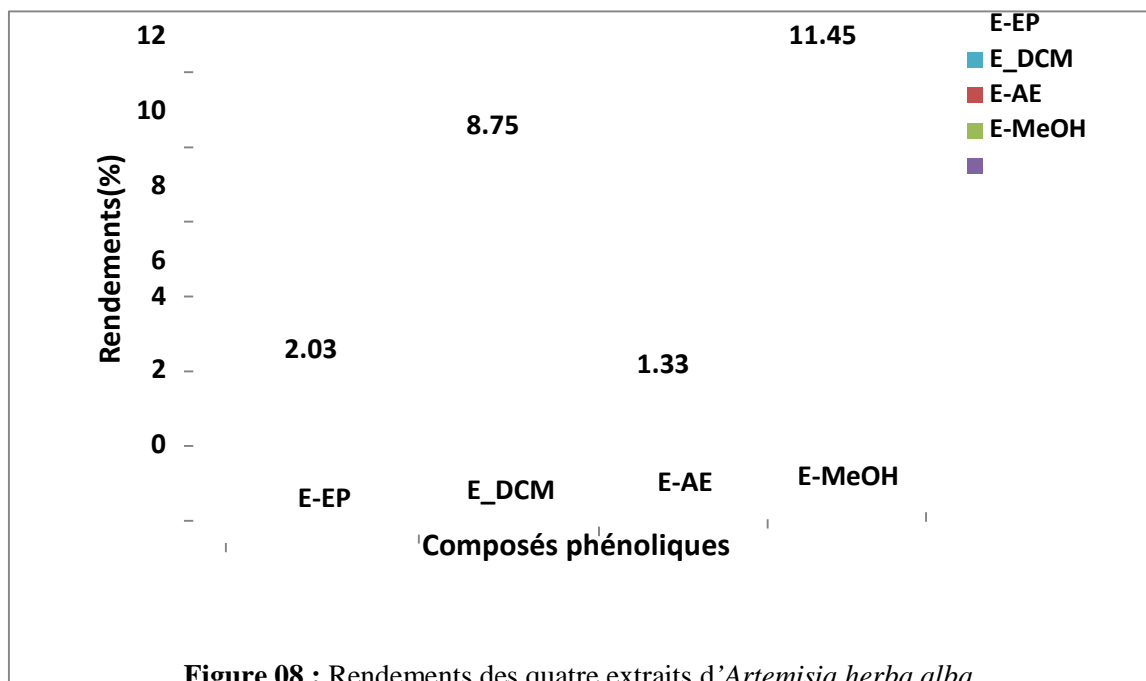


Figure 08 : Rendements des quatre extraits d'*Artemisia herba alba*.

Les résultats montrent que l'extrait méthanolique représente le rendement le plus élevé (11,45 %) suivi par l'extrait dichlorométhane (8,75 %), puis de l'extrait étheré de pétrole (2,03 %). Le rendement le plus faible a été obtenu par l'extrait d'acétate d'éthyle (1,33 %). Selon la littérature :

Ether de pétrole (EP) : élimine les pigments chlorophylliens, caroténoïdes et les lipides ; tous composés non phénoliques (**Bellebcir, 2008**).

Dichlorométhane (DCM) : ce solvant va entraîner essentiellement le reste des flavonoïde et six lactones sesquiterpéniques (**Boriky et Driss, 2015**).

Acétate d'éthyle (AE) : cette extraction entraîne les flavonoïdes mono-o-glucosides et partiellement les di-o-glucosides (**Bellebcir, 2008**).

D'autres auteurs ont montré que le méthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les antioxydants d'une plante (**Sun et al., 2007**). Dans une étude faite sur *l'Artemisia campestris*, (**Boudjouref, 2011**) ont déterminé le rendement des composés phénoliques d'un extrait d'acétate d'éthyle. Ils ont trouvé que le rendement est de 2,26%. Ce rendement est relativement faible. Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en phénols et flavonoïdes (**Lee et al., 2003**).

II.2. Screening phytochimique

Les résultats du screening phytochimique de la plante d'étude sont consignés dans le **Tableau 13**. Les essais phytochimiques effectués sur les solutions de la plante ont révélé la présence des Saponines, des Flavonoïdes, des Tannins et des Terpenoïdes. Les tests des recherches des Quinons, des Leucoanthocyanes et des Alcaloïdes ont été négatifs. Le screening photochimique sur les sept principes actifs testés a mis en évidence la présence de 4 sur 7 pour la plante. Ces résultats sont en accord avec le dépistage phytochimique qualitatif de la plante d'*Artemisia herba alba* réalisé par **Khiredine (2012)**. La présence de la plupart des composés phénoliques montre *A .herba alba* comme étant une plante assez diversifiée chimiquement faisant d'elle une source médicinale non négligeable.

Tableau 13: le screening phytochimique des principaux principes actifs chez l'*Artemisia herba alba*.

| Principes actifs | Présence/Absence | Couleur ou autre indicateur de présence |
|------------------|------------------|---|
| Saponine | + | L'apparition d'un mousse |
| Flavonoïde | +++ | Jaune rougeâtre |
| Leucoanthocyane | - | Absence couleur rouge |
| Alcaloïde | - | Aucune précipitation |
| Quinon | - | Absence couleur violet |
| Tannins | +++ | Bleu noir |
| Terpenoïde | ++ | Anneau gris |

(+++): Fortement présent, (++) : Moyennement présent, (+) : Faiblement présent, (-) : teste négatif.

II.3. Dosage des phénols totaux

La spectrophotométrie UV. a permis de quantifier le taux des polyphénols présents dans les extraits préparés de notre plante. La courbe d'étalonnage (**Figure 09**) établie à l'aide de différentes concentrations de l'acide gallique à partir d'une solution mère, nous a permis d'estimer la teneur en composés phénoliques de chacun des extraits. Elle a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en μg équivalent en acide gallique par mg de l'extrait brut ($\mu\text{gEAG}/\text{mg}$ d'extrait). Les résultats obtenus sont représentés sur **le Tableau 14**

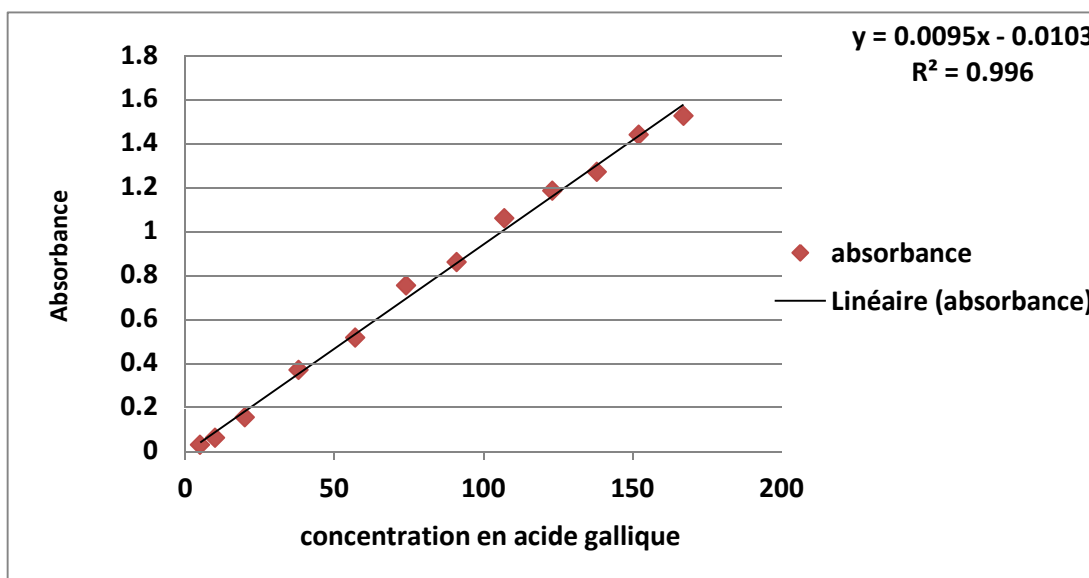


Figure 09: courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

Tableau 14 : Teneur des polyphénols totaux (en μg EAG/mg d'extrait) des quatre extrait du espèce *herba alba*

| Extrait | Teneur en polyphénols totaux |
|---------|------------------------------|
| EP | 27.22 ± 6.84^a |
| DCM | 90.55 ± 29.12^a |
| AE | 334.79 ± 3.47^b |
| MeOH | 227.08 ± 22.82^b |

EP : Ether de pétrol ; DM : Dichlorométhane ; AE : Acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol

a, b : Les moyennes affectées par des lettres différentes dans la même colonne signifie un résultats significativement différent (**P = 0,001**).

Le dosage des polyphénols totaux est fait par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est considérée comme la meilleure pour déterminer les taux des polyphénols totaux dans les extraits de plantes (**Djeridane et al., 2010**). Les résultats du dosage des polyphénols totaux, montrent que l'extrait acétat d'éthyle a présenté la plus grande teneur en composés phénoliques ($334,8 \pm 3,5 \mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait). Les extraits méthanoliques et dichloro méthane contiennent un taux plus faible ($227,1 \pm 22.,8$ et $90,6 \pm 29.1 \mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait, respectivement). Enfin, l'extrait éthere de petrole ne contient que $27,2 \pm 6,8 \mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait.

Dans une étude faite sur l'*Artemisia campestris*, (**Boudjouref, 2011**) ont déterminé la teneur en polyphénols totaux de la partie aérienne d'un extrait d'acétate d'éthyle. Ils ont trouvé que la teneur des polyphénols totaux est de 91 mg EAC/g , cette teneur est relativement faible par rapport à la nôtre. Le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques (**Falleh et al., 2008**). En plus, la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee et al., 2003**).

II.4. Activité antioxydante

II.4.1. Tests par CCM (Chromatographie sur couche mince)

L'activité antiradicalaire des composés phénoliques d'*Artemisia herba alba* a été évaluée qualitativement par le test DPPH en utilisant la chromatographie sur couche mince de silice. Les résultats sont illustrés dans les photos ci-dessous :



Photo 01: Résultats du Test DPPH-CCM sur des concentrations d'extraits et des spots non déterminés.



Photo 02: Résultats du Test DPPH-CCM sur des concentrations de 1mg/ml d'extraits et des spots de 250 µl.

Dans le test préliminaire (photos 1) où les concentrations d'extraits et des spots n'ont pas été déterminés, les résultats montrent un potentiel antioxydants très évident dans l'extrait MeOH suivi par celui d'AE, puis celui du DCM et d'EP. Dans le deuxième test, où nous avons défini les concentrations d'extrait à 1mg/ml et le volume des spots à 250µl; les résultats montrent un effet plus apparent dans les extrait de MeOH et d'AE.

II.4.2. Détermination des pourcentages d'inhibition

Les résultats montrent que l'extrait MeOH du *A. herba alba* a présenté l'activité antiradicalaire la plus élevée (93,84%), suivie par l'extrait AE avec une activité de 89,69% (tableau / figure). La différence est très hatement significative ($p=0,001$). Cette activité pourrait être liée à la richesse de ces deux extraits en polyphénols. En effet, **Kang et al (2003)** ont suggéré que les extraits des végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité antiradicalaire plus élevée.

Tableau 15 : L'activité antiradicalaire contre le DPPH des extraits méthanolique et acétate d'éthyle d'*Artemisia herba alba*..

| Extrait | Pourcentage | Valeur p |
|---------|---------------------------|-----------|
| E-AE | 89.69 ± 0.25 ^a | 0.001 *** |
| E-MeOH | 93.84 ± 0.31 ^b | |

(***) : Très hautement significatif.

AE : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol

a, b : Les moyennes affectées par des lettres différentes dans la même colonne signifie un résultats statistiquement très hautement significatif (p=0.001)

Dans une étude faite sur l'*Artemisia campestris*, (Boudjouref, 2011) ont rapporté une valeur activité antiradicalaire de l'extrait AE très proche à celle trouvée dans cette étude (89,32%). Selon (Turkmen *et al.*,2007) les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur structure chimique idéale. En revanche, Lopes-Lutz *et al.*, (2008) ont confirmé dans une étude faite sur quelques espèces d'*Artemisia* que une activité antioxydante faible.

II.5. Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne d'extraits :étudiés est testée vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, via la méthode de diffusion sur gélose.

II.5.1. Résultats de la coloration Gram

La pureté de la bactérie qui a servi pour ces expériences, a été vérifiée par la coloration de Gram. Ces caractères morphologiques sont résumés dans le **Tableau 16**.

Tableau 16 : Caractères morphologiques de *Pseudomonas aeruginosa* utilisée comme germes-tests.

| Nom de la bactérie | Morphologie | Couleur | Gram |
|--|-------------|---------|------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Bacille | Rose | - |

Selon le résultat obtenu, la bactérie étudiée est gram négatif.

II.6.2. Sensibilité *Pseudomonas aeruginosa* aux extraits d'étude

Les résultats révèlent que les quatre extraits d'espèces de l'*Artemisia herba alba*, exercent un effet antibactérien considérable sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition. **Tableau 17.**

Tableau 17 : Diamètres des Zones d'Inhibition(mm) de la Croissance Bactérienne par les extraits d'étude:

| Bactéries d'étude | EP | DM | AE | MeOH |
|--|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | TEST 1 (24h) | | | |
| | 18.53±2.71 ++ | 22.36±2.17 +++ | 19.33±2.24 ++ | 17.06±0.58 ++ |
| | TEST 2 (48h) | | | |
| | 22.01±1.49 +++ | 22.98±0.51 +++ | 22.03±2.29 +++ | 22.85±2.52 +++ |

(++) : Sensibilité moyenne, (+++) : Très sensible.

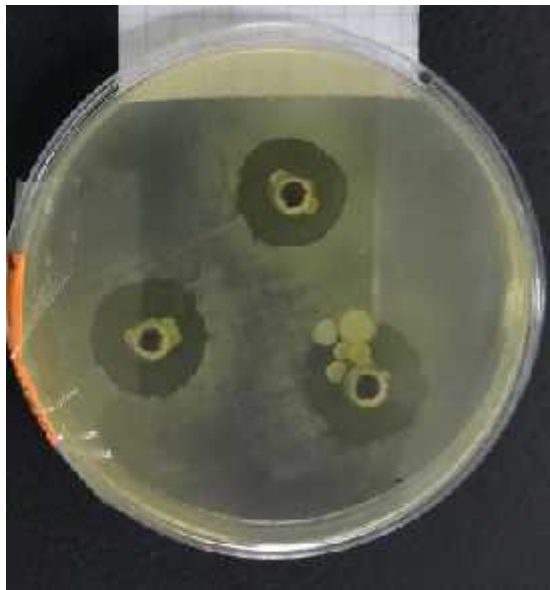
Les résultats montrent que les quatre extraits d'espèces *herba alba*, possèdent un effet inhibiteur considérable sur *Pseudomonas aeruginosa* mais pas identique (Figure 11). En effet, les résultats obtenus avec ces deux tests, montrent que dans une test 1 *Pseudomonas aeruginosa* présente une sensibilité moyenne vis-à-vis des extraits éthere de petrole, acétate d'éthyle et méthanolique alors que très sensible pour l'extrait dichlorométhane tandis que perésente pour test 2 une sensibilité très élevé pour tous les extraits

Selon (Rojas *et al.*, 1992), les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne. Ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les triterpenoïdes. Le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques. Contrairement à nos résultats, Talbi (2014) ont montré, dans une étude faite sur l'*Artemisia campestris*, que *Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance pour son extrait méthanolique



Extrait EP

Extrait DCM



Extrait AE

Extrait MeOH

Figure 10 : Effet inhibiteur de quatre extraits d'espèce *herba alba* sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

EP : éthère de petrole, DCM : dichlorométhane, AE : acétate d'éthyle, MeOH : méthanole.

II.6.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques (Figures 11). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a montré des sensibilités différentes aux antibiotiques testés.

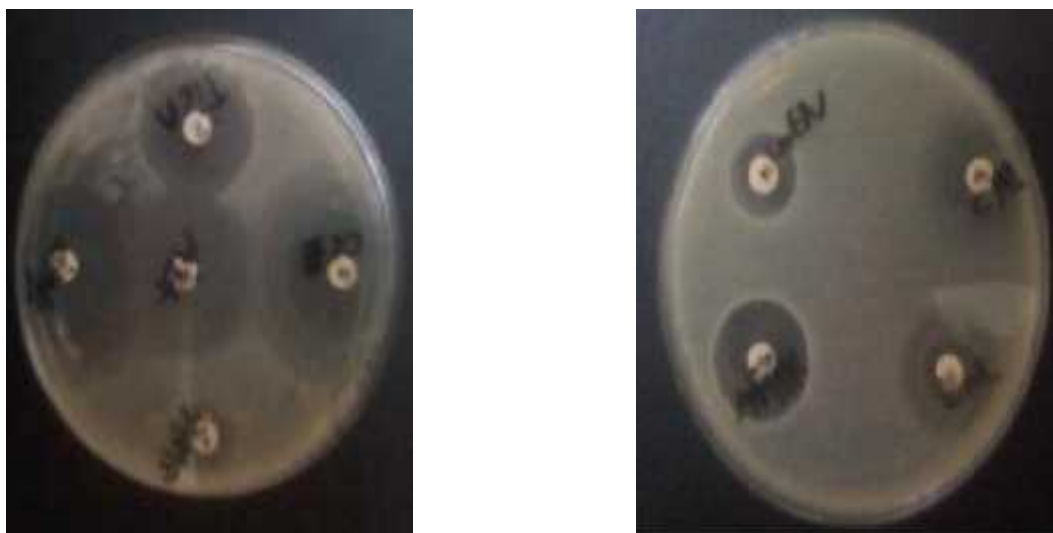


Figure 11 : Effet inhibiteur des antibiotiques sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

(Abidat et Mebarki, 2015)

Le Tableau 18 reporte les valeurs (mm) des diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques rapportés sensibles pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Tableau 18 : Antibiogramme des bactéries sensibles aux extraits d'étude, étudiées en présence des différents antibiotiques. (Abidat et Mebarki, 2015)

| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Zones d'inhibition (mm) | | | | | | | |
|---|-------------------------|-----------------------|----------------------|------------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| | GNT | AMI | TCC | CS | ATM | AMP | CTX | CAZ |
| | 15 ± 0.00 (++) | 22.25 ± 0.35 (+++) | 27.5 ± 0.35 (+++) | 13 ± 0.00 (+) | 30 ± 0.00 (+++) | 15.13 ± 0.18 (++) | 30 ± 0.00 (+++) | 24 ± 0.00 (+++) |

(+) : Sensibilité limitée ; (++) : Sensibilité moyenne ; (+++) : Très sensible.

GNT : Gentamycine ; AMI : Amikacine ; TCC : Ticaracilline + acide clavulanique ;

CS : Colistine ; ATM : Aztreonam ; AMP : Ampicilline ; CTX : Cefotaxime ; CAZ : Ceftazidime.

Résultat et discussion

Pour pouvoir faire une comparaison entre l'activité antibactérienne de nos extraits d'étude et celle de quelques antibiotiques connus agir fortement contre ces bactéries, nous avons trouvé que les effets antibactériens des extraits EP, DM, AE et MeOH vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont d'une part, semblables à ceux de la Ticaracilline + acide clavulanique, Ceftazidime, Amikacine, Aztreonam et Ceftaxime et d'autre part, sont plus meilleurs que ceux de Gentamycine, Colistine et Ampicilline

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'un antibiotique à un autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antibactérienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques. L'extrait méthanolique est un ensemble de plusieurs molécules chimiques, mais, l'antibiotique est une seule molécule. La quantité d'extrait mise (10 mg/mL) dans les puits pourrait être à l'origine de ces résultats.

Dans les années 1990, Muanza et ses collaborateurs ont recherché des extraits de plantes potentiellement bioactifs contre les bactéries et les moisissures (**Muanza, 1994 et Muanza 1995**). Nous constatons que l'inhibition de la croissance bactérienne dépend de deux facteurs : la bactérie utilisée et la nature du produit testé.

Conclusion

Ce travail a été mené dans l'objectif d'étudier l'activité antioxydante et antibactérienne d'extrait d'*Artemisia herba alba* dans le but de sa valorisation. Les études phytochimiques ont révélé la présence de nombreux composés tels que les tannins, flavonoïdes, saponosides, stérols et triterpènes. Les extraits méthanol et acétat d'ethyle, sont riches en composés polyphénoliques.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH, a révélé un pouvoir antioxydant important des extraits méthanolique et d'acétat d'ethyle (93,84 et 89,69 % respectivement). Les résultats montrent également que les quatre extraits d'espèces *herba alba*, possèdent un effet inhibiteur considérable sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 comparable à l'effet de 05 antibiotiques reconnus.

Ces résultats soulignent l'activité intéressante des extraits d'*Artemisia herba alba*, justifiant son utilisation dans la médecine traditionnelle. La présente étude peut être améliorée par l'accomplissement d'autres recherches futures portant notamment sur :

- ✓ L'isolement et l'identification des molécules bioactives responsables des activités observées dans cette étude, par des techniques chromatographiques et spectrales.
- ✓ Elargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* par d'autres tests biologiques : antitumorale, anticancéreuse et anti-inflammatoire.
- ✓ Investir les propriétés toxiques des extraits d'*Artemisia herba alba*.

References bibliographiques

-S-

- A. Abidjan, memoire pour l'obtention de diplome de doctorat en medecine ,Option de Medecine generale , universite de TOULOUSE III - PAUL SABATIER COTE D'IVOIRE 2012-P8.
- A. Bouquet, Plantes Medicinales du Congo Brazzaville. Ed: O.R.S.T.O.M. 1972.
- A. Cano, O. Alcaraz, M. Acosta et M.B. Arnao, On-line antioxidant activity determination: comparaison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS_o+ assay. *Redox Report*, 2002, 7, pp: 103-109.
- A. Djeridane, M. Yousfi, J.M. Brunel. and P. Stocker, Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome Arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants, *Food and Chemical Toxicology*. 48, 2010, pp: 2599-2606.
- A. Favier, Le stress oxydant. Interet conceptuel et experimental dans la comprehension des mecanismes des maladies et potentiel therapeutique, *L'actualite chimique*, 2003, pp: 108-115.
- A. Lacy, R. O'Kennedy, Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer, *Current Pharmaceutical Design* 10, 2004, pp : 3797-3811.
- A. M. Rizk, Constituents of plants growing in Qatar, *Fitoterapia*, 52 (2), (1982) 35-42. A partir de l'article Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoides d '*Asteriscusgraveolens*subsp. *Olorus* 2014
- A. Meddour, M. Yahia, N. Benkiki et A. Ayachi, Etude de l'activite Antioxydante et antibacterienne des Extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Caparis spinosa* L. *Lebanese Science Journal*, 2013, Vol. 14, No. 1.
- A. Negre-Salvayre et R. Salvayre, Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : Implication en physiopathologie vasculaire, *OCL*, 2005, 12(5) :433-38
- A. Rojas, L. Hernandez, R. Perrada-Mirrandra, R. Matg, Screening for antibacterial activity of crude drug extract and pure natural products from Mexican medicinal plants .*journal of Ethnopharmacology*, 1992, 35 : 275-283.
- A. Scalbert, Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 1991, 30, 3875-3883.
- A.R. Knaggs, The biosynthesis of shikimate metabolites, *Natural Product Reports*, 2003 20 : 119-36.
- A.SEDRATI, etude de l'antibioresistance des souches bacteriennes à l'origine des infections infantiles à l'eph d'ouargla. memoire master academique, universite kasdi merbah-ouargla, 2014.

-<B-

- B. Baudin, Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires, *Mt Cardio*, 2006, 2(1): 43-52.
- B. BENDJILALI, H. RICHARD. Etude de quelques peuplements d'armoise blanche du Maroc. *Artemisia herba alba*, *Rivista Italiana E.P.P.O.S*, LXII, 1980 (2)-69-74.

References bibliographiques

B. Boros, S. Jakabova, A. Domyei, G. Horvath, Z. Pluhar, F. Kilar, A. Felinger, Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217: 7972–7980.

B. SEKLI, Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly(3,4-ethylenedioxythiophene) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du serum sanguin, Thèse de Doctorat, l'Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2011.

B.N. Ames, M.K. Shigenaga, T.M. Hagen, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90, 7915-7922.

-C-

C Remesy, Ed : Odile Jacob. Que mangerons-nous demain.. 2005 Pp : 156.

C. Duraffourd et J.C. Lapraz., *Phytothérapie clinique. Endobiogenie et Médecine*. Edition Masson, Paris. (2002).

C. Muthu, M. Ayyanar, N. Raja, and S. Ignacimuthu. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2:43 doi: 10.1186/1746-4269-2-43 (2006).

C. Sanchez-Moreno, Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems, *Food Sci Tech Int*, 2002, 8(3), pp: 121-137.

C.M. Mann, S.D. Cox, and J.L. Markham. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749, contribute to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30, (2000) pp : 294-297 .

-<D>-

D. Boriky, étude analytique et valorisation par voie des propriétés insecticides de trois *Artemisia* médicinales du Marne (*Artemisia herba alba* Asso, *Artemisia dracuncululus* L. et *Artemisia absinthium* L, Université Hassan II - Mohammedia, Faculté des Sciences Ben M'Sik, Casablanca, 2015.

D. Huang., Ou B. and R.I. Prior, The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J.Agric. Food Chem*, 2005, 53. pp: 1841-1856.

D. Kone, Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes-extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols : Étude de leur activité antioxydant, Doctrat.Univ.METZ .(France) 2009.

D. Roux, O. Catier, Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. *Wolters Kluwer France Edition*, 2007, pp: 74.

D. Tastekin, M. Atasever, G. Adiguzel, M. Keles, A. Tastekin, Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycaemic rats. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2006. 50: 235-238.

Dohou et al *Screening phytochimique d'une endémique ibero marocaine* *Thymelaea lythroïdes*. *Bull. Soc Phann. Bordeaux*. 142. (2003). Pp: 61-78. *In* Berrah Ramzi, Gatta! Brahim. Étude de quelques

References bibliographiques

composes phenoliques de Thyme *Jaea hirsuta* et leur activite antioxydante. Mernoire de MASTER. 2015.

-P,-

E. Dacosta, ed. Paris, Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta, 2003, p317.

E. Gauche, C. Hausswirth, Stress oxydant, complementation nutritionnelle en antioxydants et exercice. Science et Motricite, 2006 58 : 53-66.

-P-

F.N. Muanda. Identification de polyphenols, evaluation de leur activite antioxydante et etude de leurs proprietes biologiques. These de Doctorat, Universite PAUL VERLAINE-METZ. 2010.

-q-

G. Vansant, Ed Institut Danone, Radicaux libres et antioxydants : principes de base, 2004.

G. Wenqtang, L. Shufen, Y. Ruixiang, T. Shaokun, Q Can, Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. Food chem. 1001 : 2007, 1558- 1564.

Guillaume. (2000), Www. Second euro-bioweb.com/microbiologie/ microbiologie cours. Html.

-Jf-

H. Bousseboua, Elements de microbiologie generale, 2001, 2006, 32.pp: 160-167.

H. Falleh, R. Ksouri, K. Chaieb, N. Karray-Bouraoui, N. Trabelsi, M. Boulaaba and C. Abdelly, Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. Comptes Rendus Biologies, 2008, pp : 331, 372-379.

H. Khirddine, comprimés de poudre de <lattes corn.me support universe! des principes actifs de quelques plantes medicinales d'algerie.

H. MEZITI, Evaluation de l'effet anti-inflammatoire et antioxydant des extraits de *Malva parviflora* L, Memoire pour l'obtention du Diplome de magister, Option. 2011.

H. Wu. Isolation and characterization of natural products from ginger and *Allium Ursinum*. *ProQuest Edition*, (2007). pp : 28.

HB. Li, K.W. Cheng, C.C. Wong, K.W. Fan, F Chen, and Y Jiang Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food Chemistry. (2007). pp : 102, 771-776.

H.K. Prescott, *Microbiologi*. Bruxelles. DeBoeck Universite, 1995.

References bibliographiques

-J-

- J Goudable, A. Favier, Radicaux libres oxygenes et antioxydants, *Nutrition Clinique et Metabolisme*. 11 : 1997, 115- 20.
- J. Bruneton, Zeme edition, Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes medicinales., Lavoisier,(Paris). 1993.
- J. Bruneton, 3eme Ed, Pharmacognosie, PhytochimiePlantes medicinales, Techniques et documentations. Paris, 1999, pp : 227-310-3 | 2-313-314-494-1120.
- J. Cillard, P. Cillard, Mecanisme de la peroxydation lipidique et des antioxydation. *OCL*, volume 13, numero.2006 |, 24-29.
- J. Duke, Handbook of phytochemical constituents of gras herbs and other economic plants, Boca. Raton, FL. CRC Press. 1992.
- J. Perry, J. Staley, S. Lory *et al*, Microbiologie. Cours et question de revision. Dunod: 2002 159-160.
- J. Peterson, J. Dwyer, H. Adlercreutz, A. Scalbert, P. Jacques, M.L, Cullough, Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.* 68 (10), pp, 2010, 571-603.
- J. Pincemail, F Degrune., S. Voussure, C. Malherbe, N. Paquot, J.O. Defraigne, Effet d'une alimentation riche en fruits et legumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et metebolisme* , 2007, 21, pp: 66-75.
- J. Pincemail, M. Meurisse, R. Limet et J.O. Defraigne, L'evaluation du stress oxydatif d'un individu : une realite pour le medecin. *Vaisseaux, Cceur, Poumons*, 1999, Vol. 4, No. 5.
- J. Psotova, J. Lasovsky, J. Vicar, Metal -chelating Propertyts, lectrochemical Behaviour, Scavenging and cytoprtoective Activities of six Natural phenolic. *Biomed. Papers* 147(2), 2003, pp: 147 153.
- J.B. Harbome. *Phytochemical methods. A guide to modem techniques of plants analysis*.Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).1998.
- J.J. Macheix, A. Fleriet, A. Christian, Les composes phenoliques des vegetaux : un exemple de metabolites secondaire d'importance economique. PPTUR Lausanne. 2005.
- J.L. Guignard, 2•me Ed, *Biochimie vegetate*. DUNOD. 2004 274 p.
- J.L. Guignard, *Aberge de Biochimie vegetale à l'usage des etudiants en pharmacie*: Masson. Paris, 1974, pp: 146-155.
- JM. Kong, L.S. Chia, N.K Goh., T.F Chia. and R Brouillard. Q. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 2003 64, pp: 923-933.
- J.N.M.S. Sampayo, G.J, Lithgow, Oxidatif stress and ageing-the use of superoxide dismutase / catalase mimetics to extend lifespan. *Biochemical Society transaction*, 2003. 31, 1305-1307.
- J.P. Guiraud, Ed. Dunod, *Microbiologie alimentaire*, 1998, pp: 71-75.

References bibliographiques

Justine, Intert de la supplimentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques, THESE pour obtenir le grade de docteur veterinaire. Universite Paul-Sabatier de TOULOUSE. 2005.

-1(-

K. ABIDAT, K. MEBARKI, Etude des activites antioxydante et antibacterienne d'extraits polaires methanoliques d'especes endemiques du genre Thymus, Universite Larbi Tebessi - Tebessa, 2015

K. Alice, place de la rnedecine traditionnelle dans Jes soins de v primaires.

K. DONATIEN,. enquete ethnobotanique de six plantes medicinales maliennes extraction, identification d'alcaloides -caracterisation, quantification de polyphenols : etude de leur activite antioxydante. these doctorat. l'universite paul verlaine de metz -upv- m (france). 2009.

K. Schlesier, M. Harwat, V. Bohm. et R. Bitsch, Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research*, 2002 36, pp: 177-187.

K. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, T. Nakamura. Antioxidative properties of xanthin on autoxidationof soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem.* 40: (1992) pp: 945- 948.

K. YOUNES, Contribution à l'etude chirnique et biologique de deux plantes medicinales de la region ouest d'Algerie: A. Arborescens Let Cardaria Draba L Desv, THESE Doctorat En Chirnique, Univ Abou Bela Belkaid. tlemcen. 2014 P 45.

K.R. Narayana, M.S. Reddy, M.R. Chaluvadi, et D.R. Krishana, Bioflavonoids classification, pharmacological, Biochemical effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 2001.33, 2-16.

K.W. Lee, Y.J. Kim, H.J. Lee and, C.Y. Lee, Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine, *Food chemistry*. 2003, 51, pp: 7292-7295.

-£-

L. BELLEBCIR L, etude des composes phenoliques en tant que marqueurs de biodiversite chez les cereales.magister, UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE, 2008.

L. Hoffmann, *Edition Inner Traditions I Bear and Co*, Medical Herbalism: The Science and Practice of Herbal Medicine, 2003, pp : 90.

L. MESSAI, etude phytochirnique d'une plante medicinale de l'est algerien (artemisia herba alba), these doctorat en chimie organique, universite de constantine.2011 1 p 27.

Lopes-Lutz D., Alviano D., Alviano C. S. and Kolodziejczyk PP. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry*, 2008, 69:1732-1738.

-:M-

M A ELOUKILI, Valeur nutritive de l'armoise blanche (Artemisia herba alba) comparee à l'unite fourragere de l'orge, These Master en science des aliments, Univ Abou Bela Belkaid. Tlemcen, 2013 P.3.

References bibliographiques

- M.A. Nabli, Essai de synthese sur la vegetation et la phyto-ecologie tunisiennes, tome I. Ed.
- M. Barel, Ed: Quae, Du cacao au chocolat: l'epopee d'une gourmandise .. 2009 Pp: 118.
- M. Boudjouref, Etude de l'activite antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L, Memoire de Magister En Biochimie, Universite Ferhat Abbas, Serif 2011.P 1-P3
- M. Cavina, Investigation phytochimique de trois plantes indonesiennes au propriete antioxydante et anti radicalaire : « *Tinospora crispa* (Menispermaceae). *Merremia emerginata* (Convolvulaceae) et *Orpheaen neandra* (Annonanceae), These de Doctorat, Universite de l'Indonesie, 1999, 10-19.
- M. Naczk, F. Shahidi, Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054 : 2004, 95-111.
- M. Paraskevi, The spectrum of phytoestrogens in nature : our knowledge is expanding. *Hormones*, 2007, 6 (3): 173-193.
- M. Talbi, 2014, dosage des polyphenols de la plante d'*Artemisia Campestris*. L par chromatographie HPLC. Mis en evidence de l'activite biologique, Memoire de Magistere en chimie moleculaire et biomoleculaire, Universite d'Oran I. 2014 P48.
- M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes et J. Telser "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004, 266(1-2): 37 56.
- M.A. Piquet, X. Hebuterne Nutrition en pathologie digestive. *Edition WoltersKluwer France*, 2007. pp: 93.
- M.M. Cowan, Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbial Res.*, 12 (4): 1999, 564- 582.
- M.M. Kechkar Extraction de la silymarine et etude de son activite antimicrobienne. Memoire du Magister de l'Universite Mentouri, Constantine. 2008.
- Muanza et al., D.N. Muanza, K.L. Euler and L. William, "Screening for antitumor and anti-HIV activities of nine medicinal plants from Zaire", *International Journal of Pharmacology* 33 (1995), pp. 98-106. Oussalah M., S. Caillet, L. SAUCIER and M. Lacroix. *Food Control*. 18 (5) (2007), 414-420.
- Muanza *et al.*, K. Muanza, B.W. Kim, K.L. Euler and L. William, Antibacterial and antifungal activities of nine medicinal plants from Zaire, *International Journal of Pharmacology* 32, 1994, 337-345.

-N-

- N. Belkheiri, Derives phenoliques à activites antiatherogenes, These de Doctorat, Universite de TOULOUSE, 2010.
- N. Dohou, K. Yamin, S. Tahrouch, L.M. Idrissi Hassani, A. Badoc et N. Gmira Screening phytochimique d'une endemique ibero marocaine *Thymelaea lythroides*. *Bull, Soc Phann. Bordeaux*. 142. Pp: 61-78.
- N. Marian et S. Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food *journal of Chromatography A*, (2004). 1054: pp: 95-111.

References bibliographiques

N. Saleh, S. El-Nougoumy, M Abd-Allah, M. Abou-Zaid, G. Dellmonica, J. Chopin, *Phytochemistry*. 1985. 24(01): 201-203

N. Toudert, Etude phytochimique et evaluation de quelques activites biologiques de *Ampelodesma mauritanica*, These de doctorat, Universite Badji Mokhtar, Annaba, 2011.

N.A. Simonian, J.T. Coyle, Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol* 36, 1996, 83-106.

N.J. Miller, C.A. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan. and A. Milner, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 1993, 84, pp: 407-412.

N.J. Miller, J. Sampson, L.P. Candeias, P.M. Bramley. and C.A. Rice-Evans, Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 1996, 384, pp : 240-242.

NR. Madamanchi, A. Vendrov, MS. Runge, Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscl Throm*, 2005 Vas 25, 29-38.

N.R. Perron, Ed: UMI ,Effects of polyphenol compounds on iron-and copper-mediated DNA damage: mechanisms and predictive models, 2008

-0-

O. Cartier et D. Roux, S= Ed, Botanique pharmacognosie phytotherapie. Wolters klurver. France, 2007 141 p.

-<P-

P. Iserin, Ed: Larousse ENCYCLOPEDIE des plantes medicinales, 2001, 335 p.

P. Luhata. Etude Chimique de l'espece *Jacobinia Carnea*. Universite de Lubumbashi- Recherche en phytotherapie. 2008.

P. Quezel. S. Santa. Nouvelle flore de L'Algerie et des region desertiques medicales Vol 2 CNRS : 569-1170. 1963.

P. Sainvitu, K Nott, G. Richard, C. Blecker, C. Jerome, JP. Wathelet, M. Paquot. M. Deleu, Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignin. 2012.

- ~

R. Berrah, B. Gattal. Etude de quelques composes phenoliques de *Thymelaea hirsuta* et leur activite antioxydante. Memoire de MASTER. 2015.

R Jarrige, Y. Ruckebusch, *Editions Quae*, Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion,, 1995 pp : 57.

R. Aira, Activite anti-oxydante, et caracterisation phenolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa), These de Doctorat, Universite des Antilles et de la Guyane, 2012.

References bibliographiques

R. Kebbab, Etude do pouvoire antioxydant des polyphenols issus des margines d'olives de la variete *Chamla* : Evaluation de l'activite avant et apres deglycosylation.memoire pour l'obtention de magister, Universite Mouloud Mammeri Tizi-Ouzo, 2014.

R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, A.M. Yang. and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improvised ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26, pp: 1231-1237.

R. Richter, *Metabolisme des vegetaux physiologie et biochimie*, PPUR. Lausanne, 1993 pp: 319-322. R.

SEGAL, I. FEURSTEIN, A. DANIN, chemotypes of artemisia herba albain Israel based on their sesquiterpene lactone and essential oil constitution, *Biochemical systematics and Ecology*, 1987 15,(4), 411-416.

R. Silverstein, G. Basler and T. Morill. Identification spectrometrique des composes organiques. De *Boeck* Brussels, (2004). pp : 432.

-S-

S Y. Tang, B. Halliwell, Medicinal plants and antioxidants : what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 394: 1-5.

S. MAAMRI, Etude de *Pistacia atlantica* de deux regions de sud algerien : dosage des lipides, dosage des polyphenols, essais antileishmaniens, These Magister en biologie Universite M'HAMED BOUGARA Boumerdes, 2008.

S. Martin, R. Andriantsitohaina, Mecanismes de la protection cardiaque etvasculaire des polyphenols au niveau de l'endothelium, *Annales de cardiologie et d'angeiologie*, 2002 51 : 304---315.

J{-

T. ALLANE, Etude des pouvoirs antioxydant et antibacterien de quelques especes vegetates locales alimentaires et non alimentaires, Diplome de magister universite M'HAMED BOUGARA BOUMERDES, 2009.

T. Sun, J.R. Powers, J. Tang, Evaluation of the antioxidant activity of asparagus broccoli and their juices. *Food Chem*, 2007, 105: 101-106.

T.J. Beveridge. Mechanism of gram variability *in select bacteria*. *J. Bacterial*, 1990. 172 (3): 1609-1620.

-V-

U. Liittge, M. Kluge, G. Bauer, *Botanique: traite fondamental (traduction francaise)*. Ed. Tee. & doc. Lavoisier, Paris.1992, p 205-218.

W. Brand, M.E. Cuvelier. et C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 1995, 28, pp : 25-30.

References bibliographiques

- 'W-

W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier et C. Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, (1995). 28, pp : 25-30.

W.G. Hopkins, Zeme edition, Physiologie vegetale de bock universite, 2003, p276280.

- 'Y-

Y. Asada, T. Oshikawa, Welli, Antimicrobial flavonoids from Glycyrrhiza glabra hairy root cultures. *Planta medica*, 1998, 64(8): 746-747.

Y. Rolland, Antioxydants naturels vegetaux. OCL, volume. 11, numero 6, 419-424.

- 'Z-

Z. Ghrabi, R.L. Sand, *Artemisia herba alba* Asso. A Guide to Medicinal Plants in North Africa, 2008. 49 - 49.

Z. Hadbaoui. Evaluation de l'activite antioxydante des fractions lipidiques, proteiques et phenoliques de sorgho et de mil locaux. These de Doctorat: Universite de Kasdi Merbah. OUARGLA-ALGERIE. (2012).

Z. Hadbaoui. Evaluation de l'activite antioxydante des fractions lipidiques, proteiques et phenoliques de sorgho et de mil locaux. These de Doctorat : Universite de Kasdi Merbah. OUARGLA-ALGERIE. (2012).

Z. HELLAL, Contribution à l'etude des proprietes antibacteriennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine (*sardina pilchardus*), diplome de magister en biologie, Universite MOULOUE MAMMRI DE TIZI-OUZOU, 2011

Z. Mohamadi, Etude Phytochimique et Activites Biologiques de quelques Plantes medicinales de la Region Nord et Sud Ouest de l'Algerie, memoire pour l'obtention de diplome de doctorat, Option Substances naturelles, Activites Biologiques et Syntheses, Universite Abou Bekr . Belkaid. 2012, P 170.

Z. Mohemmedi, Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelques plantes de la region de Tlemcen, Memoire de magister Universite Abou Baker Belkaid. Tlemcen, 2006.

Z. Nkhili, Polyphenols de l'Alirnentation : Extraction, Interaction avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant, These Doctorat, Univ. Marrakech, 2009, pp: 320.

WEBOGRAPHIE

<http://www.sny.jussieu.fr>.

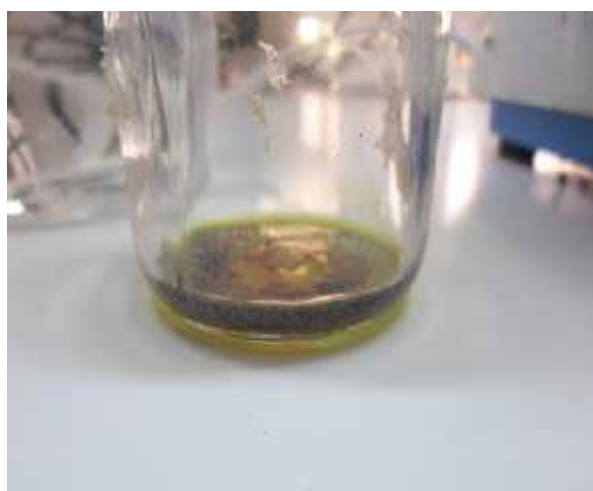
Annexe 01 : Screening phytochimique



Leucoanthocyanes

Flavonoïde

Terpenoïde et strole



Terpenoïde

terpenoïde



Declaration sur l'honneur de non-plagiat

(a joindre obligatoirement au memoire, remplit et signee)

Je soussign(e),

Nom, Prenom : Y. S.

Requiere ment inscrit(e) en Master au departement de Sciences de la Nature

N° de carte d'etudiant : 1411

Année scolaire : 1

Demaine

Filière

Specialite:

Intitule du memoire : [Handwritten subject title]

Atteste que mon memoire est un travail original et que toutes les sources utilisees ont ete indiquees dans leur totalite. Je certifie egalement que je n'ai ni recopie ni utilise des idees ou des formulations tirees d'un ouvrage, article ou memoire, en version imprimee ou electronique, sans mentionner precisement leur origine et que les citations integrales sont signalees entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouve :

L'etudiant sera convoque devant le conseil de discipline, les sanctions prevues selon la gravite du plagiat sont :

- L'annulation du memoire avec possibilite de le refaire sur un sujet different ;
- L'exclusion d'une annee du master;
- L'exclusion definitive.

Fait à Tebessa, le 10.02.2019

Signature de l'etudiant(e):

[Handwritten signature]

