



République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique



Université Larbi Tébessi-Tébessa-

Faculté des sciences exactes et des sciences de
la nature et de la vie

Département : Sciences de la matière

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie organique

THÈME :

*Évaluation du pouvoir antioxydant et
antimicrobien des extraits de plante
médicinale poussant dans le nord
algérien*

Présenté par :

Mr. AGGOUN Khaled

Devant les membres du jury :

BENAHMED	Merzoug	Professeur	Université de Tébessa	Président
HAFSI	Yasmina	MAA	Université de Tébessa	Examinatrice
BOUDIBA	Sameh	MCA	Université de Tébessa	Encadreur

Soutenue le : 22/09/2020



République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique



Université Larbi Tébessi-Tébessa-
Faculté des sciences exactes et des sciences de
la nature et de la vie



Département : Sciences de la matière

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie organique

THÈME :

*Évaluation du pouvoir antioxydant et
antimicrobien des extraits de plante
médicinale poussant dans le nord
algérien*

Présenté par :

Mr. AGGOUN Khaled

Devant les membres du jury :

BENAHMED	Merzoug	Professeur	Université de Tébessa	Président
HAFSI	Yasmina	MAA	Université de Tébessa	Examinatrice
BOUDIBA	Sameh	MCA	Université de Tébessa	Encadreur

Soutenue le : 22/09/2020



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



Déclaration sur l'honneur de non-Plagiat
(À joindre obligatoirement au mémoire; Remplie et signée)



Nous soussignons

Nom, prénom: AGGOUW Khaled & _____ /

N° de carte d'étudiant: (1) 201534020243 (2) _____ /

Régulièrement inscrits (es) en **Master** au **Département Sciences de la Matière**

Année universitaire: **2019/2020**

Domaine: **Sciences de la matière**

Filière: **Chimie**

Spécialité: Chimie organique

Intitulé du mémoire: Evaluation de pouvoir anti oxydant et anti microbien des extraits de plante médicinale pounant dans le nord algérien

Attestons que notre mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Nous certifions également que nous n'avons ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article, ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé:

Les étudiants seront convoqués devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont:

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent.
- L'exclusion d'une année du master.
- L'exclusions définitive.

03 أكتوبر 2020

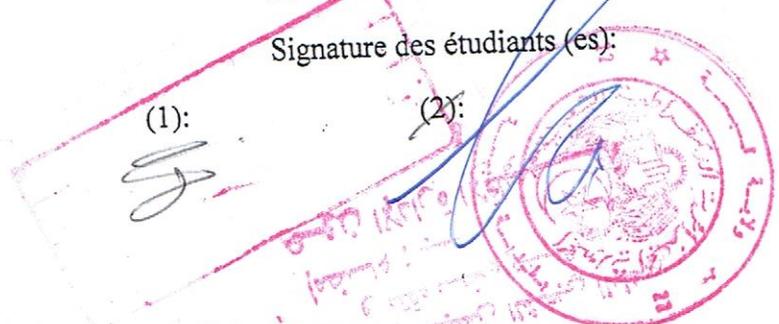
Fait à Tébessa, le: _____

Signature des étudiants (es):

(1):

(2):

03 أكتوبر 2020





Université Larbi Tébessi- Tébessa

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département *Science de la matière*

Filière : *clinie*

Spécialité : *clinie organique*

Année universitaire 2019/2020



Formulaire de levée de réserves après soutenance d'un Mémoire de Master

Données d'identification du candidat (e) :

Nom et prénom du candidat : *Khaled Aggoun*

Intitulé du Sujet : *Évaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits de plante médicinale poussant dans le nord d'Algérie*

Données d'identification du membre de jury :

Nom et prénom :

Grade :

Lieu d'exercice : Université Larbi Tébessi- Tébessa

Vu le procès-verbal de soutenance du mémoire sus citée comportant les réserves suivantes :

Rectifier quelques fautes et d'une référence bibliographique

Et après constatation des modifications et corrections suivantes :

** tous a été rectifié*

Je déclare en ma qualité de président de jury de soutenance que le mémoire cité remplit toutes les conditions exigées et permet au candidat de déposer son mémoire en vue de l'obtention de l'attestation de succès.

Le *15.11.2020*

Président de jury de soutenance : (Nom/Prénom et signature)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

ملخص

بسبب ندرة الأبحاث المنجزة بخصوص نبات "*Clinopodium nepeta*" والمنتمي إلى عائلة "Lamiaceae"، إرتأينا في بحثنا هذا لإجراء دراسة كيميائية نباتية على مستخلصات هذا النبات الذي تم جمعه من منطقة عنابة، كما تم تقييم هاته المستخلصات من حيث نشاطاتها البيولوجية المختلفة. قدم مستخلص البوتانول أعلى مردود إستخلاص بنسبة 3,502 %، يليه المستخلصان الآخران اللذان كان لهما نفس المردود تقريبا بنسبة 1,952 % لمستخلص ثنائي كلورو الميثان و1,954% لمستخلص خلات الإيثيل. أظهر محتوى البوليفينول الكلي والذي تم تحديده بواسطة طريقة "Folin-Ciocalteu"، ومحتوى الفلافونويد الذي تم تقييمه بواسطة طريقة ثلاثي كلوريد الألومنيوم ($AlCl_3$)، وجود هذه المركبات بكميات كبيرة في كل من مستخلص البوتانول ومستخلص خلات الإيثيل. أبدى تقييم قوة المستخلصات كمضادات للأكسدة بإستعمال أربع طرق: $FRAP$ ، $CUPRAC$ ، $DPPH^{\bullet}$ ومعقد الفينانثرولين، قدرة عالية لجميع المستخلصات خاصة لمستخلصي خلات الإيثيل و البوتانول، نظراً لغنائهما بالمركبات الفينولية والفلافونويدية. تجدر الإشارة إلى أن الفعالية المضادة للأكسدة المبداءة من طرف المستخلصات الثلاثة كانت أقوى من α -Tocophérol. أعطى مستخلص البوتانول وكذا مستخلص خلات الإيثيل قوة حماية عالية ضد الأشعة البنفسجية، على عكس مستخلص ثنائي كلور الميثان الذي اظهر قوة حماية متوسطة بعد تقييم النشاط الواقى من الأشعة فوق البنفسجية. ابرزت المستخلصات التي تم اختبارها نشاطا مثبطا معتدلا ضد كل من *Salmonella typhimurium*، *Klebsiella pneumoniae*، *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، مع مناطق تثبيط تتراوح من 8 إلى 22 ملم، وبالمثل بالنسبة للنشاط المضاد للفطريات الذي تم اختباره على *Candida albicans*، مع مناطق تثبيط تتراوح بين 12 و18.

كلمات مفتاحية: *Clinopodium nepeta*، قوة مضادات الأكسدة، النشاط الواقى من الضوء، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للفطريات.

Abstract

Due to the little work carry out on the species "*Clinopodium nepeta*", belonging to the Lamiaceae family, we opted in our work to perform a serial of phytochemical screening on extracts of this plant, which was collected from Annaba region, followed by an evaluation of their biological activities. The highest extraction yield was been that of the butanolic extract with 3,502 %, followed by the two other extracts, which had almost the same yield with 1,952 % for the extract of dichloromethane and 1,954 % for the ethyl acetate extract. The total polyphenol content determined by "Folin - Ciocalteu" method and the flavonoid content evaluated by the aluminum trichloride (AlCl₃) method, revealed the presence of these compounds in significant quantities in both butanolic and ethyl acetate extracts. The evaluation of the antioxidant power by four methods: DPPH[•], CUPRAC, FRAP and the phenantroline complex, exhibited a greater antioxidant capacity, for all extracts, in particularly the ethyl acetate and n-butanolic ones , due to their richness in phenolic and flavonoids compounds. All estimated extracts showed a stronger antioxidant power compared to α -Tocopherol (Vitamin E). A powerful photoprotective potential against UV-B, was been demonstrated by both butanolic and ethyl acetate extracts through the evaluation of the photoprotective activity. However, the dichloromethane extract had a relatively average photoprotective power. A moderate inhibitory activity for the tested extracts against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* was been showed, with inhibition zones ranging from 8 to 22 mm. Similarly, for the tested antifungal activity against *Candida albicans*, with inhibition zones ranging from 12 to 18.

Key words: *Clinopodium nepeta*; antioxidant power; photoprotective activity; antibacterial activity; antifungal activity.

Résumé

En raison du peu de travaux effectués sur l'espèce "*Clinopodium nepeta*", appartenant à la famille des Lamiaceae, nous avons opté dans notre travail pour effectuer une série de criblages phytochimiques sur les extraits de cette plante récoltés de la région d'Annaba, suivis d'une évaluation de leurs activités biologiques. Le rendement d'extraction le plus élevé était celui de l'extrait butanolique avec 3,502 %, suivi par les deux autres extraits qui ont presque le même rendement avec 1,952 % pour l'extrait dichlorométhanique et 1,954 % pour l'extrait d'acétate d'éthyle. La teneur en polyphénols totaux déterminée par la méthode de "Folin – Ciocalteu" et la teneur en flavonoïdes évaluée par la méthode du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), révèlent la présence de ces composés en quantité importante dans les deux extraits butanolique et celui d'acétate d'éthyle. L'évaluation du pouvoir antioxydant par quatre méthodes, à savoir : DPPH', CUPRAC, FRAP et le complexe phénantroline, a révélée une capacité antioxydante importante pour les extraits testés et particulièrement pour l'extrait de l'acétate d'éthyle et celui du n-butanol, due à leurs richesses en composés phénoliques et en flavonoïdes. Tous les extraits évalués ont manifestés un pouvoir antioxydant plus fort que celui de l' α -Tocophérol (Vitamine E). Un haut pouvoir photoprotecteur vis-à-vis les UV-B, a été exhibé par les deux extraits butanolique et celui de l'acétate d'éthyle, suite à l'évaluation de l'activité photoprotectrice. Néanmoins, ce pouvoir a été relativement moyen pour l'extrait dichlorométhanique. Les extraits testés ont montré une activité inhibitrice modérée contre *Escherichia coli*, la *Klebsiella pneumoniae*, la *Salmonella typhimurium*, la *Bacillus subtilis* et la *Pseudomonas aeruginosa*, a été manifestée, avec des zones d'inhibition variaient de 8 à 22 mm. De même pour l'activité antifongique testée sur les *Candida albicans*, avec des zones d'inhibition variaient de 12 à 18.

Mots clés : *Clinopodium nepeta* ; pouvoir antioxydant ; activité photoprotectrice ; activité antibactérienne ; activité antifongique.

Dédicace

A la mémoire de celle qui s'est sacrifiée pour mon éducation et qui a fait tout pour ma réussite, ma chère mère.

A mon père que dieu le protège.

A ma sœur.

A tous mes amis.

Remerciement

Tout d'abord, je remercie, du plus profond de mon cœur, Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

*Je tiens à remercier, très chaleureusement **Mme. BOUDIBA Sameh**, maître de conférences « A » à l'Université Larbi Tbessi, Tébessa, mon encadreur, je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa rigueur scientifique et compréhension. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien à tous les instants et surtout merci pour vos qualités humaines.*

*Mes vifs remerciements au **Pr. BENAHMED Merzoug** de l'université de Tébessa, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ce travail.*

*Je souhaite vivement associer à ces remerciements ceux pour **Mme. HAFSI Yasmina**, maître assistant « A » à l'Université Larbi Tbessi, Tébessa, pour avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire.*

*En termes de reconnaissance, je tiens à exprimer mes vifs remerciements au Professeur **LAOUER Hocine** pour l'identification botanique de la plante étudiée.*

Par ailleurs, je tiens à remercier :

*Toute l'équipe du laboratoire de biochimie du centre de recherche en biotechnologie en particulier **M^{lle} Hanen, Mr. Hatem et Mr. Mehdi**.*

*Un vif remerciement s'adresse à **Mme. BENHADJ Mabrouka** pour son remarquable aide apportée pour l'élaboration de ce travail.*

*J'adresse encore mes remerciements à **Mr. BEDDIAR Hatem**, doctorant à l'Université Larbi Tbessi, Tébessa pour son aide.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements à tous mes **Enseignants** qui m'ont enrichi avec leurs connaissances précieuses tout le long de mon parcours d'étude.*

Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

A tous les chers je vous dis Merci.

Khaled.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des schémas

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Références bibliographiques.....3

Recherches bibliographiques

I. PRODUITS NATURELS.....4

I. 1. Composition.....4

I. 1. 1. Métabolites primaires.....4

I. 1. 1. 1. Lipides.....4

I. 1. 1. 2. Acides aminés.....5

I. 1. 1. 3. Glucides5

I. 1. 1. 4. Acides nucléiques.....6

I. 1. 2. Métabolites secondaires.....6

I. 1. 2. 1. Composés phénoliques.....6

a) Flavonoïdes.....7

b) Acides phénoliques.....10

c) Coumarines.....10

d) Tanins.....11

e) Quinones.....12

I. 1. 2. 2. Alcaloïdes.....12

I. 1. 2. 3. Terpènes.....13

II. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES.....17

II. 1. Activités anti oxydantes.....17

II. 1. 1. Antioxydants.....	18
II. 1. 1. 1. Antioxydants synthétiques.....	18
II. 1. 1. 2. Antioxydants naturels	18
II. 1. 2. Radical libre.....	18
II. 1. 3. Espèces réactives oxygénées (ERO).....	19
II. 1. 4. Stress oxydatif	19
II. 1. 5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante (<i>in-vitro</i>).....	19
II. 1. 5. 1. Piégeage du radical libre DPPH [•]	20
II. 1. 5. 2. Réduction du fer par la méthode de FRAP.....	20
II. 1. 5. 3. Réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC).....	21
II. 1. 5. 4. Réduction par la formation du complexe Fe ⁺² - phénantroline.....	21
II. 2. Activité photo-protectrice	22
II. 2. 1. Écrans solaires	23
II. 2. 2. Facteur de protection solaire (SPF).....	23
II. 3. Activités anti-microbiologique.....	23
II. 3. 1. Micro-organisme.....	24
II. 3. 2. Bactéries.....	24
II. 3. 3. Champignons.....	24
II. 3. 4. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	24
II. 3. 4. 1. Méthode de diffusion	24
II. 3. 4. 2. Méthode de dilution.....	25
Références bibliographiques.....	26

Matériels et méthodes

I. MATÉRIEL.....	30
I. 1. Matériel végétal.....	30
I. 1. 1. Répartition et distribution géographique de la plante investiguée.....	30
I. 1. 1. 1. Intérêt pharmacologique, nutritionnel et commercial.....	30
I. 1. 2. Description botanique.....	31
I. 1. 3. Collecte de la plante.....	31

I. 1. 4. Travaux antérieurs effectués sur " <i>Clinopodium nepeta</i> "	32
I. 2. Matériel biologique.....	33
I. 2. 1. Souches bactériennes.....	33
I. 2. 1. 1. <i>Escherichia coli</i>	33
I. 2. 1. 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
I. 2. 1. 3. <i>Salmonella typhimurium</i>	34
I. 2. 1. 4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
I. 2. 1. 5. <i>Bacillus subtilis</i>	35
I. 2. 2. Souches fongiques.....	35
I. 2. 2. 1. <i>Candida albicans</i>	35
II. MÉTHODES.....	36
II. 1. Étude phytochimique	36
II. 1. 1. Extraction des composés phénoliques.....	36
II. 1. 1. 1. Extraction solide-liquide	36
II. 1. 1. 2. Extraction liquide-liquide	36
II. 1. 2. Rendement.....	37
II. 1. 3. Screening phytochimique	38
II. 2. Activités biologiques	40
II. 2. 1. Détermination du total en polyphénols et flavonoïdes	40
II. 2. 1. 1. Détermination des polyphénols totaux	40
II. 2. 1. 2. Détermination des flavonoïdes totaux	41
II. 2. 2. Détermination de l'activité anti oxydante.....	42
II. 2. 2. 1. Piégeage du radical libre DPPH'.....	43
II. 2. 2. 2. Pouvoir réducteur de fer par la méthode FRAP	45
II. 2. 2. 3. Réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC).....	45
II. 2. 2. 4. Réduction par la formation du complexe Fe ⁺² -phénanthroline.....	47
II. 2. 3. Détermination du facteur de protection solaire (SPF).....	48
II. 3. Activités anti-microbiologiques.....	49
II. 3. 1. Activité antimicrobienne.....	49
II. 3. 1. 1. Activité antibactérienne.....	49
II. 3. 1. 2. Activité antifongique.....	52
Références bibliographiques.....	53

Résultats et discussion

I. ANALYSES CHIMIQUES.....	56
I. 1. Rendements d'extractions.....	56
I. 2. Screening phytochimique	56
II. 3. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES	58
II. 1. Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur en flavonoïdes.....	58
II. 1. 1. Total phénolique	58
II. 1. 2. Total flavonoïdes	60
II. 2. Résultats de l'activité antioxydante.....	61
II. 2. 1. Piégeage du radical libre DPPH'.....	61
II. 2. 2. Réduction du fer par la méthode de FRAP	64
II. 2. 3. Réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC).....	65
II. 2. 4. Réduction par la formation du complexe Fe⁺²-phénanthroline.....	67
II. 3. Détermination du facteur de protection solaire (SPF).....	69
II. 4. Résultats d'activités anti-microbiologiques.....	71
Références bibliographiques.....	76
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	78

Abréviations et symboles

Symboles	Signification
DMSO	Diméthylsulfoxyde
MeOH	Méthanol
UV-Vis	Ultra Violet Visible
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
ARN	Acide ribonucléique
A_{0,5}	Concentration indiquant 0,50 d'absorbance
DCM	Dichlorométhane
AcoEt	Acétate d'éthyle
But	n-butanol
ADN	Acide désoxyribonucléique
Abs	Absorbance
%	Pourcentage
DPPH[•]	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
Fe	Fer
Cu	Cuivre
V/V	Volume/Volume
FCR	Réactif Folin Ciocalteu
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
°C	Degré Celsius
MH	Mueller Hinton
ATCC	American Type Culture Collection
nm	Nanomètre
µl	Microlitre
ml	Millilitre
h	Heure
s	Seconde
R	Rendement

µg	Microgramme
mg	Milligramme
g	Gramme
EAG	Equivalent Acide Gallique
EQ	Equivalent Quercétine
ERN	Espèces réactives de l'azote
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
UV	Ultraviolet
IC₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%
ppm	Partie par million
PI	Pourcentage d'inhibition
MED	Dose minimale d'érythème
SPF	Facteur de protection solaire
SD	Standard deviation

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Exemple d'acide gras	5
2	Exemple d'un acide aminé	5
3	Projections de Fisher du glucose	6
4	Un exemple d'un acide nucléique	6
5	Exemples de composés phénoliques	7
6	Structure de base des flavonoïdes	7
7	Exemple d'un flavonol	8
8	Exemple d'un flavone	8
9	Exemple d'un flavanone	9
10	Exemple d'un isoflavone	9
11	Exemple d'anthocyane	10
12	Exemples d'acides phénoliques	10
13	Exemple de coumarine	11
14	Exemple de tanin	11
15	Exemple de quinone	12
16	Exemple de pseudo-alcaloïde	13
17	Exemple de proto-alcaloïde	13
18	Exemples de monoterpène	14
19	Représentation d'un phytol	14
20	Représentation d'un triterpène	14
21	Représentation d'un exemple de tetraterpène	15
22	Exemple de sesquiterpène	15
23	Représentation d'un polyterpène	16
24	Représentation d'un exemple de saponoside	16
25	Représentation d'un exemple de stérol	17
26	Répartition géographique mondiale de la famille de Lamiaceae	30
27	Photo de " <i>Clinopodium nepeta</i> "	31

28	Capture par satellite de la région de récolte de " <i>Clinopodium nepeta</i> "	32
29	<i>Escherichia coli</i> au microscope électronique	33
30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> au microscope électronique	33
31	<i>Salmonella typhimurium</i> au microscope électronique	34
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i> au microscope électronique	34
33	<i>Bacillus subtilis</i> au microscope électronique	35
34	<i>Candida albicans</i> au microscope électronique	35
35	Préparation du milieu de culture	50
36	Procédure de préparation d'inoculum	51
37	Ensemencement d'une boîte de Pétri	52
38	Rendements des extraits obtenus (en %).	56
39	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	58
40	Teneur des extraits en polyphénols	59
41	Courbe d'étalonnage de la quercétine	60
42	Teneur des extraits en flavonoïdes	61
43	Pourcentage d'inhibition du DPPH [*] par différents extraits	62
44	Activité antioxydante des différents extraits testée par DPPH [*] (Valeur des IC ₅₀)	64
45	Courbe des absorbances en fonction des concentrations des extraits (Pouvoir réducteur).	65
46	Valeurs des A _{0,50} du test FRAP pour les différents extraits	65
47	Courbe d'absorbance de CUPRAC en fonction de la concentration des différents extraits	66
48	Valeurs des A _{0,50} du test CUPRAC pour les différents extraits	67
49	Courbes des absorbances en fonction des concentrations (phénantroline)	68
50	Valeurs des A _{0,50} des différents extraits avec le complexe Fe ⁺² -phénantroline	68
51	Éléments essentiels pour l'activité antioxydante	69
52	Résultat du test préliminaire du solvant sur les souches microbiennes	72
53	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
54	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Salmonella typhimurium</i>	73
55	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Bacillus subtilis</i>	73

56	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Escherichia coli</i>	74
57	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	74
58	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Candida albicans_F36</i>	74
59	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Candida albicans_F24</i>	75

Liste des schémas

N°	Titre	Page
1	Piégeage du radical DPPH' en DPPH-H	20
2	Mécanisme réactionnel de la réduction du fer	21
3	Réduction du complexe chromogène de [Cu ⁺² -Nc]	21
4	Formation du complexe Fe ⁺² -phénantroline	22
5	Protocole d'extraction des composés phénoliques	37
6	Procédure de dosage des polyphénols totaux	41
7	Procédure de dosage des flavonoïdes totaux	42
8	Représentation schématique de la dilution en série et l'inoculation de la microplaque	43
9	Procédure du test de piégeage du radical libre DPPH'	45
10	Procédure du test de Pouvoir réducteur (FRAP)	45
11	Procédure du test de réduction du complexe cuivre-néocuproïne	47
12	Procédure du test de la réduction du fer par la formation du complexe Fe ⁺² -phénanthroline	48

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Résultats de ces études antérieurs effectués sur la plante investiguée	32
2	Différentes souches microbiennes testées	36
3	Représentation de la dilution en série des différentes concentrations des extraits testés pour les méthodes testés	43
4	Fonction normale des constantes utilisée dans le calcul de la SPF	49
5	Degré de sensibilité et d'activité selon le diamètre d'inhibition	52
6	Résultats du screening phytochimique de la plante étudiée	56
7	Teneur des extraits obtenus en composés phénoliques	59
8	Teneur des extraits en flavonoïdes	60
9	Activité antiradicalaire du DPPH [*] et le pourcentage d'inhibition	62
10	Valeurs d'absorbances des différents extraits après la réduction du fer	64
11	Valeurs d'absorbances des différents extraits avec le complexe cuivre-néocuproïne	65
12	Valeurs d'absorbances des extraits avec le complexe Fe ⁺² - phénantroline	67
13	Valeurs du facteur de protection solaire (SPF)	70
14	Catégories de protection affichées sur les produits solaires en fonction des facteurs de protection mesurés, selon la recommandation de la commission européenne (RCE) 2006	70
15	Pourcentage des rayons UV-B bloqués	71
16	Résultats de l'activité antimicrobienne <i>in-vitro</i> des extraits en utilisant la méthode de diffusion du disque	72

Introduction générale



De tous les temps, les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé des remèdes à base de plantes soit sauvages soit cultivées pour se nourrir, se vêtir ou se soigner. Malheureusement, la transmission du savoir-faire, par nos ancêtres, en matière de soin par ces richesses généreuses s'est reculée avec l'apparition de la "médecine moderne" [1]. Cette dernière reste insatisfaisante aux besoins de l'être humain, en raison des effets secondaires des médicaments synthétiques, leur coût de production élevé et leur toxicité pour l'homme et l'environnement.

Une étude publiée dans le Lancet, portant sur 170000 personnes, montre que des antioxydants de synthèse (vit. A, C, E), ne protègent pas contre le cancer mais plus encore, leur association avec du bêta-carotène de synthèse augmente le risque de mortalité [2]. Une autre étude complémentaire menée à Baltimore sur 135000 patients, a mis en évidence que la vitamine E de synthèse, à dose élevée peut augmenter la mortalité, en devenant pro-oxydante, tandis que la vitamine E naturelle est un très bon antioxydant reconnu sans effets secondaires [3].

En outre, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et l'émergence rapide de nouvelles infections, ont fortement diminué l'efficacité des médicaments pour traiter les pathologies causées par certains microorganismes [4]. En 2017, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a publié une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques [5].

En revanche, les immenses progrès réalisés suite à l'emploi des plantes médicinales, leur biodégradabilité, leur faible coût de production, leur disponibilité dans la nature, favorise la tendance à chercher des antioxydants naturels et d'autres molécules bioactives, sûrs et efficaces pour les employés dans les industries alimentaires et pharmaceutiques [6].

On rappelle qu'à l'échelle mondiale, près de 80 % de la population a recours aux plantes médicinales par insuffisance d'accès aux médicaments prescrits et aussi parce que les plantes ont pu prouver une réelle efficacité. La grande majorité de la population du globe, surtout dans les pays en voie de développement, se soigne exclusivement avec des remèdes traditionnels à base de plantes [7]. Ce don divin, représentent un réservoir immense de composés potentiels, attribués aux métabolites secondaires, qui ont une grande variété de structures chimiques, dotées de diverses activités biologiques comme, antimicrobiennes, anti inflammatoires et antioxydantes entre autres.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail, dont l'objectif principal est la valorisation des plantes médicinales algérienne, à la recherche de nouvelles molécules naturelles, bioactives qui peuvent remplacer les molécules synthétiques. Pour cela, nous avons procédé des travaux phytochimiques et biologiques sur une plante poussant spontanément dans le nord algérien (Annaba) appelée "*Clinopodium nepeta*".

En raison du peu de travaux effectués sur cette plante, notre étude se propose d'effectuer des tests de screening phytochimique et d'évaluer les propriétés antioxydante, photoprotectrice et antimicrobienne des différents extraits obtenus de la plante investiguée.

Le travail réalisé est rapporté dans ce manuscrit dans trois chapitres.

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique. D'abord, des généralités sur les métabolites primaires et secondaires, les composés phénoliques et les composés terpéniques, puis un rappelle de quelques activités biologiques à savoir : l'activité antioxydante, photoprotectrice et anti microbiologique.

Le deuxième chapitre, renferme une présentation botanique, géographique et les travaux antérieurs effectués sur la plante investiguée, suivie par la description du matériel et des méthodes utilisés dans notre travail ; l'extraction de la matière végétale, les tests de dépistages phytochimique, les dosages des polyphénols et des flavonoïdes ainsi que l'évaluation des activités antioxydante, photoprotectrice et antimicrobienne des extraits.

Le troisième chapitre, discutera les résultats obtenus à partir des tests phytochimiques et des études biologiques.

Ce manuscrit se terminera par une conclusion générale avec une présentation des perspectives.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. Hseini and A. Kahouadji, "Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental)," *Lazaroa*, vol. 28, pp. 79-93, **2007**.
- [2] G. Bjelakovic, D. Nikolova, R. G. Simonetti, and C. Gluud, "Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis," *The Lancet*, vol. 364, pp. 1219-1228, **2004**.
- [3] M. Schürks, R. J. Glynn, P. M. Rist, C. Tzourio, and T. Kurth, "Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials," *Bmj*, vol. 341, 2010.
- [4] S. Martins, E. L. Amorim, T. J. P. Sobrinho, A. M. Saraiva, M. N. Pisciotto, C. N. Aguilar, *et al.*, "Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves," *Industrial Crops and Products*, vol. 41, pp. 306-311, **2013**.
- [5] B. Saber, "Étude phytochimique et activités biologiques des extraits de feuilles et de fruits de *Chamaerops humilis* L," Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba, **2018**.
- [6] A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, "Dietary polyphenols and the prevention of diseases," *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 45, pp. 287-306, **2005**.
- [7] W.H. Organization, *WHO monographs on selected medicinal plants* vol. 2: World Health Organization, **1999**.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

I. PRODUITS NATURELS

La chimie des produits naturels est la chimie des produits métaboliques des plantes, des animaux, des insectes, des organismes marins et des micro-organismes [1]. Il est à noter que le processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante.

La majorité des composés dérivés des plantes sont des composés issus des métabolites secondaires et / ou primaires. Cependant, les principes actifs contenus dans ces richesses naturelles jouent un rôle important comme produits antimicrobiens, antiviraux et antioxydants entre autres. Ces produits se répartissent en plusieurs groupes comme les alcaloïdes, les polyphénols, les flavonoïdes, les quinones, les tanins, les coumarines, les terpènes, etc. [2, 3, 4].

Comme connu universellement, les produits naturels jouent un rôle majeur au niveau du développement de médicaments, particulièrement des produits antioxydants, antibactériens et anti-tumorales. Ce réservoir naturel de principes actifs est employé en médecine traditionnelle dans le traitement de certaines maladies cardiovasculaires, cancéreuses, dépressives et inflammatoires [5].

I. 1. Composition

Les produits naturels sont constitués de métabolites qui peuvent être définis comme des composés organiques synthétisés lors d'une phase du métabolisme.

On peut distinguer deux types de métabolite : métabolites dits primaires et métabolites dits secondaires.

I. 1. 1. Métabolites primaires

Les métabolites primaires sont des molécules organiques caractérisés par leur propriété nécessaire et vitale pour y assurer la survie de la cellule ou de l'organisme [6]. Ces molécules rassemblent quatre grandes familles : les lipides, les acides aminés, les glucides et les acides nucléiques.

I. 1. 1. 1. Lipides

Les lipides sont des composés organiques (esters d'acides gras et d'un alcool ou d'un polyol). Ce sont des corps gras marqués par leur solubilité dans les solvants organiques apolaire (Exemple : éther de pétrole, benzène) par contre ils sont insoluble dans l'eau [7]. Les lipides simples se composent uniquement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Certains lipides complexes peuvent contenir du phosphore de l'azote ou du soufre dans leurs squelettes.

La figure ci-dessous représente un exemple d'acide gras.

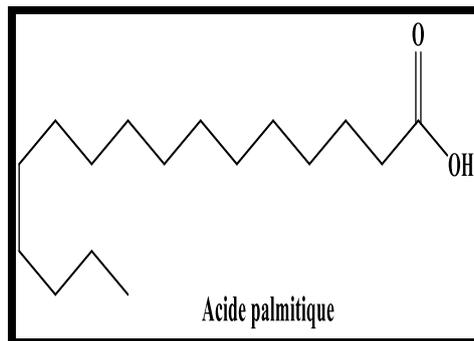


Figure 1 : Exemple d'acide gras.

I. 1. 1. 2. Acides aminés

Les acides aminés sont les molécules de base qui se lient entre eux par des liaisons peptidiques pour former des protéines. Ces molécules ont deux groupes fonctionnels principaux : un groupe fonctionnel qui est une amine (NH_2) et un autre groupe qui est un acide carboxylique (COOH). Cependant, ces composés se distinguent par des structures différentes qui caractérisent chaque acide aminé et par leurs chaînes latérales. Les groupes fonctionnels d'acides carboxyliques et aminés portés par le carbone alpha sont quasiment tous mobilisés par les liaisons peptidiques [8]. Sur la figure 2, un exemple d'un acide aminé est illustré.

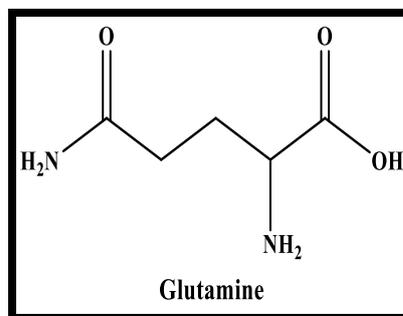


Figure 2 : Exemple d'un acide aminé.

I. 1. 1. 3. Glucides

Les glucides, ou encore appelés hydrates de carbone en raison de leur formule générique $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n$, sont des molécules organiques dont les carbones contenu dans leurs structures sont porteurs d'une fonction aldéhyde, cétone ou alcool. Généralement, il s'agit de composés carbonyles poly hydroxylés (aldéhydiques ou cétoniques) [9]. La figure 3 représente un exemple de glucides.

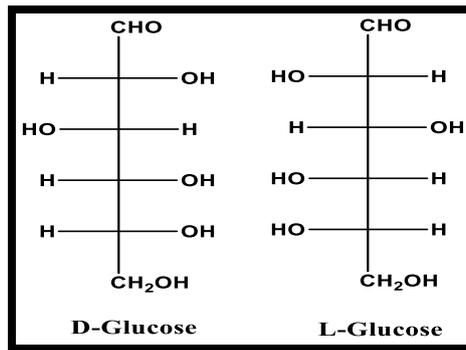


Figure 3 : Projections de Fisher du glucose.

I. 1. 1. 4. Acides nucléiques

Un acide nucléique (ADN, ARN) est un terme désignant une substance constituée d'un enchaînement de molécules de structure simple appelée nucléotides. Chaque nucléotide se compose d'une base nucléique (azotée) aromatique, d'un sucre à cinq atomes de carbone et d'un groupement phosphate. La composition de ce dernier est stable pour tous les acides nucléiques, alors que celle du sucre varie en fonction du type d'acide nucléique : le désoxyribose pour les nucléotides de l'ADN et le ribose pour l'ARN [10]. La figure 4 illustre un exemple d'acide nucléique.

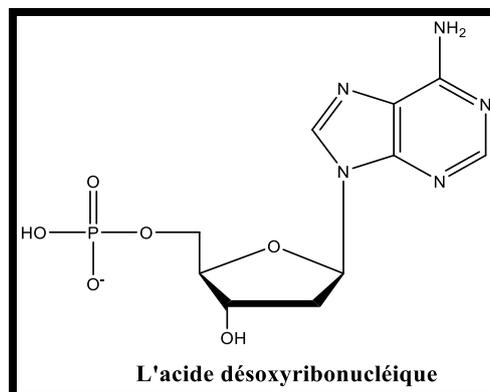


Figure 4 : Un exemple d'un acide nucléique.

I. 1. 2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires peuvent être définis comme un groupe de produit naturel qui n'est pas essentiel à la croissance des organismes végétaux. Néanmoins, ils représentent une grande source potentielle d'agents thérapeutiques [11]. Ces composés sont divisés en trois grandes familles : les polyphénols, les alcaloïdes et les terpènes.

I. 1. 2. 1. Composés phénoliques

Les polyphénols participent généralement à la défense des plantes contre les agressions environnementales [12]. Il est à signaler que ces composés ont en commun une unité aromatique

à laquelle sont liés un ou plusieurs groupements hydroxyles [13].

Ces composés peuvent être attachés à un ou plusieurs résidus sucrés ou à d'autres composés chimiques, comme : les acides carboxyliques, les amines ou les lipides [14]. Cette famille regroupe à son tour des sous familles qu'on décrira dans ce qui suit. La figure 5 illustre deux exemples de composés phénoliques.

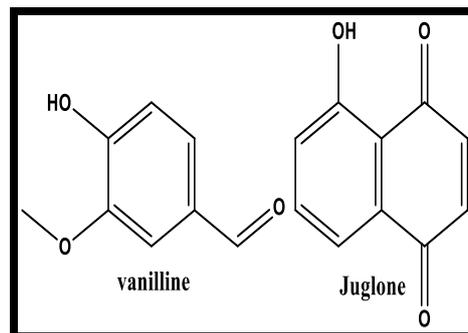


Figure 5 : Exemples de composés phénoliques.

a) Flavonoïdes

Le terme flavonoïde provient du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'agrumes [15]. C'est la sous-famille la plus représentative des composés phénoliques considérés parmi les agents responsables des couleurs de la plante [16]. Ces molécules se trouvent avec de grandes quantités dans les boissons (vin rouge, thé et café), dans les légumes, ou encore dans les fruits et dans plusieurs plantes médicinales [17].

Les flavonoïdes se distinguent par de nombreuses classes de molécules, approximativement plus de 6400 structures ont été découvertes. [18] Ceux-ci possèdent toutes un même squelette de base est celui d'un diphenyl propane à quinze atomes de carbone [19]. La figure 6 représente la structure de base des flavonoïdes.

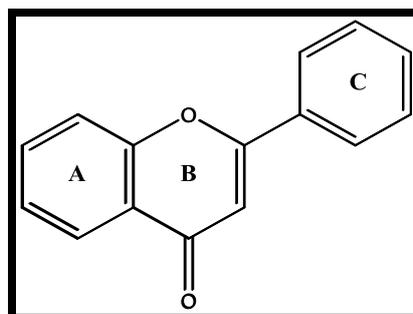


Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes.

Il faut noter que les flavonoïdes les plus étudiés appartiennent aux groupes flavonols, flavones, isoflavones, flavanones et anthocyanes [20].

☼ Flavonols

Le terme flavonols désigne les composants flavoniques les plus abondants des aliments, principalement représentés par le kaempférol et la quercétine. Ils ont un très fort pouvoir antioxydant grâce à leur structure chimique approprié au piégeage des radicaux libres [21]. La figure 7 représente un exemple d'un flavonol.

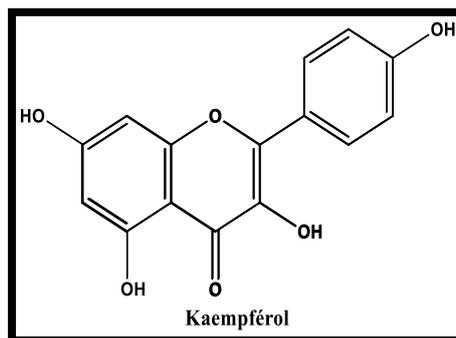


Figure 7 : Exemple d'un flavonol.

☼ Flavones

Les flavones sont une classe importante de flavonoïdes ayant une large gamme d'activités biologiques remarquables, notamment les activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-œstrogènes, antimicrobiennes, antiallergiques, anti-tumorales et cytotoxiques [22]. Ces motifs sont présents chez les plantes supérieures comme certaines fleurs, roses et œillets avec une grande abondance sous deux formes aglycones ou glycosylés. Ce sont des colorants naturels au même titre que la chlorophylle et les caroténoïdes. Un exemple de flavone est représenté sur la figure 8.

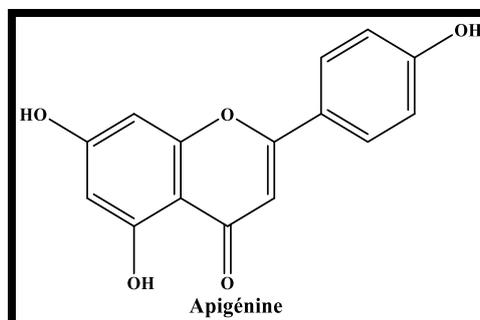


Figure 8 : Exemple d'un flavone.

☼ Flavanones

Les flavanones ont une structure chimique semblable à celle des flavones, sauf que le cycle porteur d'hétéroatomes ne contient pas de double liaison. Généralement on les retrouve chez les Myrtacées [23]. Dans les aliments ces composés se retrouvent dans les tomates et on peut également les distinguer dans certaines plantes comme la menthe. La figure 9 représente un exemple d'un flavanone.

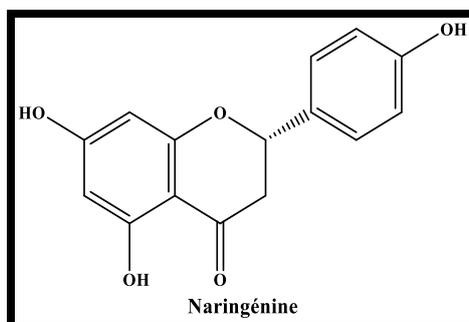


Figure 9 : Exemple d'un flavanone.

✿ Isoflavones

Les isoflavones sont une sous-famille des flavonoïdes très étudiée pour leurs propriétés pseudo-œstrogéniques. Ce sont les isomères de flavones avec une structure quasi identique, la seule différence étant la position du groupe phényle lié au carbone 3 au lieu du carbone 2 pour les flavones. Cette catégorie est très variée ; elle contient des isoflavones, des isoflavanones, des isoflavanes entre autres. En outre, plus de 1600 isoflavonoïdes aglycones et glycosides ont été découverts, leurs dérivés présentent plusieurs propriétés pharmacologiques [24]. La figure 10 illustre un exemple de ces composés.

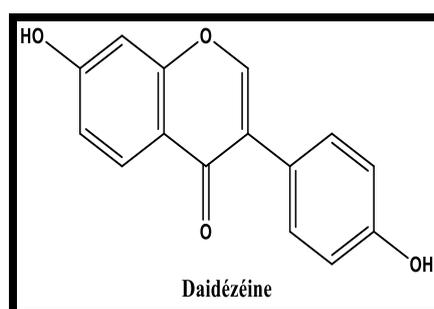


Figure 10 : Exemple d'un isoflavone.

✿ Anthocyanes

Par définition, les anthocyanes sont des pigments naturels qui sont susceptibles de donner des teintes du jaune-orangé au bleu en passant par le pourpre et le rouge à plusieurs plantes, certaines fleurs et fruits. Ils se solubilisent facilement dans l'eau et offrent des éventualités très larges dans l'industrie. Une de leurs propriétés considérables réside dans leur

capacité antioxydante et de nombreuses études sur leurs activités biologiques en témoignent [25]. La figure 11 illustre un exemple des anthocyanes.

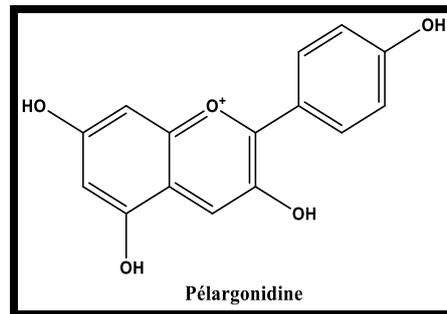


Figure 11 : Exemple d'anthocyane.

b) Acides phénoliques

Les acides phénols ou acides phénoliques représente une partie de structures les plus simples des composés phénoliques et se répartissent en deux sous-classes différents qui sont :

1) **Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)**, dont les composés les plus fréquents sont : l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide vanillique.

2) **Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3)**, dont les plus répandus sont : l'acide ρ -coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique [26].

La figure ci-dessous représente des exemples d'acides phénoliques.

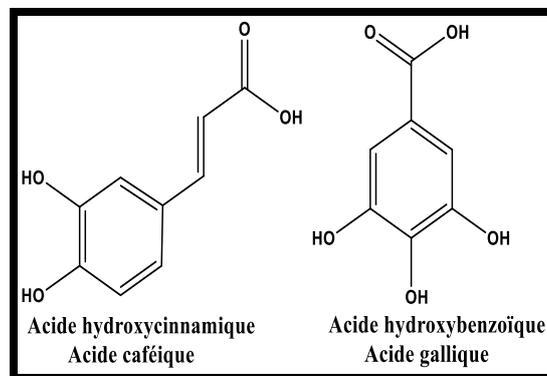


Figure 12 : Exemples d'acides phénoliques.

c) Coumarines

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels aromatiques résultant de l'assemblage d'un noyau benzénique avec un pyrane, possédant une fonction cétone en position α par rapport à l'oxygène [27]. L'utilisation de ces composés revient à leurs propriétés vasculoprotectrices, neuro sédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives [28]. La figure 13 représente un exemple d'une coumarine.

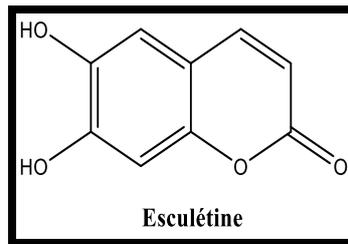


Figure 13 : Exemple de coumarine.

d) Tanins

On nomme généralement "Tanins" les substances phénoliques ayant une grande masse moléculaire [29]. Ces molécules présentent dans les organes végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits, possèdent la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible en se fixant sur les protéines. En plus, ces composés ont l'aptitude de se combiner aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives des complexes insolubles, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Selon leur nature chimique et leur structure, les tanins se divisent en deux groupes [29] : tanins hydrolysables et tanins condensés.

☼ *Tannins hydrolysables*

Ce sont des esters d'acides phénoliques et d'un résidu sucré. Si c'est le phénol est l'acide gallique, ce sont les gallitannins ; alors que s'il s'agit de l'acide hexa-hydroxy-diphénique, ce sont les ellagitannins. On trouve les tanins hydrolysables chez les dicotylédones et ils sont plus facilement hydrolysables par les microorganismes que les précédents [30]. La figure 14 représente la structure de l'acide ellagique.

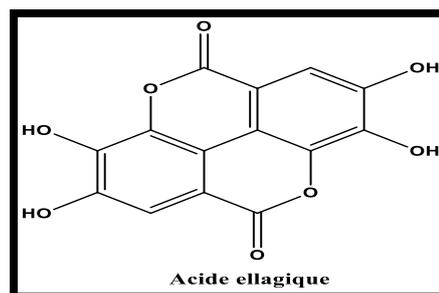


Figure 14 : Exemple de tanin.

☼ *Tanins condensés*

Ce sont des polymères (d'où leur nom "condensés") de dérivés de résidus flavonols (catéchol, épicatechol,..) liés par des liaisons carbone-carbone ; ils sont synthétisés par la plupart des végétaux [31].

e) Quinones

Les quinones présentent une classe de molécules organiques d'une grande importance dans la chimie et la biologie. On peut trouver ces substances colorées et brillantes dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Ces composés se caractérisent par leur dione conjuguée d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé. On distingue parmi ces composés : le naphthalène, l'anthracène, le pérylène et le phénanthrène [32]. La figure 15 illustre un exemple de quinone.

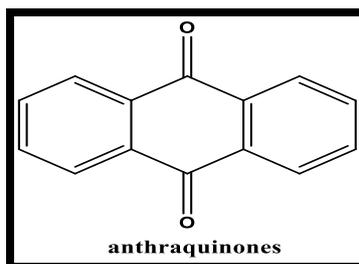


Figure 15 : Exemple de quinone.

I. 1. 2. 2. Alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit pour la première fois par le pharmacien "Allemand Meissner" [33]. Ce sont des composés organiques avec une structure moléculaire complexe, hétérocycliques avec la présence de l'azote comme hétéroatome. Ces composés d'origine naturelle à caractère basique, présentant généralement une grande activité pharmacologique. On trouve les alcaloïdes chez les végétaux, les champignons et quelques groupes d'animaux. Généralement ces composés sont des dérivés d'acides aminés et sont classés en trois groupes : les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes et les proto-alcaloïdes [34].

a) Alcaloïdes vrais :

Ce sont des composés dérivés d'acides aminés, très réactifs même à des petites doses. Ils sont produits de la condensation d'un acide aminé décarboxylé avec une molécule dépourvue d'azote [34].

b) Pseudo-alcaloïdes :

Ces composés ne sont pas des dérivés d'acides aminés. Il s'agit de dérivés de l'acétate et d'isoprenoïdes [35]. La figure 16 représente un exemple d'un pseudo-alcaloïde.

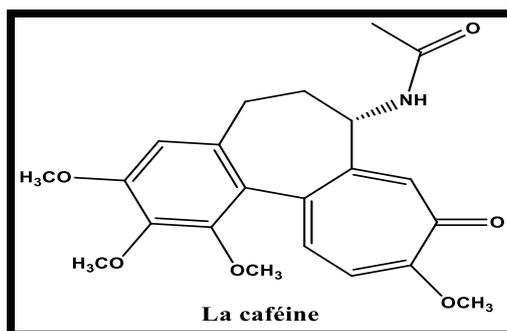


Figure 16 : Exemple de pseudo-alkaloïde.

c) Proto-alkaloïdes :

Ce sont des composés dérivés d'un acide aminé qui contiennent au moins un atome d'azote en dehors des structures cycliques. La figure 17 représente un exemple d'un proto-alkaloïde.

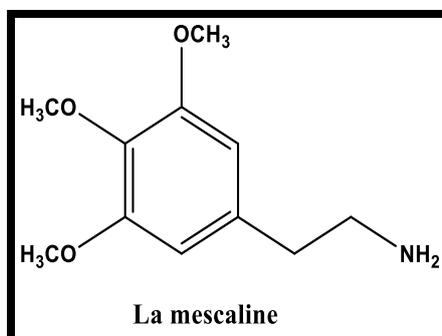


Figure 17 : Exemple de proto-alkaloïde.

I. 1. 2. 3. Terpènes

Le terme terpène créé par "Kekulé" [36], vient de son origine historique de l'arbre de térébinthe : "*Pistacia terebinthus*" [37]. De nombreux de ces composés sont isolés à partir des fleurs, des tiges, des racines et des différentes parties des plantes [38]. Ces produits sont utilisés comme des additifs dans l'industrie des aliments et des produits cosmétiques [39].

Ces molécules se classifient selon le nombre d'entités d'isoprène incorporées dans leurs structures en : monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$), diterpènes ($C_{20}H_{32}$), triterpènes ($C_{30}H_{48}$), tetraterpènes ($C_{40}H_{64}$) et polyterpènes (C_5H_8)ⁿ. En outre, les terpènes regroupent aussi les saponosides, les stérols et les huiles essentielles.

a) Monoterpènes

Les monoterpènes sont les motifs les plus simples des terpènes. Ils se trouvent dans les catégories structurelles suivantes : acycliques, monocycliques ou bicycliques [40]. La figure 18 représente deux exemples de monoterpènes.

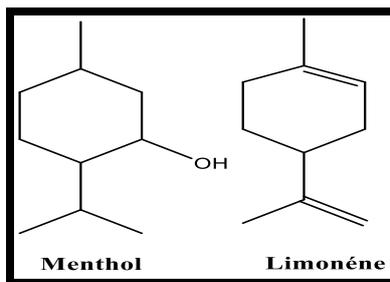


Figure 18 : Exemples de monoterpène.

b) Diterpènes

Les diterpènes forment une classe de composés terpéniques à vingt carbones. Ils sont biosynthétisés par l'assemblage de quatre unités isoprène [41]. Ces motifs peuvent être acycliques ou cycliques comme : le phytol qui est l'un des principaux alcools diterpéniques acycliques qui est un précurseur de synthèse de la vitamines E, K et A [42]. Un exemple d'un diterpènes est représenté sur la figure 19.

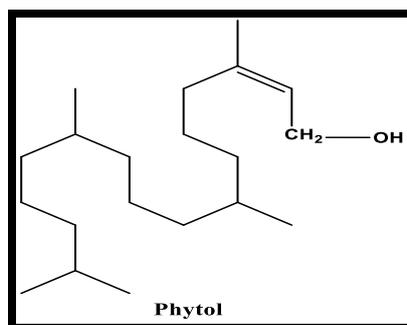


Figure 19 : Représentation d'un phytol.

c) Triterpènes

Ce sont des composés très répandus dans la nature formés de trente atomes de carbones. On les trouve généralement dans les résines. Les triterpènes sont subdivisés en : acyclique, tétracyclique et pentacyclique [43]. La figure 20 illustre un exemple de triterpène.

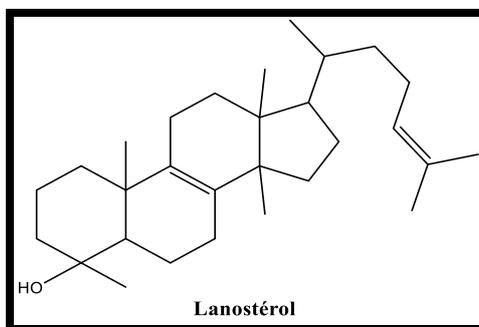


Figure 20 : Représentation d'un triterpène.

d) Tetraterpènes

Ces molécules possèdent une longue chaîne de quarante atomes de carbones, les plus observées sont les caroténoïdes comme le lycopène et le β -carotène. Elles sont présentes naturellement dans les plantes, les algues et différents microorganismes. Les caroténoïdes sont des provitamines ayant aussi un pouvoir antioxydant remarquable [43]. La figure 21 illustre un exemple de tetraterpène.

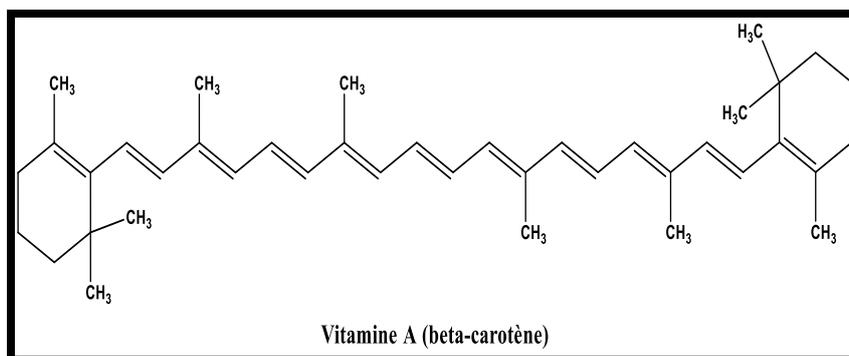


Figure 21 : Représentation d'un exemple de tetraterpène.

e) Sesquiterpènes

Ces composés sont des hydrocarbures de formule brute $C_{15}H_{22}$ formés de trois unités isoprènes. Ils se présentent aussi sous forme d'hydrocarbures oxygénés tel que : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. En outre, des sesquiterpènes lactones peuvent également se trouver dans les plantes et suite à l'oxydation d'un groupe méthyle du groupe isopropyle relié au squelette de base sesquiterpénique ; le groupe lactone est engendré [44]. Il s'agit du groupe le plus variée des terpènes et parmi les molécules de cette famille on trouve : les sesquiterpène acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques et polycycliques. La figure 22 représente un exemple de sesquiterpène lactone.

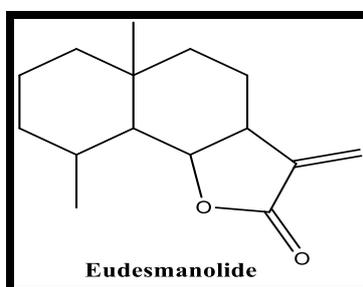


Figure 22 : Exemple de sesquiterpène.

f) Polyterpènes

Les polyterpènes dont le fragment de base est l'isoprène sont des composés caractérisés par un poids moléculaire très élevé. Le caoutchouc naturel est un exemple de polymère

terpénique. La figure 23 représente un exemple d'un polyterpène.

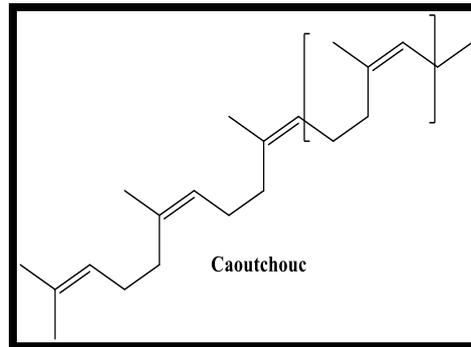


Figure 23 : Représentation d'un polyterpène.

g) Saponosides

Ce sont des hétérosides de stérol ou de triterpène dont leurs solutions aqueuses ont des propriétés tensioactives et aphrogènes (pouvoir moussant). On peut trouver ces composés dans tous les organes des plantes, notamment dans les racines et sont localisés dans les vacuoles. Les saponosides possèdent de nombreuses activités biologiques telle que : l'activité antifongiques, antioxydants, anti-inflammatoires et antivirales [45].

La figure ci-dessous représente un exemple de saponoside.

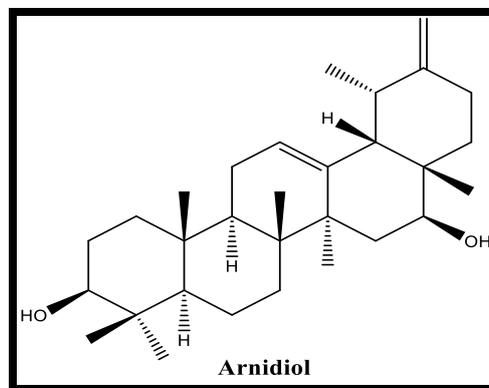


Figure 24 : Représentation d'un exemple de saponoside.

h) Huiles essentielles

Les huiles essentielles définies comme un mélange naturel complexe de métabolites secondaires lipophiles, volatiles, odorants et souvent liquides sont des substances synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Les molécules contenues dans les huiles essentielles sont nombreuses, majoritairement des terpénoïdes et des molécules aromatiques et sont dotés de plusieurs activités biologiques telle que : l'activité antimicrobiennes, antioxydants et anti-inflammatoires [45].

i) Stérols

Les stérols sont des alcools comportant un noyau stérane, ils sont présents naturellement en faibles quantités dans de nombreux fruits et légumes, fruits secs et huiles végétales. Ce sont des éléments essentiels des membranes cellulaires végétales [46]. La figure 25 représente un exemple d'un stérol.

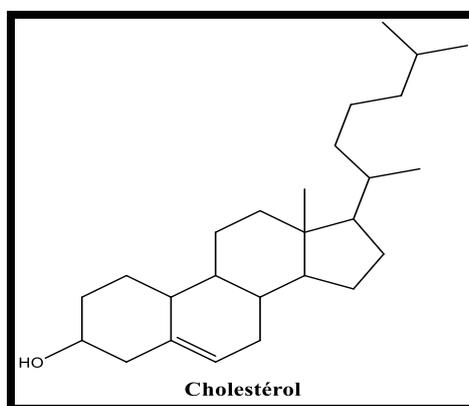


Figure 25 : Représentation d'un exemple de stérol.

II. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

Comme mentionné ci-haut, depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées aussi bien comme remède que comme produits gastronomiques ou pour les préparations de parfumerie. Néanmoins, une attention croissante a été accordée à ces produits au cours des dernières décennies pour devenir des sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens. Ces plantes possèdent une variété d'activités biologiques, parmi lesquelles nous pouvons citer : l'antifongique, l'insecticide, l'herbicide, l'antibactérienne et l'antioxydante entre autres [47].

II. 1. Activité antioxydante

Actuellement, l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle immense qu'elle joue dans la prévention du : vieillissement des cellules, des maladies chroniques ainsi que leurs propriétés thérapeutiques.

Dans les systèmes biologiques, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et celles de l'azote (ERN), peuvent endommager la cellule en oxydant ses composants, comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Naturellement, un système antioxydant présent dans le corps humain peut éliminer ces radicaux libres, ce qui permettrait de maintenir l'équilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les capacités antioxydantes de l'organisme [48].

II. 1 .1. Antioxydants

On désigne par antioxydants tous les substances qui à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, inhibent ou retardent de manière significative le processus d'oxydation de ce substrat [49]. Ces composés sont utilisés pour prévenir le vieillissement, de nombreuses maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, inflammation, ...etc., dus à la production excessif des radicaux libres, ou encore dans les aliments pour retarder leurs détérioration, le rancissement ou la décoloration qui est souvent due à l'oxydation causée par l'oxygène de l'air, la lumière, la chaleur et éventuellement certains enzymes entre autres [50].

Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique (comme la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la catalase etc.), non enzymatique (comme le séquestrant des métaux) et des petites molécules liposolubles (comme la vitamine E, la β -carotène) ou hydrosolubles (comme la vitamine C, l'acide urique). Ils peuvent être d'origines endogènes ou exogènes et peuvent être des composés naturels ou synthétiques.

Les antioxydants sont classés en fonction de leurs origines, ce qui donne :

II. 1. 1. 1. Antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire et à cause de l'instabilité inhérente des antioxydants naturels, plusieurs antioxydants synthétiques sont utilisés pour stabiliser les matières grasses et les huiles. Ces produits synthétiques, à savoir le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), la gallate propylée (PG) et le tetra-butylhydroquinone (TBHQ), le di-tertbutyl-4-hydroxyméthylphénol (IONOX-100), l'acide nordihydroguaiaretique (NDGA) et le 4-hexylresorcinol (4HR), sont des antioxydants synthétiques lipophiles, largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels [51].

II. 1. 1. 2. Antioxydants naturels

Les antioxydants naturels comprennent le plus souvent, l'albumine, l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), le β -carotène (provitamine A), ainsi que des composés phénoliques etc. Leur propriété antioxydante est attribuée essentiellement à la stabilisation des membranes cellulaires en diminuant leurs perméabilité d'un côté et de l'autre côté, la capacité élevé de ces composés à lier les acides gras libres [52].

II. 1. 2. Radical libre

Des molécules produites par divers mécanismes physiologiques à une dose raisonnable sont appelées radicaux libres. Un radical libre est une entité chimique, qu'elle soit une

molécule ou un simple atome contenant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui la rend très réactive [53]. Parmi ces entités, il y a les radicaux libres oxygénés et leurs précurseurs notés : espèces réactives oxygénées. La dénomination "Dérivés réactifs de l'oxygène" n'est pas restrictif, car elle inclut non seulement les radicaux libres de l'oxygène, mais également des dérivés non radicalaires dont la toxicité est importante tel le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 [54].

II. 1. 3. Espèces réactives oxygénées (ERO)

L'oxygène qui est un élément indispensable à la vie est susceptible parfois de causer des effets nuisibles à l'organisme, à travers la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées réactives (ERO) [55].

Le terme ERO réfère aux espèces réactives oxygénées, qu'elles soient radicalaires ou non, ces espèces sont énergiquement plus réactives que l'oxygène moléculaire. Les EROs peuvent apparaître sous l'action de plusieurs facteurs déclenchant, externes comme les rayonnements UV ou les traces de métaux, ou internes tel que les réactions enzymatiques. Les EROs incluent non seulement des radicaux libres dérivés de l'oxygène dont les plus courants : le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et sa forme protonée (HO_2^{\cdot}), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le radical peroxyde (ROO^{\cdot}), le radical alcoyle (RO^{\cdot}), mais aussi des dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que l'oxygène singulet (1O_2 , $^{\cdot}O-O^{\cdot}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$) qui peuvent être des précurseurs de radicaux mais ne sont pas réactives [56].

II. 1. 4. Stress oxydatif

Les radicaux libres générés physiologiquement dans le corps humain sont très utiles pour l'organisme et leur production est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Cependant, l'excès de productions de ces radicaux est appelé stress oxydatif. On parle de ce phénomène lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [57]. Le stress oxydatif peut favoriser la survenue de nombreuses maladies neurodégénératives incluant l'alzheimer, le parkinson et le désordre pathologique, mais également des phénomènes de vieillissement [54].

II. 1. 5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante (*in-vitro*)

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour évaluer la capacité de piégeage d'un radical libre et l'activité antioxydante totale d'un extrait de plante, parmi lesquelles on peut citer : le piégeage du radical libre DPPH $^{\cdot}$, la réduction de fer par la méthode de FRAP, la

réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) et la réduction par la formation du complexe Fe^{+2} - phénantroline :

II. 1. 5. 1. Piégeage du radical libre DPPH•

L'objectif de cette méthode est de déterminer l'activité antioxydante en employant un radical stable (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, DPPH•) de couleur violette en solution. Ce dernier se réduit en présence d'une substance réductrice (antioxydant) par un mécanisme combinant le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert d'électrons comme l'explique le schéma ci-dessous. Le résultat de cette réaction de réduction se manifeste par le virage de la couleur violette de la solution en couleur jaune. Ce type de test est recommandé pour les composés contenant des groupes, SH^- , NH^- et OH^- [58].

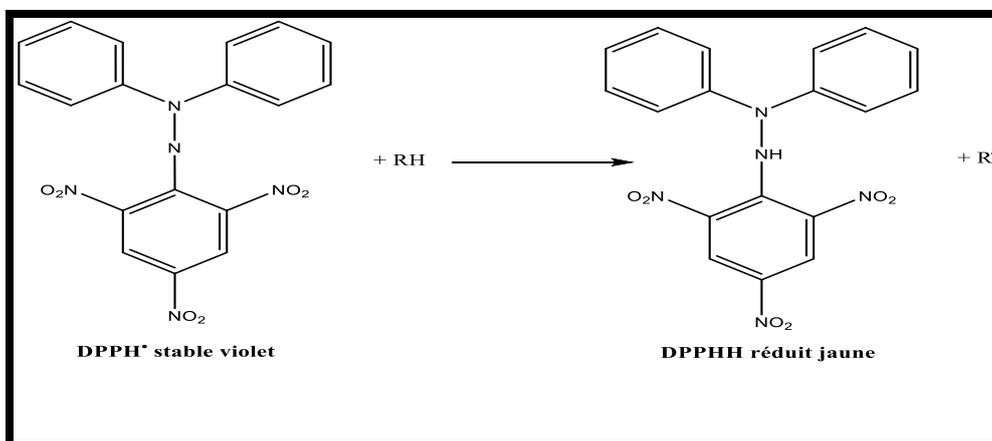


Schéma 1 : Piégeage du radical DPPH• en DPPH-H.

II. 1. 5. 2. Réduction du fer par la méthode de FRAP

La méthode de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), est caractérisée par un dosage colorimétrique du transfert d'électrons. Cette méthode repose sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) présent dans le ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en fer ferreux (Fe^{+2}) et la formation de ferrocyanure de potassium ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) comme le montre le schéma ci-dessous [59].

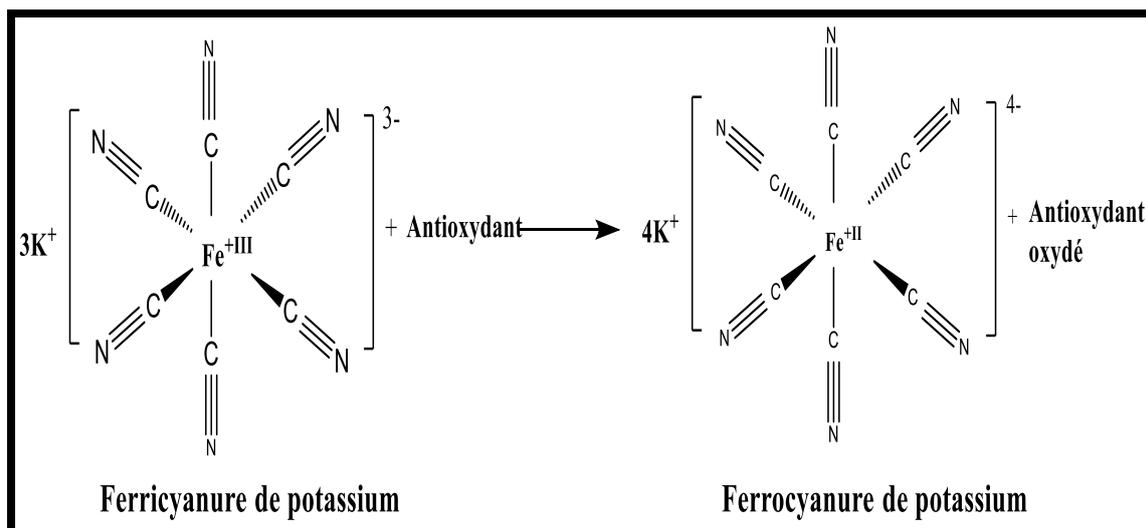
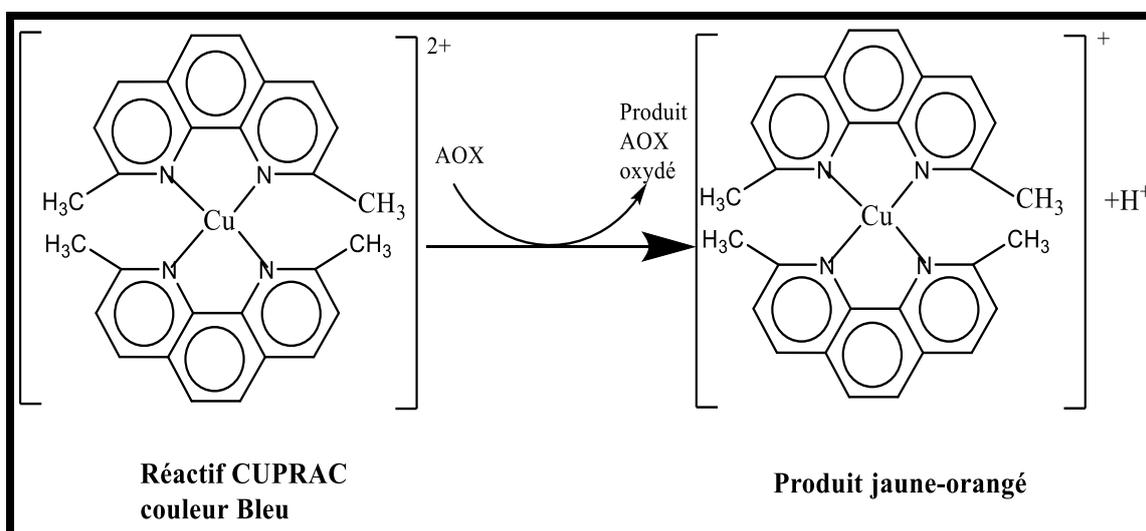


Schéma 2 : Mécanisme réactionnel de la réduction du fer.

II. 1. 5. 3. Réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC)

La méthode de CUPRAC (*Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity*), est une méthode employée pour la réduction des cations cuivriques (Cu^{2+}) à travers le traitement du Cu^{2+} avec un réactif chromogène Néocuproïne (NC) (2,9-diméthyle-1,10-phénanthroline) [60]. Ce test est basé sur la transformation des hydroxyles phénoliques en quinones par la réduction du complexe $[\text{Cu}^{2+}\text{-Nc}]$, produisant un complexe chromogène de $[\text{Cu}^{+}\text{-Nc}]$ qui absorbe à 450 nm comme l'explique le schéma ci-dessous.

Schéma 3 : Réduction du complexe chromogène de $[\text{Cu}^{2+}\text{-Nc}]$.

II. 1. 5. 4. Réduction par la formation du complexe Fe^{2+} -phénantroline

Dans cette méthode, la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) se fait en présence d'un antioxydant donneur d'électrons. La forme réduite du fer donne avec la 1, 10-

phénanthroline un complexe très stable intensément coloré en rouge-orangé appelé ferroïne [61]. L'absorbance de ce complexe est quantifiée photo- métriquement à une longueur d'onde de 510 nm.

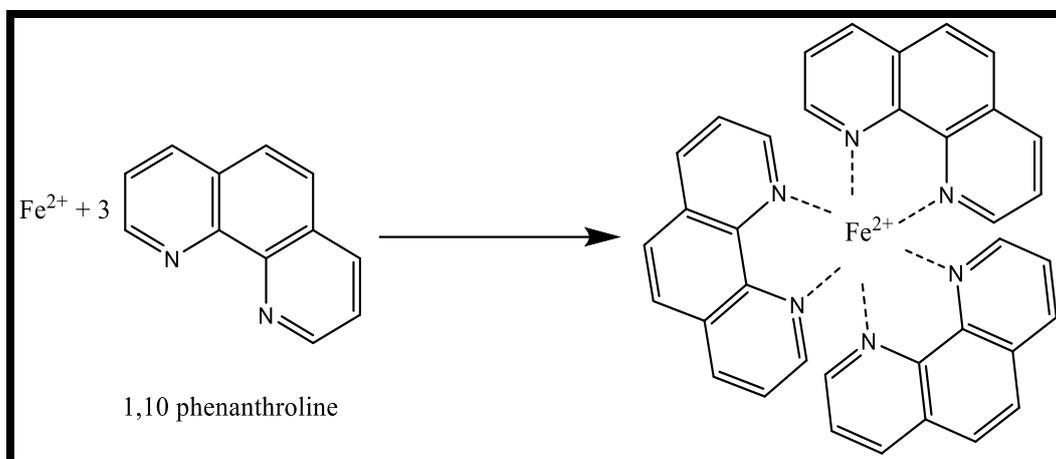


Schéma 4 : Formation du complexe Fe^{2+} -phénanthroline.

II. 2. Activité photo-protectrice

Approximativement, chaque année le cancer de la peau est diagnostiqué chez un million de personnes et parmi eux, environ 10.000 meurent de mélanome malin. La plupart des cancers de la peau se produit sur les parties du corps qui sont le plus souvent exposées au soleil, comme le visage, le cou, la tête et le dos des mains [62-64].

La nocivité des rayonnements solaires réside principalement dans la région ultraviolette (UV) du spectre électromagnétique. L'exposition à long terme aux rayonnements UV induit le stress oxydatif.

On rappelle que le domaine spectral s'étend de 200 à 400 nm, trois types de radiations UV ont été distingués en fonction de leurs activités biologiques et leur pouvoir de pénétration dans la peau :

a) UV-A : de longueur d'onde 320 à 400 nm,

b) UV-C : de longueur d'onde 200 à 280 nm, est la plus meurtrière pour tous les organismes vivants en raison de leur rayonnement électromagnétique énergétique élevé. Ces rayonnements sont principalement bloqués par la couche d'ozone située dans la stratosphère.

Le rayonnement **UV-B** de longueur d'onde 290 à 320nm, est le plus dangereux pour la peau humaine et largement responsable de l'érythème des coups de soleil et du bronzage de la peau. Lorsque la peau humaine est exposée au rayonnement UV-B, l'ADN des kératinocytes l'absorbe [65].

II. 2. 1. Écrans solaires

Pour prévenir les effets nocifs du soleil, les scientifiques ont formulé des crèmes et des lotions pour le corps où ils ont ajouté un écran solaire comme des ingrédients actifs pour protéger les gens en absorbant, en diffusant ou en réfléchissant les radiations solaires nocifs pour la peau.

Un écran solaire est aujourd'hui incorporé dans les produits utilisés quotidiennement à savoir hydratants, crèmes, lotions, huiles, shampooings, mousses et autres formulations pour les cheveux et la peau. Ils contiennent une large gamme de produits chimiques comme les composés organiques et leurs dérivés, les esters organiques, le sel et les composés inorganiques (minéraux) qui ont une absorbance particulière. Les molécules d'un écran solaire absorbent la plupart des UV-B et les empêchent d'atteindre la peau, tout comme les molécules de l'atmosphère qui absorbent les UV-C et les empêchent d'atteindre le sol [66-69].

II. 2. 2. Facteur de protection solaire (SPF)

L'efficacité des écrans solaires peut s'exprimer par le facteur de protection solaire (SPF). Le SPF est défini comme l'énergie UV requise pour produire une dose érythémale minimale (MED) dans la peau protégée, divisée par l'énergie UV requise pour produire un MED dans celle non protégée (Équation 1) [70]. Plus le SPF est élevé, plus le l'écran antisolaire est efficace pour prévenir le coup de soleil.

$$SPF = \frac{\text{dose capable de provoquer un érythème sur la peau protégée}}{\text{dose capable de provoquer un érythème sur la peau non protégée}}$$

La dose minimale d'érythème (MED) est la quantité de rayonnement UV qui produit un érythème minimal (coup de soleil ou rougeur causé par l'engorgement des capillaires) de la peau d'un individu dans les quelques heures suivant l'exposition au soleil [71].

II. 3. Activités anti-microbiologiques

Cette activité correspond à la capacité d'une molécule ou d'un composé qu'il soit un produit naturel ou synthétique à résister et inhiber l'attaque des microorganismes ou à les détruire. Elle est souvent corrélée à la présence des composés phénoliques, car une partie de ces composés possèdent un potentiel thérapeutique contre les bactéries, les virus et les champignons.

À l'heure actuelle, une majeure partie de la population mondiale dépend encore de la médecine traditionnelle et donc de l'utilisation des plantes à vertus médicinales principalement pour leurs activités antimicrobiennes [72].

II. 3. 1. Micro-organisme

Par définition, un micro-organisme ou microbe est un organisme vivant autonome, généralement formé d'une seule cellule, invisible à l'œil nu. Ce terme englobe une variété d'espèces qu'elles soient les protozoaires, les champignons microscopiques, les bactéries et les virus [73]. Ces micro-organismes ou appelés encore protistes sont représentés par deux grandes catégories selon leur structure cellulaire : les protistes supérieurs ou eucaryotes et les protistes inférieurs ou procaryotes [74].

II. 3. 2. Bactéries

Les bactéries sont définies comme des organismes microscopiques vivants qui ne sont constitués que d'une seule cellule : ces créatures unicellulaires vivent un peu partout dans l'environnement ; à la surface de la terre, des orifices de ventilation des profondeurs océaniques et aux voies digestives de l'homme. Leurs morphologies se caractérisent par l'absence de noyau membranaire et d'autres structures internes et sont donc classées parmi les formes de vie unicellulaires appelées procaryotes [75].

II. 3. 3. Champignons

Le terme "champignon" désigne un organisme constitué de cellules eucaryotes ayant une paroi cellulaire contenant de la chitine. Ce sont des hétérotrophes qui ne sont pas susceptibles de former de vrais tissus comme des plantes et des animaux plus complexes, comme ils peuvent se reproduire à la fois sexuellement et asexuellement [76].

II. 3. 4. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'efficacité d'un agent antimicrobien contre un microorganisme peut être fournie par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale létale (CML) (ou bactéricide CMB), qui sont respectivement, la concentration la plus faible capable d'empêcher le développement d'un microorganisme particulier et la concentration la plus faible capable de tuer le microorganisme [77].

II. 3. 4. 1. Méthode de diffusion

C'est une méthode qui se réalise *in-vitro*, basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme. Elle repose sur la diffusion du composé à effet antibactérien en milieu solide (milieu gélosé) réalisée dans une boîte de Pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'activité antibactérienne testée vis-à-vis la cible est appréciée par la mesure de la zone d'inhibition en millimètre tout autour du diamètre d'inhibition [78].

II. 3. 4. 2. Méthode de dilution

C'est la méthode de référence, d'évaluer des concentrations minimales inhibitrices à partir d'une gamme de concentrations de la substance antimicrobienne en milieu solide. Les essais de détermination de la CMI sont effectués selon la méthode de dilution standard sur milieu Mueller Hinton gélosé pour les bactéries et la gélose Sabouraud pour les levures. La plus faible concentration de la gamme produisant l'inhibition de la croissance d'un microorganisme est qualifiée de CMI [79].

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. Xu, Y. Ye, and W. Zhao, *Introduction to natural products chemistry*: CRC press, **2011**.
- [2] A. Alamgir, "Pharmacognostical Botany: Classification of medicinal and aromatic plants (MAPs), botanical taxonomy, morphology, and anatomy of drug plants," in *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1*, ed: Springer, **2017**, pp. 177-293.
- [3] S. E. O'Connor, "Engineering of secondary metabolism," *Annual review of genetics*, vol. 49, pp. 71-94, **2015**.
- [4] L. Katz and R. H. Baltz, "Natural product discovery: past, present, and future," *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, vol. 43, pp. 155-176, **2016**.
- [5] S.-T. Fung, C. K. Ho, S.-W. Choi, W.-Y. Chung, and I. F. Benzie, "Comparison of catechin profiles in human plasma and urine after single dosing and regular intake of green tea (*Camellia sinensis*)," *British journal of nutrition*, vol. 109, pp. 2199-2207, **2013**.
- [6] M. Badiaga, "Étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali," **2011**.
- [7] A. D. Smith, S. P. Datta, and G. H. Smith, *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*: Oxford University Press, **1997**.
- [8] Gilles Camus, Les acides aminés, Planet-Vie, Jeudi 16 mars **2006**, <https://planet-vie.ens.fr/article/1828/acides-amines>.
- [9] B. Jean, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*: Lavoisier, **2009**.
- [10] A. Fontaine, "Classification d'ARN codants et d'ARN non-codants," **2009**.
- [11] O. Thomas, "Métabolisme secondaire et Biosynthèse," ed: Master, **2009**.
- [12] J. Gee and I. Johnson, "Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health," *Current medicinal chemistry*, vol. 8, pp. 1245-1255, **2001**.
- [13] J. Bruneton, "Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales," **1993**.
- [14] S. Martin and R. Andriantsitohaina, "Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium," in *Annales de Cardiologie et D'angiologie*, **2002**, pp. 304-315.
- [15] Gérard Piquemal. « Les flavonoïdes ».phyto-aromathérapie.1 février **2010**. <<http://www.detoursante.com>>.
- [16] A. Pengelly, *The constituents of medicinal plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine*: Routledge, **2020**.
- [17] K. Ghedira, "Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique," *Phytothérapie*, vol. 3, pp. 162-169, **2005**.
- [18] H. Tapiero, K. Tew, G. N. Ba, and G. Mathe, "Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?," *Biomedicine & pharmacotherapy*, vol. 56, pp. 200-207, **2002**.
- [19] Y. Dacosta, *Les phytonutriments bioactifs: 669 références bibliographiques*: Ed. Yves Dacosta, **2003**.
- [20] J. Bruneton, "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)," *Tec & Doc/Lavoisier, Paris*, pp. 279-281, **2009**.
- [21] H. Liu, L. Zhang, and S. Lu, "Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats," *Molecules*, vol. 17, pp. 4281-4291, 2012.
- [22] H. A. Stafford, *Flavonoid metabolism*: CRC press, **1990**.
- [23] E. Wollenweber, R. Wehde, M. Dörr, G. Lang, and J. F. Stevens, "C-Methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae," *Phytochemistry*, vol. 55, pp. 965-970, **2000**.

- [24] J. Bruneton and D. H. R. Barton, *Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie: Technique et documentation*, **1987**.
- [25] C. A. Galán-Vidal, A. Castañeda-Ovando, M. Páez-Hernández, and E. Contreras-López, "Determination of Nitrites in Commercial Sausages by Anthocyanins Degradation: Experimental Design and Optimization," *Journal of the Mexican Chemical Society*, vol. 58, pp. 180-184, **2014**.
- [26] J.-J. Macheix, A. Fleuriet, and C. Jay-Allemand, *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*: PPUR presses polytechniques, **2005**.
- [27] F. REZINE and M. S. FEDAOUCHE, "Coumarines à intérêt thérapeutique: Synthèse et contrôle analytique," **2017**.
- [28] T. Hennebelle, S. Sahpaz, and F. Bailleul, "Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif," *Phytothérapie*, vol. 2, pp. 3-6, **2004**.
- [29] C. Remesy, C. Manach, C. Demigné, O. Texier, and F. Regeat, "Intérêt nutritionnel des flavonoïdes," *Médecine et nutrition*, vol. 32, pp. 17-27, **1996**.
- [30] A. Bouzid, R. Chadli, and K. Bouzid, "Étude ethnobotanique de la plante médicinale *Arbutus unedo* L. dans la région de Sidi Bel Abbés en Algérie occidentale," *Phytothérapie*, vol. 15, pp. 373-378, **2017**.
- [31] J.-M. Gazengel and A.-M. Orecchioni, "Le préparateur en pharmacie," *Guide théorique et pratique (2ème Edition. Ed. Lavoisier Paris)*, vol. 374, **2013**.
- [32] J. Bruneton, "Menthe in: Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., Tec & Doc, Paris," ISBN 978-2-7430-1188-8, **2009**.
- [33] M. D. D. Mangambu, K. Mushagalusa, and N. Kadima, "Contribution à l'étude photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, RD Congo)," *Journal of Applied Biosciences*, vol. 75, pp. 6211-6220, **2014**.
- [34] T. Aniszewski, *Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*: Elsevier, **2007**.
- [35] N. E.-H. Daira, M. C. Maazi, and A. Chefrou, "Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien," *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, vol. 85, pp. 276-290, **2016**.
- [36] M. C. Sheahan and M. W. Chase, "Phylogenetic relationships within Zygophyllaceae based on DNA sequences of three plastid regions, with special emphasis on Zygophylloideae," *Systematic Botany*, vol. 25, pp. 371-384, **2000**.
- [37] R. Ayad, "Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce," **2008**.
- [38] G. R. Pettit, D. L. Doubek, D. L. Herald, A. Numata, C. Takahasi, R. Fujiki, *et al.*, "Isolation and structure of cytostatic steroidal saponins from the African medicinal plant *Balanites aegyptica*," *Journal of Natural Products*, vol. 54, pp. 1491-1502, **1991**.
- [39] B. P. Chapagain, Z. Wiesman, and L. Tsrer, "In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi," *Industrial Crops and Products*, vol. 26, pp. 109-115, **2007**.
- [40] T. Ouafa, "Etude des propriétés phyto thérapeutique de la plante médicinale *Malva Sylvestris*," **2016**.
- [41] D. Smati, A. Longeon, and M. Guyot, "3 β -(3, 4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol, a cytotoxic constituent of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian Sahara," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 95, pp. 405-407, **2004**.
- [42] A. Engler, *Contribuzioni alla conoscenza della flora dell'Africa orientale*, **1897**.
- [43] R. Milcent, *Chimie organique hétérocyclique: structures fondamentales, chimie et biochimie des principaux composés naturels*: L'Editeur: EDP Sciences, **2003**.

- [44] H. Guo, X. Cai, and J. Qian, "A novel isoflavone from *Urophylluma chinensis*," *Journal of Chemical Research*, vol. 2007, pp. 24-25, **2007**.
- [45] W. ABDELLI, "Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*," Thèse de doctorat, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis, **2017**.
- [46] N. BEZZAZ, "Détermination structural des métabolites secondaires et extraction des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia*," Thèse de doctorat, Université de M'Sila-Mohamed Boudiaf, **2013**.
- [47] C. El Kalamouni, "Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées," **2010**.
- [48] D.-P. Xu, Y. Li, X. Meng, T. Zhou, Y. Zhou, J. Zheng, *et al.*, "Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources," *International journal of molecular sciences*, vol. 18, p. 96, **2017**.
- [49] J. Behera and C. Rao, "A Ni²⁺ (S= 1) Kagome compound templated by 1, 8-diazacubane," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 9334-9335, **2006**.
- [50] C. B. Scarim, D. H. Jornada, M. G. M. Machado, C. M. R. Ferreira, J. L. dos Santos, and M. C. Chung, "Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malaria," *European journal of medicinal chemistry*, vol. 162, pp. 378-395, **2019**.
- [51] L. Guo, M.-Y. Xie, A.-P. Yan, Y.-Q. Wan, and Y.-M. Wu, "Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 386, p. 1881, **2006**.
- [52] K. P. Svoboda and J. B. Hampson, "Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities," *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW*, vol. 16, pp. 1-7, **1999**.
- [53] G. Vansant, "Radicaux libres et antioxydants: principes de base," in *Symposium «Antioxydants et alimentation»*. Institut Danone, **2004**.
- [54] A. Favier, "Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique," *Actualité chimique*, pp. 108-117, **2003**.
- [55] J. Haleng, J. Pincemail, J.-O. Defraigne, C. Charlier, and J.-P. Chapelle, "Le stress oxydant," *Revue médicale de Liège*, vol. 62, pp. 628-38, **2007**.
- [56] J. Pincemail and J.-O. Defraigne, "Le Coenzyme Q10 ou ubiquinone: un antioxydant particulier," *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, vol. 8, pp. 55-60, **2003**.
- [57] B. Boyd, C. Ford, C. Koepke Michael, K. Gary, E. Horn, S. McAnelley, *et al.*, "Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé," *GlycoScience et Nutrition*, vol. 4, p. 7, **2003**.
- [58] N. Salah, N. J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G. P. Bolwell, and C. Riceevans, "Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 322, pp. 339-346, **1995**.
- [59] N. Pellegrini, M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, *et al.*, "Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays," *The Journal of nutrition*, vol. 133, pp. 2812-2819, **2003**.
- [60] A. A. Gouda and A. S. Amin, "Copper (II)-neocuproine reagent for spectrophotometric determination of captopril in pure form and pharmaceutical formulations," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 3, pp. 159-165, **2010**.

- [61] A. Szydłowska-Czerniak, C. Dianoczki, K. Recseg, G. Karlovits, and E. Szlyk, "Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods," *Talanta*, vol. 76, pp. 899-905, **2008**.
- [62] M. Allen and G. Bain, "Measuring the UV protection factor of fabrics,(1994), Retrieved March 25, **2008**," ed.
- [63] E. A. Dutra, E. R. M. Kedor-Hackmann, and M. I. R. M. Santoro, "Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry," *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 40, pp. 381-385, **2004**.
- [64] B. More, S. Sakharwade, S. Tembhurne, and D. Sakarkar, "Evaluation of Sunscreen activity of Cream containing Leaves Extract of Butea monosperma for Topical application," *International Journal of Research in Cosmetic Science*, vol. 3, pp. 1-6, **2013**.
- [65] A. Mishra, A. Mishra, and P. Chattopadhyay, "Herbal cosmeceuticals for photoprotection from ultraviolet B radiation: A review," *Tropical journal of pharmaceutical research*, vol. 10, **2011**.
- [66] F. Bernerd, C. VIOUX, F. LEJEUNE, and D. ASSELINEAU, "The sun protection factor (SPF) inadequately defines broad spectrum photoprotection: demonstration using skin reconstructed in vitro exposed to UVA, UVB or UV-solar simulated radiation," *European Journal of Dermatology*, vol. 13, pp. 242-249, **2003**.
- [67] A. Fonseca and N. Rafaela, "Determination of sun protection factor by UV-vis spectrophotometry," *Health Care*, vol. 1, p. 4, **2013**.
- [68] S. Kale, S. Bhandare, M. Gaikwad, V. Urunkar, and A. Rajmane, "Formulation and in vitro evaluation for sun protection factor of Lutein ester extracted from Tagetes erecta Linn flower (Family-Asteraceae) sunscreen creams," *Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*, vol. 2, pp. 947-955, **2011**.
- [69] P. N. Shenekar, P. S. Ukirade, S. D. Salunkhe, S. T. Sutar, C. Magdum, S. Mohite, *et al.*, "In vitro evaluation of sun protection factor of fruit extract of Carica papaya L. as a lotion formulation," *European Journal of Experimental Biology*, vol. 4, pp. 44-47, **2014**.
- [70] N. Shaath, *Sunscreens: Regulations and commercial development*: CRC Press, **2005**.
- [71] C. J. Heckman, R. Chandler, J. D. Kloss, A. Benson, D. Rooney, T. Munshi, *et al.*, "Minimal erythema dose (MED) testing," *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, p. e50175, **2013**.
- [72] N. OURAHMANE, "Contribution, l'étude de l'activité antimicrobienne de quelques extraits végétaux," Mémoire de Master, Université Abou-Bakr-Belkaïd Tlemcen **2012**.
- [73] C. Prigent-Combaret and P. Lejeune, "La génétique de la formation du développement des biofilms. În:«les biofilms (2)»," *Bull. Soc. Fr. Microbiol*, vol. 14, pp. 121-126, **1999**.
- [74] B. KHECHAI and S. SERAICHE, "L'évaluation des activités biologique de venin d'abeille local et l'Egypte," Mémoire de Master, Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila, **2019**.
- [75] K. Rogers, *Bacteria and viruses*: Britannica Educational Publishing, **2010**.
- [76] D. Brock and I. E. Alcamo, *Infectious fungi*: Infobase Publishing, **2006**.
- [77] S. Albayrak, A. Aksoy, O. Sagdic, and E. Hamzaoglu, "Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of Helichrysum (Asteraceae) species collected from Turkey," *Food Chemistry*, vol. 119, pp. 114-122, **2010**.
- [78] J. Cavallo, H. Chardon, and C. Soussy, "Communiqué du comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie," **2007**.
- [79] K. Oussou, S. Yolou, J. Boti, K. Guessennnd, C. Kanko, C. Ahibo, *et al.*, "Etude chimique et activité antidiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne," **2008**.

Chapitre II

Matériels et méthodes

I. MATÉRIEL

I. 1. Matériel végétal

I. 1. 1. Répartition et distribution géographique de la plante investiguée

La plante investiguée "*Clinopodium nepeta*", appartenant à la famille des Lamiaceae, est une plante médicinale buissonnante et rhizomateuse qui pousse dans le sud, l'ouest et le centre de l'Europe et dans l'est de l'Angleterre [1] ainsi que dans le nord algérien. Cette famille est la plus vaste des angiospermes incluant 236 genres et plus de 7000 espèces, qui se caractérisent par une tige quadrangulaire dépourvue d'épine. Ses feuilles sont opposées, décussées, ou rassemblées en verticille le long de la tige. Ses fleurs sont habituellement des tétramères ou des pentamères [2].

En outre, la famille de Lamiaceae est regroupée majoritairement des plantes méditerranéennes et même quelques espèces endémiques, comme elle peut être trouvée partout à l'échelle planétaire. Les secteurs typiques de croissance de ces espèces sont représentés par des climats tropicaux et tempérés [2] comme indiqué sur la figure 26.

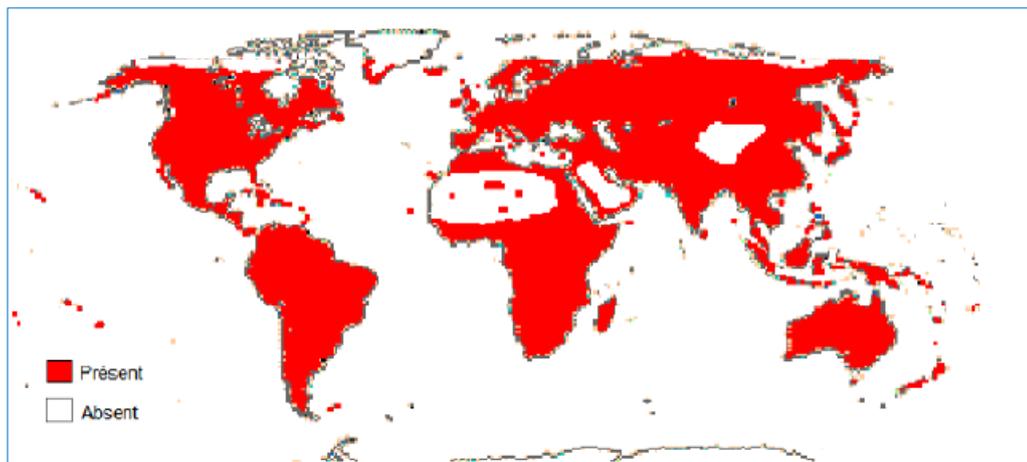


Figure 26 : Répartition géographique mondiale de la famille de Lamiaceae [3].

I. 1. 2. Intérêt pharmacologique, nutritionnel et commercial

Les espèces de Lamiaceae sont très utilisées en médecine traditionnelle universellement, au moyen de divers effets pharmacologiques avantageux qu'elles peuvent engendrer. Ces plantes médicinales sont employées comme des remèdes naturels, elles éliminent les douleurs superficiels, favorisent la circulation sanguine, induisent la diurèse et réduisent l'œdème [4]. En outre, ces herbes et leurs extraits sont utilisés comme des agents anti-tumoraux, antioxydants, antimicrobiens et anti-inflammatoires [5].

En raison de leurs propriétés physico-chimiques intéressantes, les huiles essentielles de cette famille ont capté les intérêts des chercheurs et de l'industrie pour leur usage en qualité de produits naturels. Ces huiles essentielles contiennent principalement divers composés terpéniques, ce qui rend ces plantes une source importante pour l'aromathérapie, la parfumerie et l'industrie des produits cosmétiques [6].

I. 1. 2. Description botanique

"*Clinopodium nepeta*" est une plante vivace pouvant atteindre 20 à 60 cm de hauteur, verte glabrescente, à une odeur agréable, d'où une tige grêle très rameuse. Ses feuilles sont petites, glabrescentes, ovales, courtement pétiolées, un peu ou presque entièrement dentelées et à glandes apparentes. Ses fleurs pales violacées ou blanches, petites en verticilles nombreux, écartés, compacts et pédoncules. Son calice est long de 3 mm environ, glabrescent, glanduleux, à poil de la gorge saillante, à dents très petites presque égales et glabres. Sa corolle dépassant de 7-8 mm la gorge du calice.

La figure ci-dessous illustre la description de cette plante.



Figure 27 : Photo de "*Clinopodium nepeta*".

I. 1. 3. Collecte de la plante

La plante a été récoltée durant sa période de floraison en mois d'Octobre 2018, dans la région d'Annaba. L'identification du matériel végétal a été faite par le Pr. LAOUER Hocine, du département de biologie à l'université de Sétif. La plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant deux mois. Après le séchage, la plante est finement broyée puis stockée jusqu'à leur utilisation.



Figure 28 : Capture par satellite de la région de récolte de "*Clinopodium nepeta*".

I. 1. 4. Travaux antérieurs effectués sur "*Clinopodium nepeta*"

Des études antérieures concernant la variabilité chimique de "*Clinopodium nepeta*", récoltée dans différentes régions, ont permis aux chercheurs d'étudier ses caractéristiques cytologiques [7], de découvrir ce qui permet l'apparition des galles de fleurs chez une plante [8] et de déterminer la composition chimique des huiles essentielles contenues dans cette plante ainsi que leur activité antifongique et insecticide [9].

Le tableau ci-dessous regroupe les résultats de ces études :

Tableau 1 : Résultats de ces études antérieures effectués sur la plante investiguée.

Année	Auteur	Travail
2011	Esra martin	Une étude caryologique [7].
2018	Umberto Bernardo	Une nouvelle espèce de cécidomyie des cécidomyies d' <i>Asphondylia</i> induire des galles de fleurs sur <i>Clinopodium nepeta</i> de l'Europe, de sa phénologie et des champignons associés [8].
2020	Haïfa Debbabi	Étude de la composition chimique et de l'activité antifongique et insecticide des huiles essentielles du <i>Clinopodium nepeta</i> Tunisienne [9].

I. 2. Matériel biologique

I. 2. 1. Souches bactériennes

I. 2. 1. 1. *Escherichia coli*

C'est l'une des bactéries la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très différents, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales [10]. La figure ci-dessous représente une photographie de cette bactérie faite à l'aide d'un microscope électronique.

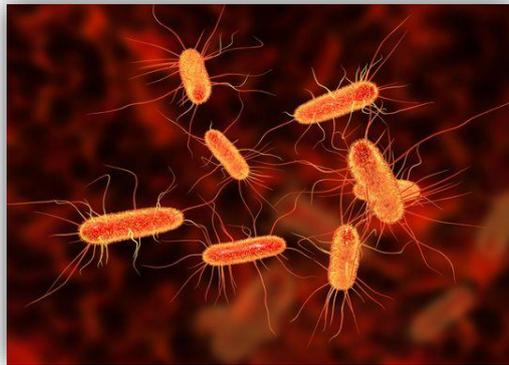


Figure 29 : *Escherichia coli* au microscope électronique .

I. 2. 1. 2. *Pseudomonas aeruginosa*

La *Pseudomonas aeruginosa* (figure 30), peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de plusieurs animaux. Considérée comme une bactérie pathogène opportuniste, c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales. Nous avons sélectionné cette bactérie pour notre étude en raison de sa résistance naturelle à plusieurs antibiotiques [11].

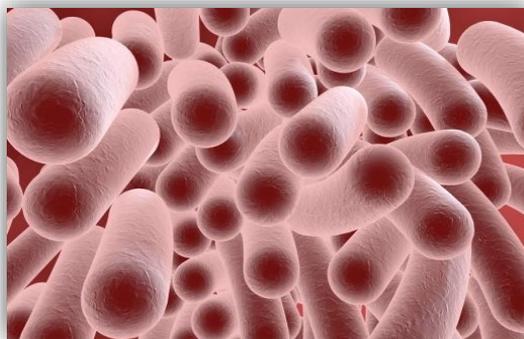


Figure 30 : *Pseudomonas aeruginosa* au microscope électronique.

I. 2. 1. 3. *Salmonella typhimurium*

C'est la première cause de toxi-infections alimentaires bactériennes collectives dans le monde, elle est l'une des préoccupations majeures des laboratoires de contrôle de qualité alimentaire. La *Salmonella typhimurium* (figure 31), est largement répandue dans les différents réservoirs animaux (porcs, bovins, volailles...) et dans certaines denrées destinées à l'homme [12].

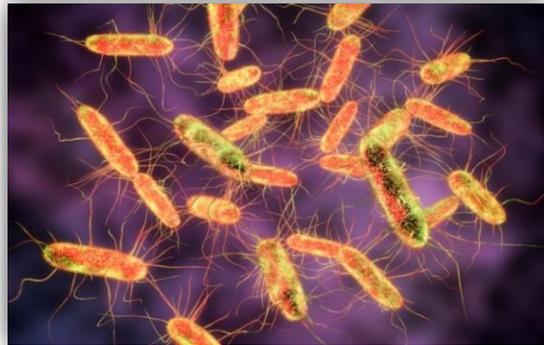


Figure 31 : *Salmonella typhimurium* au microscope électronique .

I. 2. 1. 4. *Klebsiella pneumoniae*

Ces bactéries présentes dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire de l'homme et des animaux comme bactéries commensales. La *Klebsiella pneumoniae* provoque des infections respiratoires (pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies) et des infections intestinales. Elle est également responsable d'infections nosocomiales. La figure ci-dessous illustre une image de cette bactérie.



Figure 32 : *Klebsiella pneumoniae* au microscope électronique.

I. 2. 1. 5. *Bacillus subtilis*

C'est une espèce de bactéries du genre *Bacillus* et de la famille des *Bacillaceae*. L'habitat naturel de cette bactérie est le sol, mais il est répandu aussi qu'elle vie dans de l'eau fraîche, les eaux côtières et les océans. Elle se développe à des températures allant de 10 à 55 °C avec des taux de croissance plus rapide à 42°C. La *Bacillus subtilis* (figure 33), n'est pas considéré comme pathogène pour l'homme, mais elle peut contaminer les aliments et peut exceptionnellement provoquer des intoxications alimentaires. Cette bactérie peut être impliquée dans diverses infections cliniques comme la méningite, l'otite, l'infection urinaire, la pneumonie, l'endocardite, l'abcès de l'orbite et la panophtalmie [13,14].

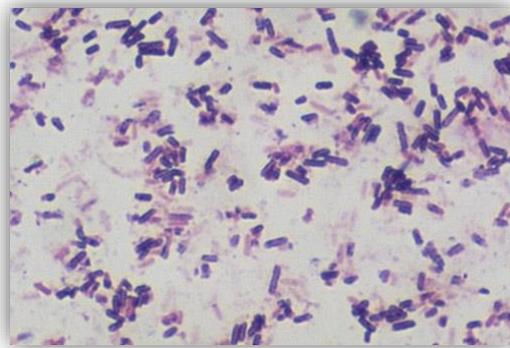


Figure 33 : *Bacillus subtilis* au microscope électronique.

I. 2. 2. Souches fongiques

I. 2. 2. 1. *Candida albicans*

C'est l'espèce de levure la plus connue du genre *Candida*. Elle est responsable de plus de 80 % des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées et les infections superficielles muco-cutanées [15].

La figure ci-dessous montre l'image de cette levure faite à l'aide d'un microscope électronique.

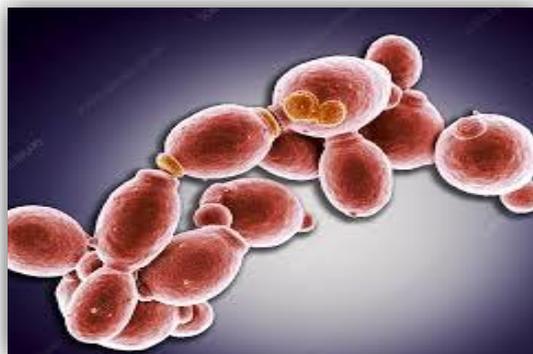


Figure 34 : *Candida albicans* au microscope électronique.

Le tableau suivant montre les différentes souches microbiennes testées.

Tableau 2 : Différentes souches microbiennes testées.

Souches testées	Références
<i>Escherichia coli</i>	ATCC_25922
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC_42238
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC_700603
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC_6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Isolat clinique
<i>Candida albicans</i>	Isolat clinique_F24
<i>Candida albicans</i>	Isolat clinique_F36

II. MÉTHODES

II. 1. Étude phytochimique

Cette partie du travail a été réalisée au sein du laboratoire des matériaux organiques et hétérochimie à l'université Larbi Tébessi-Tébessa.

II. 1. 1. Extraction des composés phénoliques

II. 1. 1. 1. Extraction solide-liquide

La matière végétale (Parties aériennes de la plante) a subi une macération dans un mélange hydro-méthanolique (MeOH /H₂O; 70:30; V/V) durant 24 heures. Cette opération a été répétée trois fois. Après chaque filtration, les filtrats obtenus sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite à 40 °C. L'extrait brut obtenu a été dilué avec 300 mL d'eau distillée bouillante pour obtenir une solution aqueuse et tenu au repos pendant une nuit. Cette opération est effectuée pour se débarrasser aussi bien de la chlorophylle que de la matière grasse.

II. 1. 1. 2. Extraction liquide-liquide

Des extractions liquide-liquide ont été effectuées successivement sur la phase aqueuse, dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants de polarité croissante, commençant par l'éther de pétrole, ce dernier solubilise tous les constituants lipophiles ainsi que le reste de la chlorophylle, ensuite avec le dichlorométhane, puis l'acétate d'éthyle, et enfin avec le n-

butanol. Chaque extraction est répétée trois fois. Les fractions récupérées sont concentrées et pesés.

Le schéma suivant illustre le protocole opératoire de l'extraction des composés phénolique :

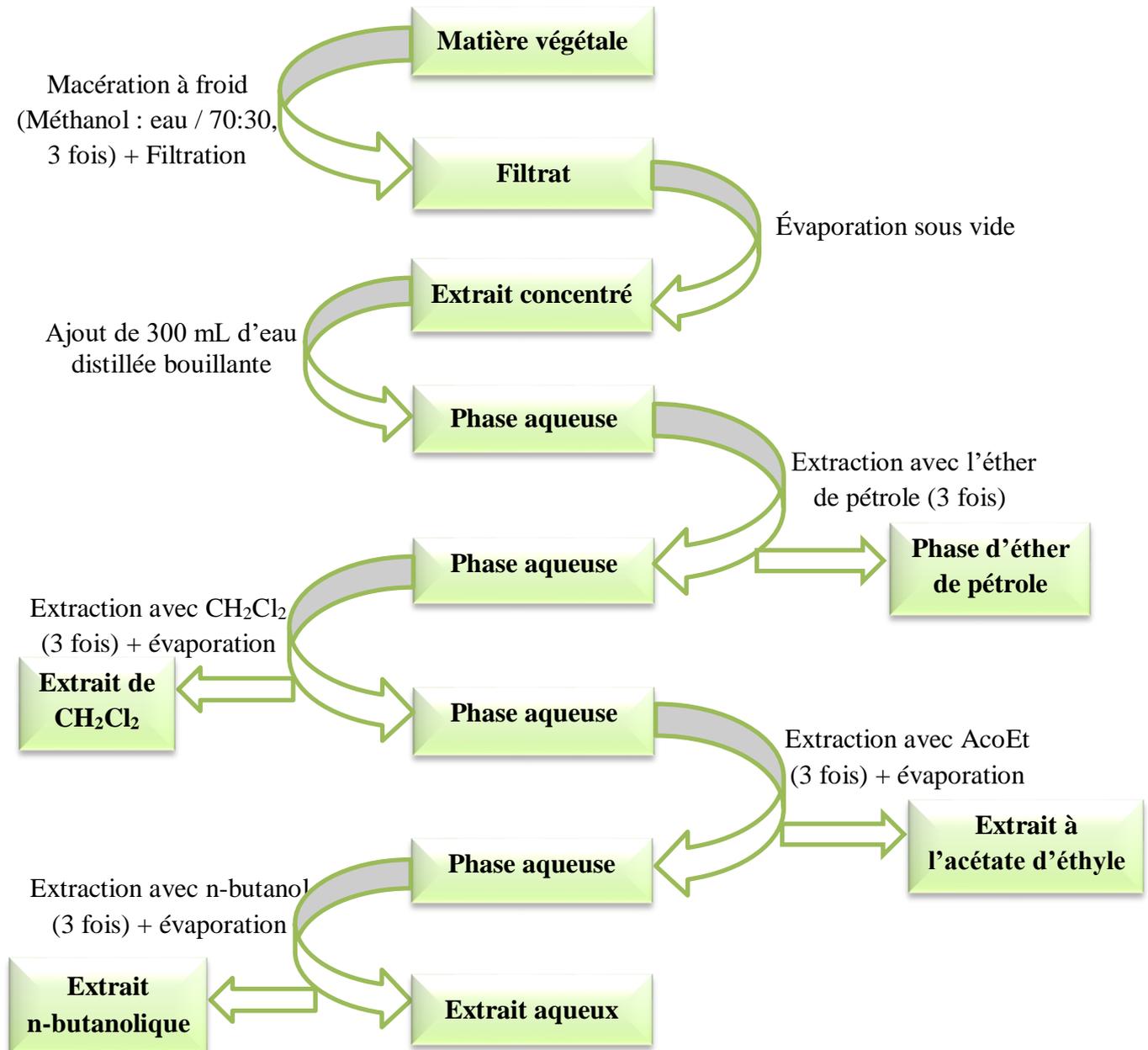


Schéma 5 : Protocole d'extraction des composés phénoliques.

II. 1. 2. Rendement

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage du principe actif dissout dans le solvant organique utilisé pour l'extraction. En pratique, il est déterminé à partir du poids de

l'extrait sec après évaporation par rapport au poids de la matière végétale sèche rendue en poudre utilisée pour l'extraction [16]. Le rendement peut être calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = [m / M_0] \times 100 \quad (1)$$

Où **R %**, est le rendement des extraits en pourcentage ; **m**, la masse en gramme de l'extrait sec ; **M₀**, la masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en gramme.

II. 1. 3. Screening phytochimique

Le dépistage phytochimique est le moyen indispensable de base pour mettre en évidence la présence des différentes familles de composés chimiques existantes dans la plante étudiée. Le principe de ce dépistage repose soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur des réactions de coloration, ainsi que des examens sous lumière ultraviolette.

Dans ce travail et pour la réalisation des tests de dépistage, 50 g de matière végétal a été soumis aux différents voies de macérations dans 300 mL de solvant. Les extraits utilisés pour les essai ont été obtenus après une ébullition à reflux pendant une heure suivie d'une filtration du mélange [17].

II. 1. 3. 1. Macération à l'eau distillée

© Recherche d'amidons

La mise en évidence de la présence d'amidon est fondée sur le chauffage de 5 mL d'extrait aqueux avec 10 mL d'une solution saturée de NaCl dans un bain-marie jusqu'à ébullition. Ensuite le réactif d'amidon a été ajouté. L'apparition d'une coloration bleu violacé indique un test positif [17].

© Recherche des saponosides

La détection des saponosides est déterminée par le test de la mousse, en ajoutant 1,5 mL d'eau distillé à 2 mL de l'extrait aqueux, puis la solution est agitée vigoureusement. Après 20 minutes la teneur en saponosides est évaluée comme suite [17] :

- ✓ Pas de mousse = test négatif.
- ✓ Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif.
- ✓ Mousse de 1-2 cm = test positif.
- ✓ Mousse plus de 2 cm = test très positif.

© Recherche des tanins galliques

La détection des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 mL de l'extrait aqueux, 1

mL d'eau distillée et 1 à 2 gouttes de solution diluée de FeCl_3 . En présence de tanins galliques, il se développe une coloration bleu-vert [17].

II. 1. 3. 2. Macération à l'éthanol

© Recherche d'alcaloïdes (sels)

Les alcaloïdes sont détectés à l'aide des réactifs de Mayer ou Wagner. 20 mL d'extrait éthanolique sont évaporés, puis 5 mL d'HCl (10 %) sont ajoutés au résidu obtenu pour chauffer le mélange dans un bain marie à 60 °C.

- ✓ Le mélange filtré et alcalinisé avec quelques gouttes d'une solution de NH_4OH (10%) jusqu'à attendre un $\text{pH} = 9$.
- ✓ Une extraction de la solution avec l'éther diéthylique est faite par la suite, puis concentration à sec de cette solution.
- ✓ Subséquemment, le résidu obtenu est dissout dans du HCl (2%), puis tester la présence des alcaloïdes par les réactifs de Mayer et de Wagner.
- ✓ La formation d'un précipité blanc et d'un précipité brun successivement avec ces réactifs indique la présence des alcaloïdes [17].

© Recherche des tanins catéchiques

Les tanins catéchiques sont révélés par l'addition de 1 mL d'extrait éthanolique à 2 mL d'eau distillée, puis rajouter 2 à 3 gouttes de solution diluée de FeCl_3 . Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration verte ou bleu-vert [17].

© Recherche des flavonoïdes

Quelques gouttes d'acide chlorhydrique et des copeaux de magnésium sont ajoutés à 5 mL de l'extrait à tester. L'apparition d'une coloration rose, rouge ou jaune indique la présence des flavonoïdes [18,19].

© Recherche des composés réducteurs

La détections de ces composés est réalisée en ajoutant 1 mL d'extrait éthanolique à 2 mL d'eau distillée, puis 20 gouttes de liqueur de Fehling. L'apparition d'un précipité rouge brique après le chauffage au bain marie indique un test positif [17].

© Recherche des coumarines

Le test consiste à évaporer à sec 5 mL de la solution extraite et dissoudre le résidu obtenu dans 1 mL d'eau chaude. Le volume obtenu est divisé en deux parties, l'une sert de témoin et l'autre est ajoutée à 0.5 ml de NH_4OH (10%), ensuite mettre deux tâches sur un

papier filtre et les examiner sous la lumière UV. La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence intense [17].

© *Recherche des stérols et stéroïdes*

La détection de ces composés peut être effectuée selon le protocole opératoire suivant :

- ✓ Evaporer à sec 10 mL d'extrait éthanolique.
- ✓ Traiter le résidu obtenu avec 10 mL de chloroforme anhydre puis filtrer le mélange.
- ✓ Mélanger 5 mL de la solution chloroformique avec 5 mL d'anhydride acétique.
- ✓ Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré.
- ✓ Agiter, puis laisser la solution reposer.
- ✓ Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration temporaire violacée, virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21 °C) [17].

II. 1. 3. 3. Macération a l'éther diéthylique

© *Recherche des huiles volatiles*

Pour la détection des huiles volatiles, évaporer à sec 20 mL de l'extrait éthérique, ensuite dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool et concentrer à sec la solution alcoolique obtenue. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu aromatique [17].

© *Recherche d'alcaloïdes (bases)*

La présence des alcaloïdes (bases) est révélée à partir de 10 mL d'extrait porté à ébullition. Ensuite, le résidu obtenu est dissout dans 1,5 mL d'HCl (2%) et 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer sont ajoutées. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence d'alcaloïdes bases [17].

II. 2. Activités biologiques

Cette partie du travail a été réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie au sein du centre de recherche en biotechnologie à Constantine (CRBt). Les mesures des absorbances des activités biologiques ont été faites à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits de marque Perkin Elmer (USA) avec son logiciel EnSpire.

II. 2. 1. Détermination des polyphénols et flavonoïdes totaux

Pour la préparation des concentrations des différents extraits de la plante étudiée : une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 mL de méthanol.

II. 2. 1. 1. Détermination des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif "Folin – Ciocalteu". Selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller et *al.* (2010) [20].

Le réactif utilisé est un acide de couleur jaune composé par un mélange de complexe d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, en présence de polyphénols en un nouveau mélange de complexe bleu d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) qui possède une absorption maximale aux environs de 760 nm. Une augmentation de l'absorbance est proportionnelle à l'augmentation de la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux .

- **Procédure :**

Dans une microplaque à 96 puits, un volume de 20 μ L d'extrait de plante est ajouté à 100 μ L de FCR dilué (1:10), puis on additionne 75 μ L de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5%). Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (méthanol). Le mélange est laissé au repos pendant 2 heures à l'obscurité et l'absorbance est mesurée à 760 nm. Le schéma suivant illustre la procédure suivie pour le dosage des polyphénols totaux.

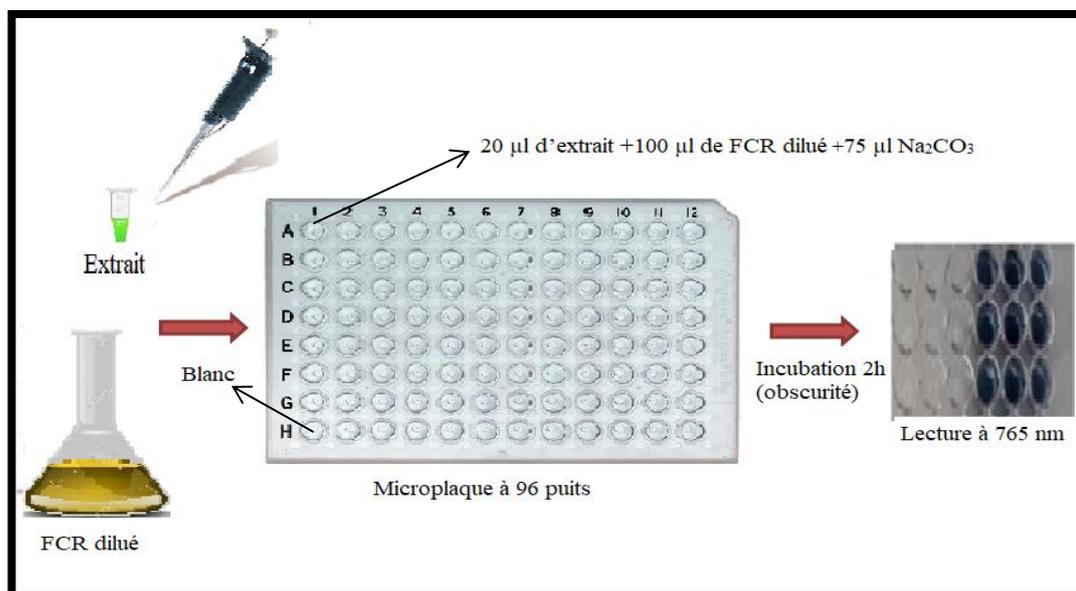


Schéma 6 : Procédure de dosage des polyphénols totaux.

II. 2. 1. 2. Détermination des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux dans les extraits a été déterminé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) [21]. Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe entre les ions Al^{3+} et les flavonoïdes ce qui forme un complexe jaune.

- **Procédure :**

On rajoute 50 μL d'extrait à un mélange de 130 μL de méthanol, 10 μL d'une solution 1M d'acétate de potassium (CH_3COOK) et 10 μL de nitrate d'aluminium à 10%. Un blanc est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 μL extrait + 150 μL méthanol) et le tout a été incubé pendant 40 minutes et l'absorbance est mesurée à 415 nm. Le schéma suivant illustre la procédure suivie pour le dosage des flavonoïdes totaux.

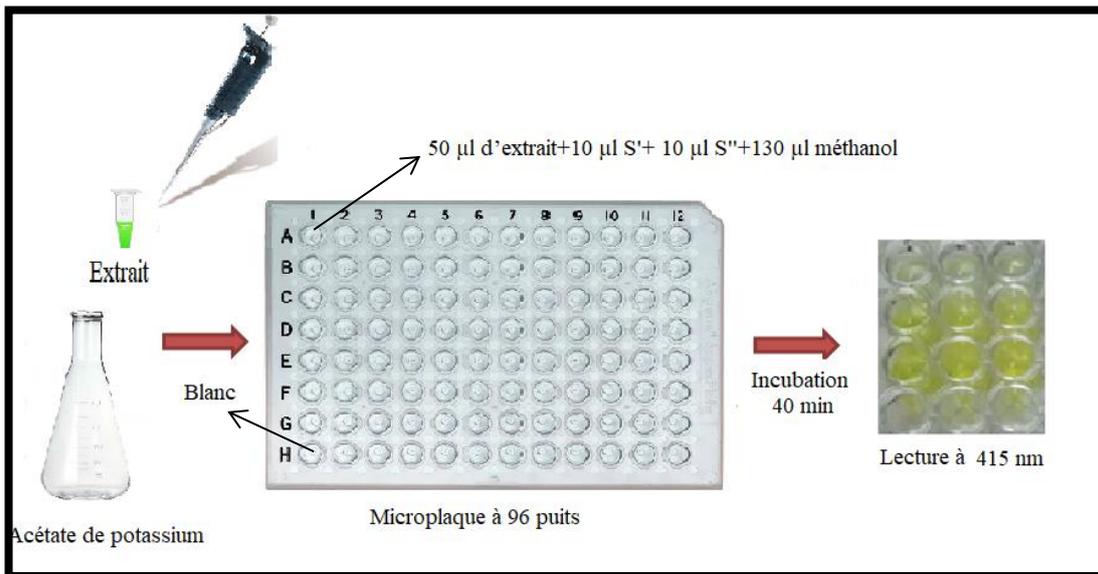


Schéma 7 : Procédure de dosage des flavonoïdes totaux.

II. 2. 2. Détermination de l'activité antioxydante

L'étude de l'activité antioxydante de la plante "*Clinopodium nepeta*" a été testée selon quatre méthodes : piégeage du radical libre DPPH^{*}, méthode CUPRAC, pouvoir antioxydant par la réduction du fer (FRAP), réduction du fer par la formation du complexe Fe⁺²-phénanthroline.

- **Préparation des concentrations :**

La concentration des solutions mères de chaque échantillon pour les quatre méthodes est exprimée en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Dans ce travail, on a utilisé une solution mère de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour le piégeage du radical libre DPPH^{*}, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour la méthode CUPRAC et la réduction par la formation du complexe Fe⁺²-phénanthroline et une autre de 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour le pouvoir réducteur du fer (FRAP).

La dilution en série des solutions mère a été réalisée dans des eppendorf en plastique, une masse bien déterminée de chaque extrait, a été dissoute dans 1 mL du méthanol, ensuite

une série de dilution de un demi (1/2) a été effectuée dans une "plaque de préparation". On note que sept concentrations différentes de l'échantillon en ordre décroissant ont été obtenues de chaque solution comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : Représentation de la dilution en série des différentes concentrations des extraits testés pour les méthodes testés.

Méthodes	[C] µg/mL (Solution mère)	Concentration dans le milieu réactionnel en µg						
		1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Test DPPH'	500µg/mL	100 µg	50 µg	25 µg	12.5 µg	6.25 µg	3.125 µg	1.5625 µg
Test CUPRAC	1000µg/mL	200 µg	100 µg	50 µg	25 µg	12.5 µg	6.25 µg	1.5625 µg
Test Phénantroline	1000µg/mL	50 µg	25 µg	12.5 µg	6.25 µg	1.5625µg	1.5625µg	0.78125µg
Test FRAP	4000µg/mL	200 µg	100 µg	50 µg	25 µg	12.5 µg	6.25 µg	1.5625 µg

Afin de préparer les différentes dilutions, les extraits déposés en triplicata (chaque concentration dans trois puis) sur une microplaque à 96 puits. Le schéma suivant illustre le protocole de dilution en série et l'inoculation de la microplaque.

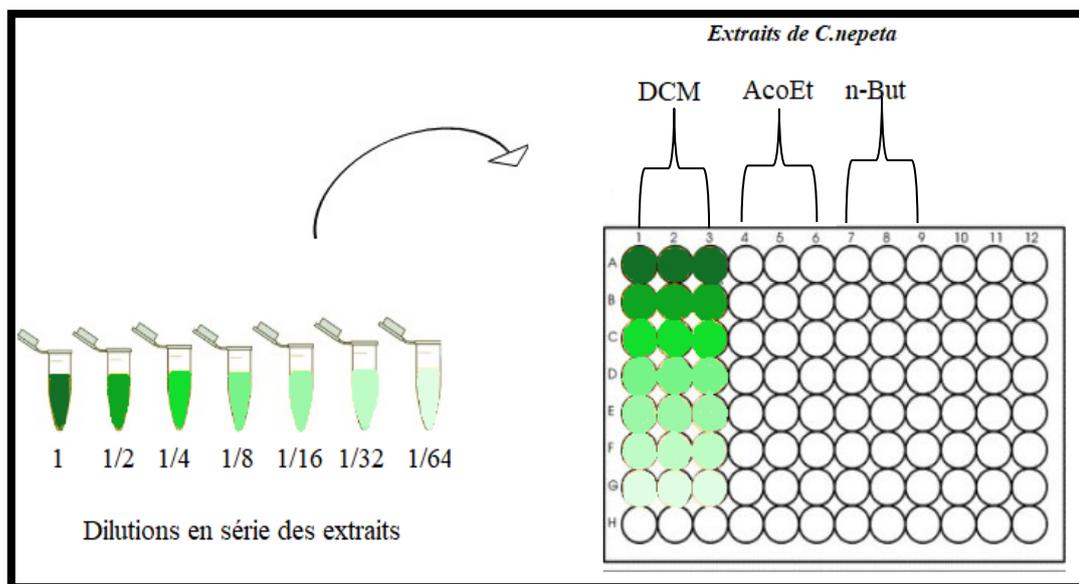


Schéma 8 : Représentation schématique de la dilution en série et l'inoculation de la microplaque.

II. 2. 2. 1. Piégeage du radical libre DPPH'

L'évaluation de l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres a été menée selon la méthode décrite par Blois (1958). Cette méthode est basée sur la réduction d'un radical libre DPPH^{*} (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). On note que le DPPH^{*} de couleur violette présente une absorption à 517 nm dans le méthanol, devient jaune quand il est réduit par des antioxydants en (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) [22].

- **Préparation de DPPH^{*}:**

Une masse de 6 mg de DPPH^{*} a été dissoute dans un volume de 100 mL de méthanol et gardé à l'abri de la lumière. La valeur de l'absorbance de la solution préparé a été de 0,50 à 517 nm.

- **Procédure :**

Après la préparation de la solution de DPPH^{*}, un volume de 40 µL des différentes concentrations de chaque extrait, a été déposé sur la microplaque, puis un volume de 160 µL de la solution méthanolique de DPPH^{*} a été rajouté dans chaque puits. En même temps le blanc est préparé de la même façon seulement on remplace l'extrait par 40 µL de méthanol. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à une longueur d'onde de 517 nm.

Pour évaluer le pouvoir antioxydant de nos extraits, le BHA et le BHT sont utilisés comme standards antioxydants et le pourcentage d'inhibition (PI%) est calculé par la relation suivante :

$$PI\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ extrait) / Abs\ contrôle] \times 100 \quad (2)$$

Où **PI %**, est le pourcentage de l'activité antiradicalaire,

Abs Contrôle : l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs,

Abs extrait : l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

Le schéma suivant illustre la procédure du test de piégeage du radical libre DPPH^{*}.

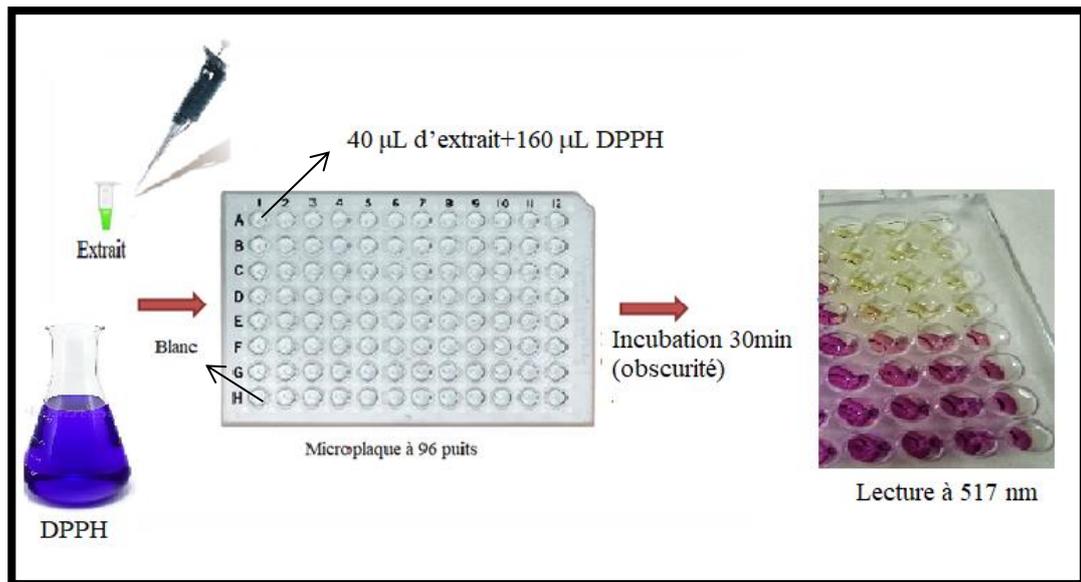


Schéma 9 : Procédure du test de piégeage du radical libre DPPH[•].

II. 2. 2. 2. Pouvoir réducteur de fer par la méthode FRAP

Le pouvoir antioxydant réducteur du fer (Fe^{3+}) résidant dans les extraits a été déterminé selon la méthode mise au point par Aicha Bouratoua [23]. Cette méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferricyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune à la couleur bleu-vert.

• Procédure :

Un volume de 10 μL des différentes concentrations de chaque extrait est déposé dans les puits sur la microplaque. 40 μL d'une solution de tampon phosphate (0,2 M (pH 6,6) et 50 μL d'une solution de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] à 1% sont ajoutés dans chaque puits par la suite. Le mélange obtenu est incubé dans l'étuve pendant 20 minutes à 50°C. Ensuite 50 μL de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10%, 40 μL d'eau distillée et 10 μL d'une solution aqueuse de chlorure ferrique FeCl_3 à 0,1% sont additionnés et un blanc ou l'extract est remplacé par le méthanol est préparé aussi. La lecture de l'absorbance des mélanges se fait à 700 nm.

L'acide ascorbique et l' α -tocophérol sont utilisés comme des standards antioxydants de références.

Le schéma suivant illustre la procédure du test de Pouvoir réducteur.

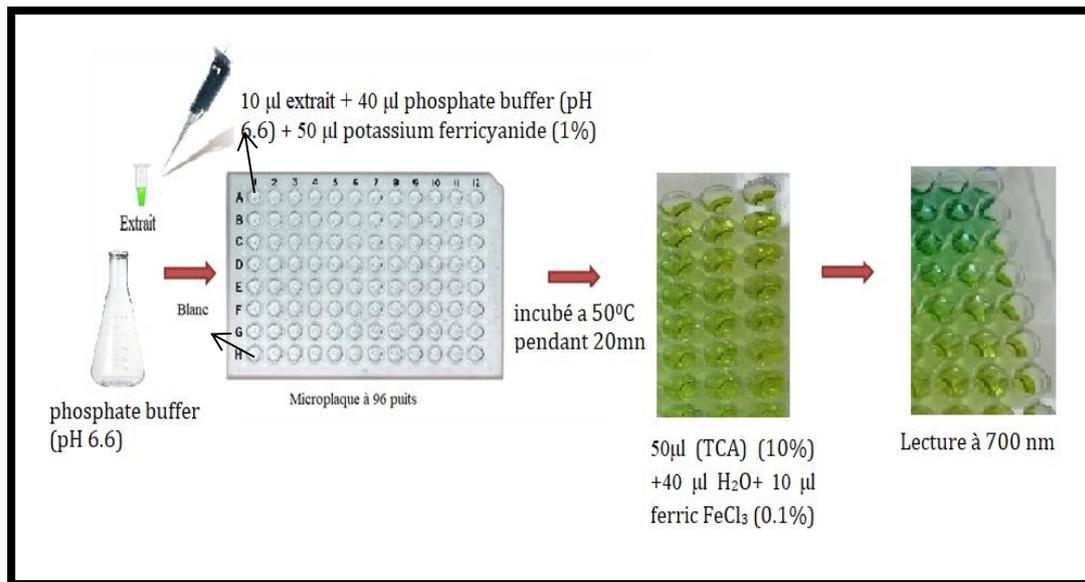


Schéma 10 : Procédure du test de Pouvoir réducteur (FRAP).

II. 2. 2. 3. Réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC)

L'estimation de l'activité antioxydante dans la méthode CUPRAC décrite par Apak et *al*, vise la réduction du cuivre. Cette méthode basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe [Nc₂-Cu⁺²]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-néocuproïne est réduit et cette réaction est quantifiée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm [24].

• Procédure :

Un mélange réactionnel contenant 60 µL de la solution S₁ (S₁ : 1 M, d'une solution tampon d'acétate d'ammonium, pH = 7,0), 50 µL de la solution S₂ (S₂ : 7,5 mM d'une solution de néocuproïne) et 50 µL d'une solution S₃ (S₃ : 10 mM d'une solution de chlorure de cuivre), est ajouté à 40 µL de chaque extrait des différentes concentrations pour atteindre un volume total de 200 µL. Un blanc est préparé au même temps en remplaçant l'extrait par du méthanol. Après une heure d'incubation, l'absorbance est mesurée à 450 nm et les résultats obtenus ont été calculés à titre de A_{0,50} (µg/mL) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

Pour valoriser le pouvoir anti-radicalaire de nos extraits, le BHA et le BHT sont utilisés comme standards antioxydants. Le schéma suivant illustre la procédure du test CUPRAC.

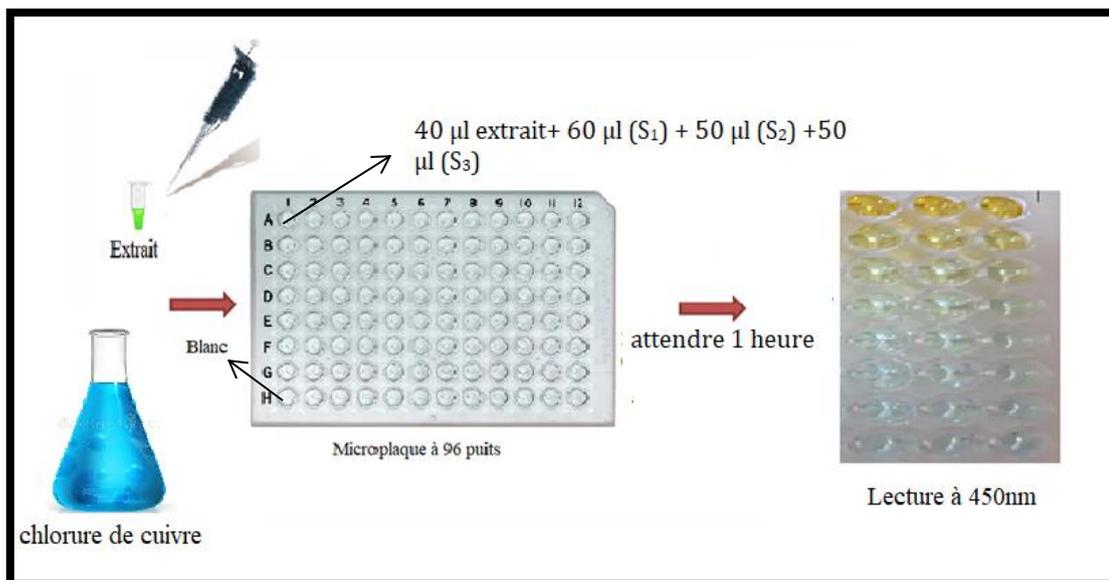


Schéma 11 : Procédure du test de réduction du complexe cuivre-néocuproïne.

II. 2. 2. 4. Réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phénanthroline

L'activité antioxydante estimée à partir de la réduction du fer par la formation du complexe Fe^{+2} -phénanthroline des extraits, a été menée selon la méthode décrite par Szydłowska-Czerniaka (2008) [25].

- **Procédure :**

Le test consiste à mélanger, 10 μL de différentes concentrations de chaque extrait à 50 μL FeCl_3 (0.2%), suivie par l'ajout de 30 μL de phénanthroline (0.5%) et 110 μL de méthanol. L'ensemble a été agité vigoureusement. Un blanc est préparé en parallèle, où l'extrait est remplacé par le méthanol et l'absorbance est lue à 510 nm après une incubation de 20 min à l'étuve et à température de 30°C. Les résultats ont été calculés à titre de $A_{0.5}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards antioxydantes.

Le schéma suivant illustre la procédure du test phénanthroline.

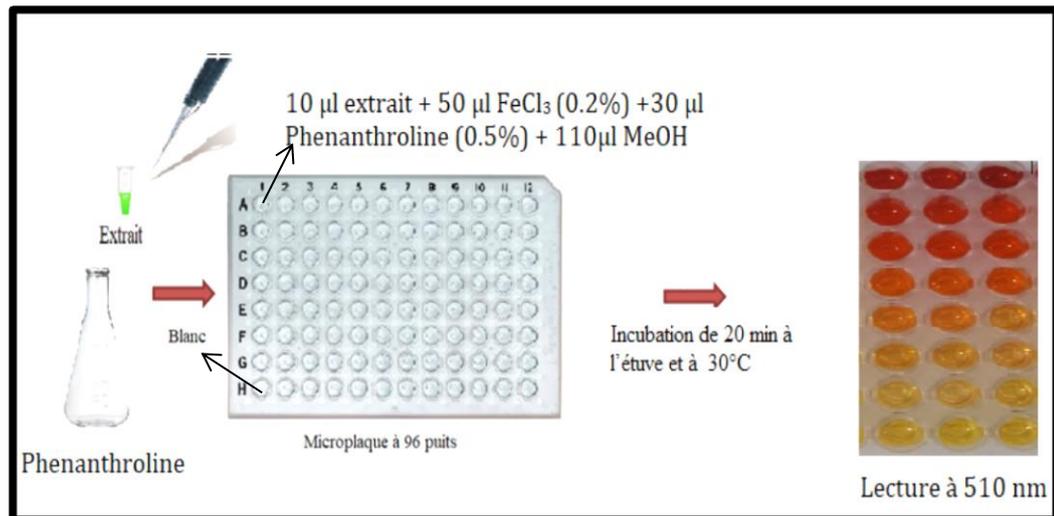


Schéma 12 : Procédure du test de la réduction du fer par la formation du complexe Fe^{+2} -phénanthroline.

II. 2. 3. Détermination du facteur de protection solaire (SPF)

L'activité photoprotectrice est menée selon le protocole décrit par Mansur et *al.* (1986). Le facteur de protection solaire d'un écran solaire (Sun Protection Factor, SPF), est une évaluation de l'efficacité des photoprotecteurs envers des effets d'exposition à courts termes à des rayonnements UV. Ce facteur indique le taux de protection anti-UV-B conféré par le produit testé.

Les valeurs SPF ont été déterminées au moyen de l'équation de Mansur [26,27] (Équation 3).

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (3)$$

Où, **EE**: spectre d'effet érythémal,

I : spectre d'intensité solaire,

Abs : absorbance du produit solaire,

CF: facteur de correction (= 10).

- **Procédure** :

Une masse de 2 mg de chaque extrait a été dissoute dans 1 mL de méthanol. La mesure de l'absorbance se fait dans l'intervalle de 290 à 320 chaque 5 nm (UV-B) et la valeur du SPF est calculée par l'application de l'équation mathématique précédente (3).

Les valeurs d'EE x I sont constantes et prédéterminées par Sayre et al. [28] et sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Fonction normale des constantes utilisée dans le calcul de la SPF [26, 27, 29].

Longueur d'onde λ (nm)	EE (λ) x I(λ) (Normes)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180
Totale	1

II. 3. Activités anti-microbiologiques

Cette partie du travail a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie à l'Université Larbi Tébessi –Tébessa.

II. 3. 1. Activité antimicrobienne

Afin d'estimer le pouvoir antibactérien et antifongique des extraits de "*Clinopodium nepeta*", une étude *in-vitro* de la capacité des composés bioactifs contenus dans cette plante a été effectuée.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée selon la méthode de diffusion sur disque où les disques sont imbibés de 10 μ L de chaque extrait [30].

II. 3. 1. 1. Activité antibactérienne

a) Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture, Mueller-Hinton (MH) est le plus approprié pour cette étude. La préparation de ce milieu se fait de la manière suivante : une masse de 38 g de MH est dissoute dans un litre d'eau distillée. Une ébullition du mélange sous agitation est effectuée jusqu'à dissolution complète pour homogénéiser la suspension. Ensuite le volume obtenu est réparti dans des flacons, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C. La figure suivante représente la méthode de préparation du milieu de culture (Figure 35).

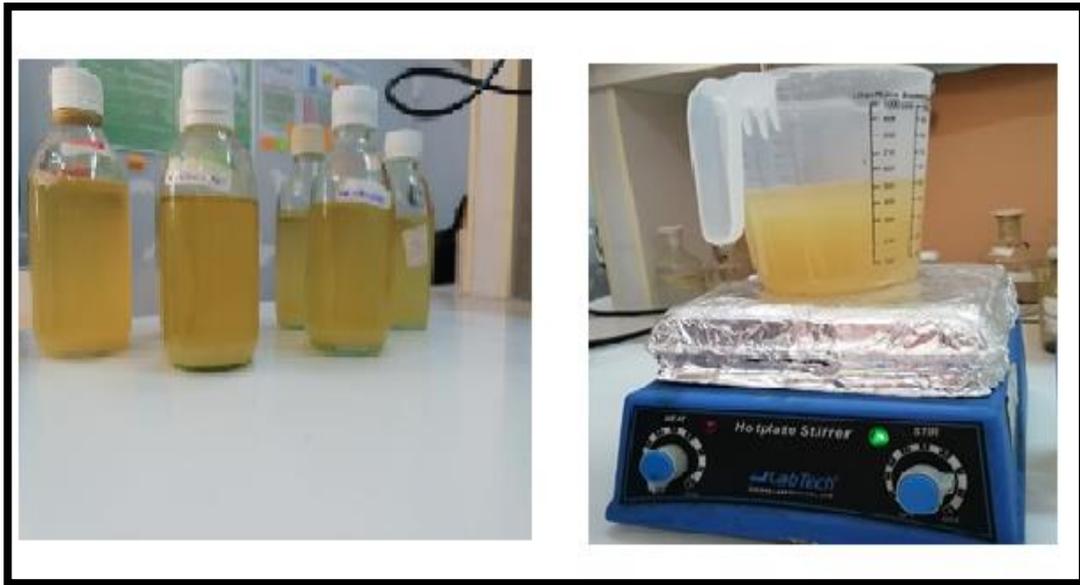


Figure 35 : Préparation du milieu de culture.

b) Stérilisation du matériel

Le milieu de culture, l'eau physiologie, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et des disques en papier Wattman, ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

c) Préparation des extraits

Une masse de 2 mg de chaque extrait de plante est dissoute dans 1 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO, 10%).

d) Préparation d'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et introduites dans l'étuve à 37°C durant 24h, pour optimiser leur croissance. Après incubation, quelques colonies bien isolées et du même type morphologique sont prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et dispersées dans 10 mL d'eau physiologique dans un tube à essai stérile et on homogénéise la suspension bactérienne [31].

La figure suivante représente la procédure de préparation d'inoculum :

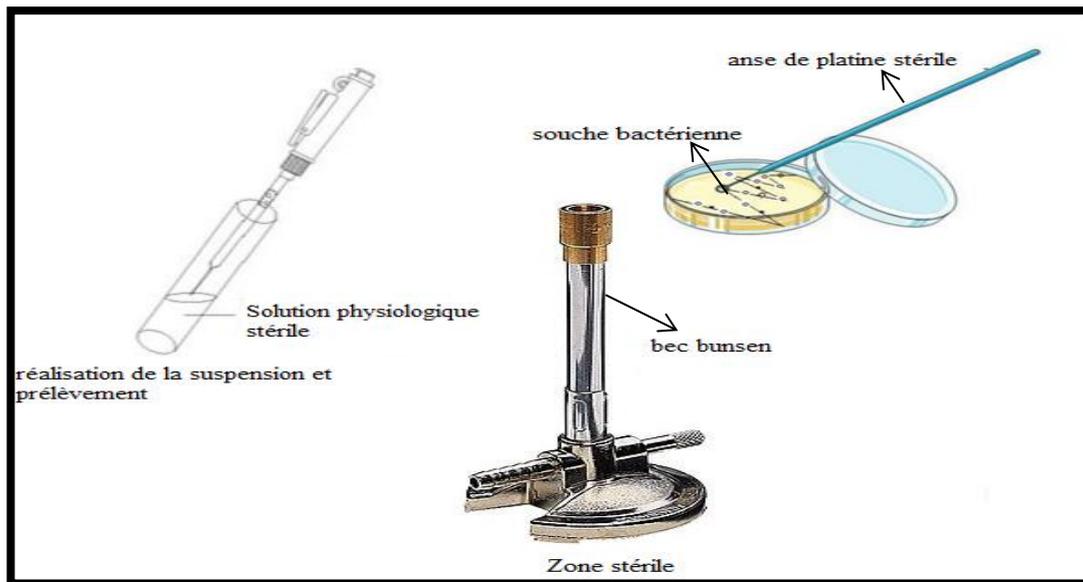


Figure 36 : Procédure de préparation d'inoculum.

e) Ensemencement et dépôt des disques

Dans une zone stérile et dans un flux laminaire au bec Bunsen, déposer un volume de 13 mL de MH dans chaque boîte de Pétri (épaisseur de la couche 5 mm), puis laisser sécher à température ambiante pendant quelques minutes. Ensuite plonger un écouvillon dans la suspension de la souche microbienne à ensemenecer, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube, réaliser des stries parallèles aussi serrées que possible à la surface d'une boîte préalablement coulée avec l'MH. Le procédé est répété deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'écouvillon est rechargé à tous coups qu'on ensemenecer plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche [32].

A l'aide d'une pince flambée au bec Bunsen, des disques en papier Wattman, de 6 mm de diamètre, sont imprégnés de 10 μ L de chaque extrait à tester et déposés délicatement à la surface de la boîte précédemment ensemenecée. Finalement, un disque témoin imprégnés de DMSO à 10% est déposé sur la même boîte.

La figure suivante représente la technique d'ensemencement d'une boîte de Pétri :

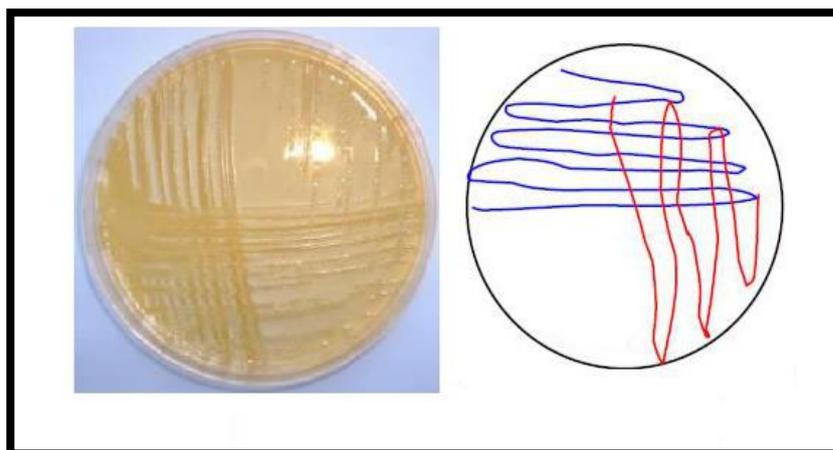


Figure 37 : Ensemencement d'une boîte de Pétri.

f) Incubation

Toutes les boîtes de Pétri sont scellées avec du para-film stérile pour éviter l'évaporation éventuelle des extraits, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.

g) Lecture

À l'aide d'une règle graduée, la lecture des résultats se fait après l'incubation par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque en mm, en prenant la moyenne des trois essais effectués [33].

II. 3. 1. 2. Activité antifongique

Les mêmes procédures de l'activité antibactérienne sont effectuées avec les souches des champignons, mais dans ce cas l'activité antifongique est déterminée par la méthode de diffusion sur le milieu Sabouraud. L'inoculum des champignons est préparé et l'ensemencement est effectué par écouvillonnage sur boîtes de Pétri coulés préalablement. La lecture est faite après 48 heures d'incubation à 30°C.

Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité comme le montre le tableau suivant :

Tableau 5 : Degré de sensibilité et d'activité selon le diamètre d'inhibition [34].

Diamètre d'inhibition(x)	Degré de sensibilité des germes	Résultats
$X \leq 8$ mm	Résistante	-
$8 \text{ mm} < X < 14$ mm	Sensibilité limitée	+
$14 \text{ mm} < X < 20$ mm	Sensibilité moyenne	++
$X \geq 20$ mm	Très sensible	+++

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. Božović and R. Ragno, "Calamintha nepeta (L.) Savi and its main essential oil constituent pulegone: Biological activities and chemistry," *Molecules*, vol. 22, p. 290, **2017**.
- [2] C. Frezza, A. Venditti, M. Serafini, and A. Bianco, "Phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology, and nutraceuticals of Lamiaceae," in *Studies in natural products chemistry*. vol. 62, ed: Elsevier, **2019**, pp. 125-178.
- [3] M. W. Chase, M. Christenhusz, M. Fay, J. Byng, W. S. Judd, D. Soltis, *et al.*, "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV," *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 181, pp. 1-20, **2016**.
- [4] B. P. Gaire, S.-K. Moon, and H. Kim, "Scutellaria baicalensis in stroke management: nature's blessing in traditional Eastern medicine," *Chinese journal of integrative medicine*, vol. 20, pp. 712-720, **2014**.
- [5] G. Nieto, "Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family," *Medicines*, vol. 4, p. 63, **2017**.
- [6] W. Luo, Z. Du, Y. Zheng, X. Liang, G. Huang, Q. Zhang, *et al.*, "Phytochemical composition and bioactivities of essential oils from six Lamiaceae species," *Industrial Crops and Products*, vol. 133, pp. 357-364, **2019**.
- [7] E. Martin, O. Cetin, T. Dirmenci, and H. Ay, "Karyological studies of *Clinopodium* L.(Sect. Pseudomelissa) and *Micromeria* Benth. s. str.(Lamiaceae) from Turkey," *Caryologia*, vol. 64, pp. 398-404, **2011**.
- [8] U. Bernardo, F. Nugnes, L. Gualtieri, R. Nicoletti, P. Varricchio, R. Sasso, *et al.*, "A new gall midge species of *Asphondylia* (Diptera: Cecidomyiidae) inducing flower galls on *Clinopodium nepeta* (Lamiaceae) from Europe, its phenology, and associated fungi," *Environmental entomology*, vol. 47, pp. 609-622, **2018**.
- [9] H. Debbabi, R. E. Mokni, I. Chaieb, S. Nardoni, F. Maggi, G. Caprioli, *et al.*, "Chemical Composition, Antifungal and Insecticidal Activities of the Essential Oils from Tunisian *Clinopodium nepeta* subsp. *nepeta* and *Clinopodium nepeta* subsp. *glandulosum*," *Molecules*, vol. 25, p. 2137, **2020**.
- [10] B. D. Eddine, "Évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne d'une plante endémique algérienne : *Endém ampelodesma*," Mémoire de Magister, Université Badji Mokhtar-Annaba, **2011**.
- [11] E. BOUCHOUKA, "Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes," Thèse de doctorat, Université de Laghouat, **2016**.
- [12] P. Berche, J.-L. Gaillard, M. Simonet, and M. Simonet, *Bactériologie: bactéries des infections humaines*: Flammarion médecine-sciences, **1988**.
- [13] S. Chawla, "Genome Sequence and the Identification of Mosquitocidal Toxin Operons in *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*," UC Riverside, **2015**.
- [14] V. Oliveri, "Biomedical applications of copper ionophores," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 422, p. 213474, **2020**.
- [15] J.-L. Avril, H. Dabernat, F. Denis, and H. Monteil, *Bactériologie clinique*: Ellipses Edition Marketing SA, **2000**.
- [16] E. Abe, S. G. Delyle, and J. C. Alvarez, "Extraction liquide-liquide: théorie, applications, difficultés," in *Annales de Toxicologie Analytique*, **2010**, pp. 51-59.
- [17] C. TOUAMI, "Examen phytochimique et Pouvoir anti-microbien et anti-radicalaire des extraits de *Nepeta amethystina* (Gouzia) de la région d'Aïn Sefra (Algérie)," Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, **2017**.

- [18] Y. Tanko, G. Magaji, M. Yerima, R. Magaji, and A. Mohammed, "Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of aqueous leaves extract of *Ocimum Gratissimum* (Labiata) in Rodents," *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, vol. 5, pp. 141-146, **2008**.
- [19] A. Harborne, *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*: springer science & business media, **1998**.
- [20] L. Müller, S. Gnoyke, A. M. Popken, and V. Böhm, "Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 43, pp. 992-999, **2010**.
- [21] S. Mahmoudi, M. Khali, and N. Mahmoudi, "Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.)," *Nature & Technology*, p. 35, **2013**.
- [22] A. Mansouri, G. Embarek, E. Kokkalou, and P. Kefalas, "Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*)," *Food chemistry*, vol. 89, pp. 411-420, **2005**.
- [23] A. Bouratoua, A. Khalfallah, C. Bensouici, Z. Kabouche, A. Alabdul Magid, D. Harakat, *et al.*, "Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes* Coss. ex Bonnier and Maury," *Natural product research*, vol. 32, pp. 1873-1880, **2018**.
- [24] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, and S. E. Karademir, "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 52, pp. 7970-7981, **2004**.
- [25] A. Szydłowska-Czerniak, C. Dianoczki, K. Recseg, G. Karlovits, and E. Szlyk, "Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods," *Talanta*, vol. 76, pp. 899-905, **2008**.
- [26] E. A. Dutra, E. R. M. Kedor-Hackmann, and M. I. R. M. Santoro, "Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry," *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 40, pp. 381-385, **2004**.
- [27] A. K. Mishra, A. Mishra, and P. Chattopadhyay, "Evaluation of sun protection factor of some marketed formulations of sunscreens by ultraviolet spectroscopic method," *J Curr Pharm Res*, vol. 5, pp. 32-35, **2011**.
- [28] R. M. Sayre, P. P. Agin, G. J. LeVee, and E. Marlowe, "A comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 29, pp. 559-566, **1979**.
- [29] B. More, S. Sakharwade, S. Tembhurne, and D. Sakarkar, "Evaluation of Sunscreen activity of Cream containing Leaves Extract of *Butea monosperma* for Topical application," *International Journal of Research in Cosmetic Science*, vol. 3, pp. 1-6, **2013**.
- [30] A. Sokmen, M. Gulluce, H. A. Akpulat, D. Daferera, B. Tepe, M. Polissiou, *et al.*, "The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*," *Food control*, vol. 15, pp. 627-634, **2004**.
- [31] Y. Choi, D. Noh, S. Cho, H. J. Suh, K. Kim, and J. Kim, "Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 39, pp. 756-761, **2006**.
- [32] F. MERATATE, "Etude phytochimique et pouvoir biologique des métabolites secondaires de la plante *Zizyphora hispanica* L. de la région de M'SILA," Thèse de doctorat, Université de m'sila, **2013**.
- [33] M. Gulluce, F. Sahin, M. Sokmen, H. Ozer, D. Daferera, A. Sokmen, *et al.*, "Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract

- from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*," *Food chemistry*, vol. 103, pp. 1449-1456, **2007**.
- [34] C. Duraffourd and J.-C. Lapraz, *Traité de phytothérapie clinique: endobiogénie et médecine*: Elsevier Masson, **2002**.

Chapitre III

Résultats et discussion

I. ANALYSES CHIMIQUES

I. 1. Rendements d'extractions

Les rendements obtenus pour 400 g de "*Clinopodium nepeta*", ont été calculés par rapport à la masse de la plante sèche, en utilisant la technique d'extraction décrite dans le chapitre précédent. Les rendements des extraits obtenus sont représentés dans l'histogramme ci-dessous :

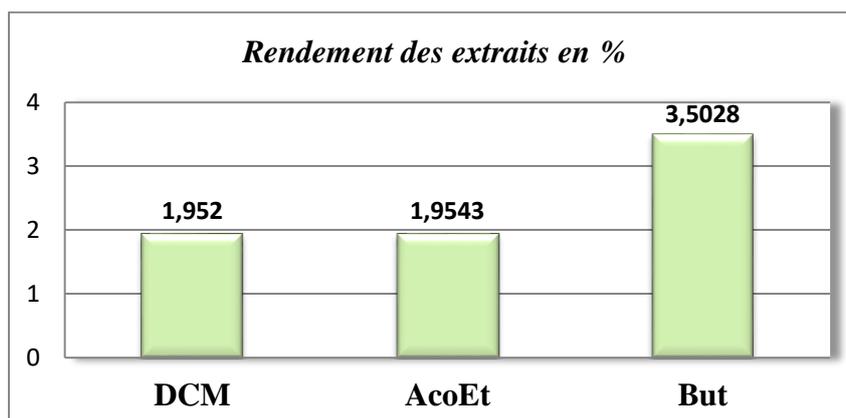


Figure 38 : Rendements des extraits obtenus (en %).

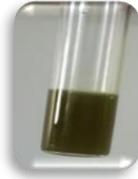
L'analyse des résultats obtenus montrent que le rendement le plus élevé est celui de l'extrait butanolique avec 3,502 %, suivi par les deux autres extraits qui ont presque le même rendement avec 1,952 % pour l'extrait dichlorométhanique et 1,954 % pour l'extrait d'acétate d'éthyle.

I. 2. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques. Les résultats des tests phytochimiques réalisés sont récapitulés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résultats du screening phytochimique de la plante étudiée.

Substances recherchées	Résultats obtenus	Image
Flavonoïdes	+++	

Alcaloïdes	-	
Composés réducteurs	-	
Tanins cathéchiques	+++	
Amidon	-	/
Alcaloïdes (base)	-	/
Stérols et stéroïdes	++	
Saponosides	+++	
Tanins galliques	-	/
Coumarines	++	
Huiles volatiles	+++	/

+++ : Forte abondance ; ++ : Présence ; - : Non détecté.

D'après les résultats obtenus nous pouvons constater que les groupes chimiques les plus abondants sont : les flavonoïdes, les tannins cathéchiques, les coumarines, les stéroïdes et les huiles volatiles. La présence des saponosides était marquante ; la couche de mousse a été d'une hauteur de 2,8 cm (très positif). Cependant, l'absence des alcaloïdes, et des alcaloïdes (base), de l'amidon, des composés réducteurs et des tannins galliques a été notée.

L'existence en abondance de certaines familles de composés confère à cette plante des propriétés biologiques extrêmement importante :

Les tanins sont connus comme des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques

produits lors de la peroxydation, ce qui permet de former des radicaux tanniques plus stables, ainsi que de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides. Ils ont aussi la capacité de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections [1].

L'apparition des saponosides avec une quantité considérable attribuée aux plantes des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-œdémateuse [2].

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés constituent un groupe de substances fondamentale qui présentent une importance majeure dans plusieurs domaines. Les flavonoïdes assurent une multitude de propriétés antioxydante, antivirale, antibactérienne, tinctoriale, attribué à des utilisations dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques [3].

II. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

II. 1. Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur en flavonoïdes

II. 1. 1. Total phénolique

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits a été effectué par la méthode colorimétrique de "Folin – Ciocalteu". La teneur en polyphénols totaux est exprimée en microgramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme du poids de l'extrait ($\mu\text{g EAG} / \text{mg d'extrait}$), en utilisant l'équation (1) de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide gallique (figure 39).

$$y = 0,0034x + 0,1044 \text{ avec } R^2 = 0,9972 \quad (1)$$

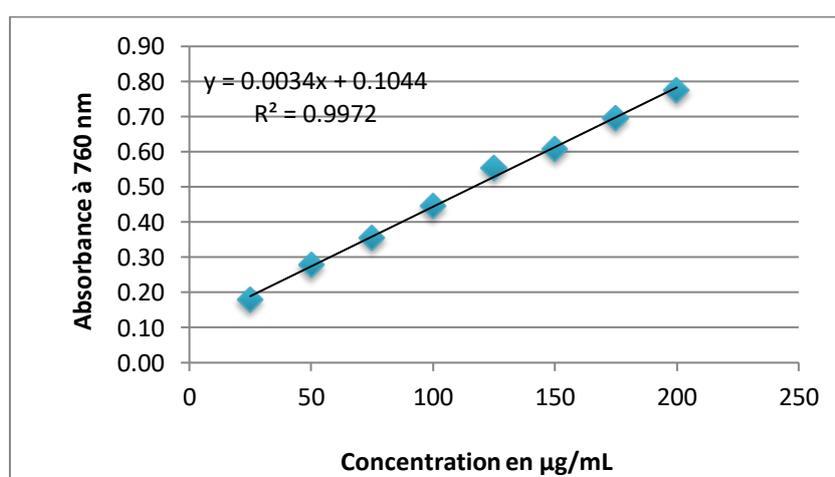


Figure 39 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats de l'analyse spectrophotométrique des composés phénoliques totaux sont résumés dans le tableau 7 et la figure 40.

Tableau 7 : Teneur des extraits obtenus en composés phénoliques.

Extraits	Teneur en composés phénoliques ($\mu\text{g GAE}/\text{mg}$)
DCM	50,96 \pm 0,74
AcoEt	94,69 \pm 0,61
But	112,14 \pm 0,45

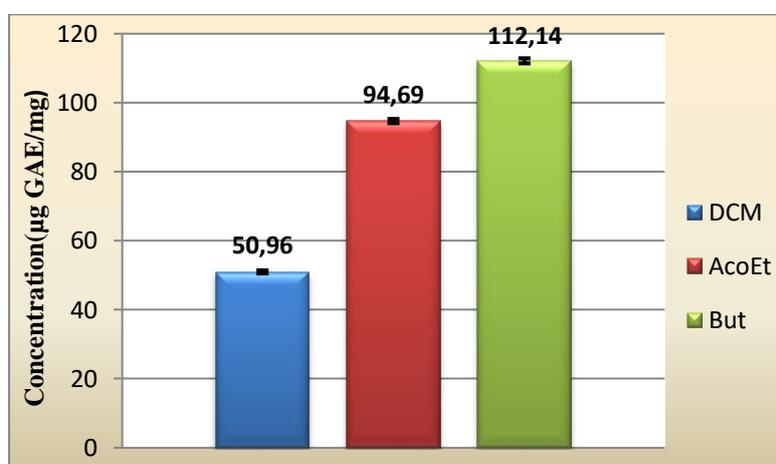


Figure 40 : Teneur des extraits en polyphénols.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux, ont été obtenus par extrapolation des valeurs d'absorbances des extraits mesurées sur la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Le taux des polyphénols calculé a montré, une teneur importante des extraits testés en composés phénoliques. Cependant, l'extrait butanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle exhibait successivement les taux les plus élevés (112,14 et 94,69 $\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait), tandis que l'extrait dichlorométhanique présentait une teneur plus au moins faible, par rapport aux autres extraits avec un taux de 50,96 $\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait.

En général, la teneur en polyphénols d'une plante dépend de plusieurs facteurs intrinsèques (génétiques) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturales, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) [4].

Néanmoins, les résultats obtenus lors de ce dosage ne donnent pas les valeurs exactes des teneurs en polyphénols, car le réactif de Folin-Ciocalteu est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxylés et non seulement ceux des composés phénoliques,

mais il peut réagir aussi avec les acides aminés et les sucres comme le glucose [5,6]. Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous composés d'un extrait comportant une fonction hydroxyle, la raison pour laquelle on obtient généralement un taux élevé, du à sa non spécificité en réagissant avec beaucoup de composés hydroxylés [7].

II. 1. 2. Total flavonoïdes

La détermination quantitative des flavonoïdes est exprimée en μg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait ($\mu\text{g Eq/mg}$), en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine (figure 41). La formule de la régression linéaire de cette courbe est celle de l'équation suivante (2) :

$$y = 0,0047x + 0,0165 \quad \text{avec } R^2 = 0,9978 \quad (2)$$

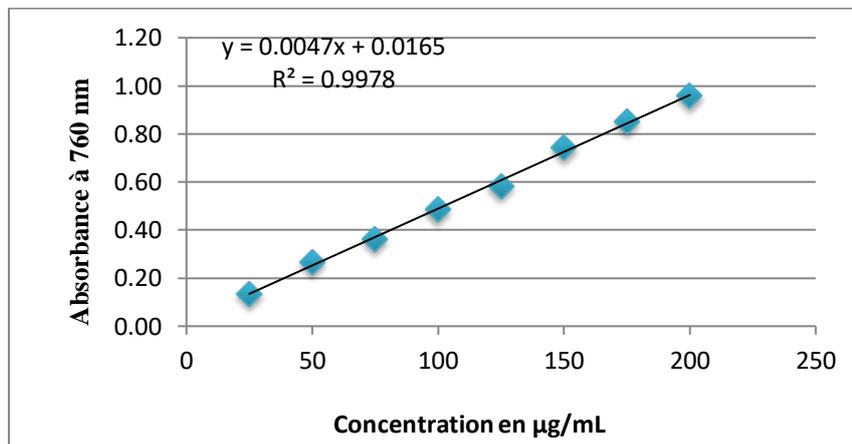


Figure 41 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats du dosage spectrophotométrique du taux des flavonoïdes totaux sont présentés dans le tableau 8 et la figure 42.

Tableau 8 : Teneur des extraits en flavonoïdes.

Extraits	Teneur en flavonoïdes ($\mu\text{g Eq/mg}$)
DCM	57,43 \pm 1,03
AcoEt	263,61 \pm 1,17
But	296,05 \pm 0,58

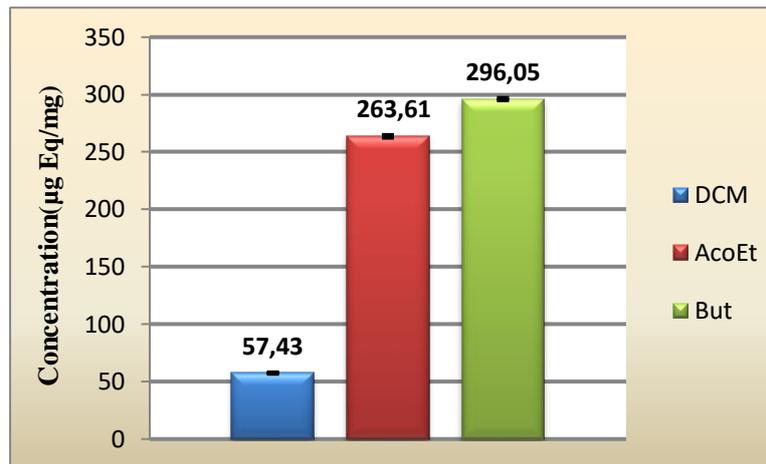


Figure 42 : Teneur des extraits en flavonoïdes.

Pour les flavonoïdes, le taux de teneur calculé a montré que : l'extrait butanolique a la plus grande valeur (296,05 µg Eq/mg d'extrait) suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle (263,61 µg Eq/mg d'extrait) et enfin l'extrait dichlorométhanique (57,43 µg Eq/mg d'extrait).

Les résultats du dosage obtenus pour les polyphénols totaux se concordent bien avec ceux obtenus pour les flavonoïdes. Ces résultats ont permis de classer les extraits selon leur richesse en substances phénoliques comme suit : extrait butanolique > extrait d'acétate > extrait dichlorométhanique.

II. 2. Résultats de l'activité antioxydante

Les différents extraits des plantes sont des sources potentielles de composants chimiques responsables d'activités antioxydantes. De ce fait, de nombreuses méthodes d'évaluation de ces activités ont été décrites par certains auteurs.

Dans cette étude nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits de la plante "*Clinopodium nepeta*" par quatre méthodes différentes.

L'acide ascorbique, BHA, BHT et l' α -tocophérol sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et ils sont utilisés comme control positif.

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD d'analyses effectuée en trois essais. Les valeurs de IC_{50} (Concentration d'inhibition à 50 %) et de $A_{0,5}$ (La concentration indiquant 0,50 d'absorbance), sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir des deux courbes : [% inhibition = f (concentrations)] pour la IC_{50} et [Absorbance = f (concentrations)] pour la $A_{0,50}$.

II. 2. 1. Piégeage du radical libre DPPH•

Dans le présent travail, l'activité antiradicalaire des extraits de la plante investiguée, a été évaluée par la mesure des concentrations inhibitrices à 50% (IC_{50}) ; en se basant sur la

capacité d'une substance à réduire le radical libre ; comparé à des antioxydants standards (BHA, BHT).

Les résultats de l'activité antiradicalaire au DPPH^{*}, sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration, ainsi que leurs écarts types calculés après trois séries d'expérience (Tableau 9).

Tableau 9 : Activité antiradicalaire du DPPH^{*} et le pourcentage d'inhibition.

[C] Extraits	% d'inhibition							IC ₅₀ µg/mL
	1,562 µg	3,125 µg	6,25 µg	12,50 µg	25 µg	50 µg	100 µg	
DCM	3,72±0,26	5,44±0,54	8,95±1,31	17,46±0,13	34,06±1,22	55,74±0,53	86,11±0,21	46,77±1,57
AcoEt	11,62±1,01	14,95±0,78	24,85±0,95	35,39±0,01	58,38±0,19	80,02±0,73	80,23±0,46	24,98±0,21
But	3,21±0,26	10,41±1,09	22,23±1,49	41,57±0,91	78,04±0,1	81,01±0,1	84,19±0,58	9,12±0,11
BHT	22,21±1,2	31,73±1,22	54,89±3,60	67,60±1,1	76,77±0,54	78,67±1,31	79,01±0,89	5,73±0,41
BHA	11,69±1,8	22,21±1,30	37,12±1,80	52,63±2,7	56,02±0,53	83,60±0,23	87,28±0,26	22,32±1,19

IC₅₀ : la concentration d'inhibition de 50% du DPPH^{*}.

Les résultats obtenus après ce dosage, ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits et celles des références (Figure 43).

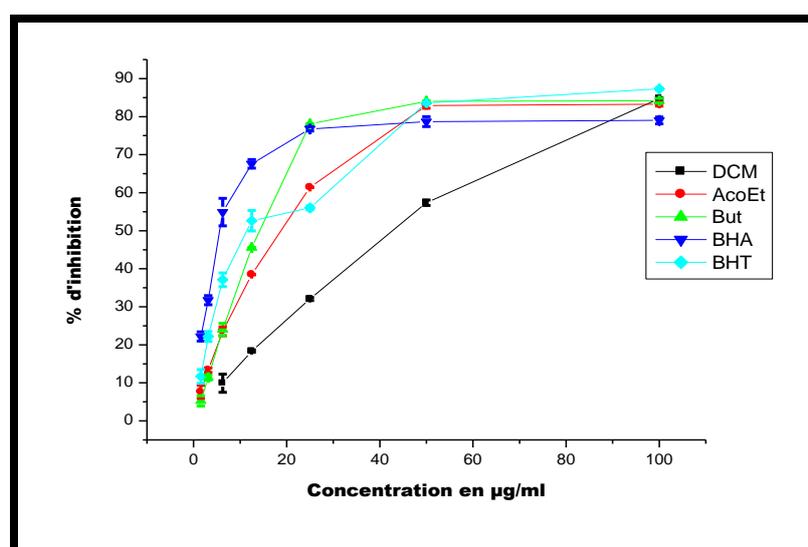


Figure 43 : Pourcentage d'inhibition du DPPH^{*} par différents extraits.

➤ *Détermination de l'IC₅₀*

Pour mieux déterminer le pouvoir antioxydant de nos extraits, nous avons introduit le paramètre IC_{50} qui montre la concentration de l'antioxydant nécessaire induisant la perte de 50 % de l'activité du DPPH \cdot . Plus la valeur de IC_{50} est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant [8].

Les valeurs de l' IC_{50} des extraits ainsi que celle des références sont présentées sous forme d'histogramme (Figure 44).

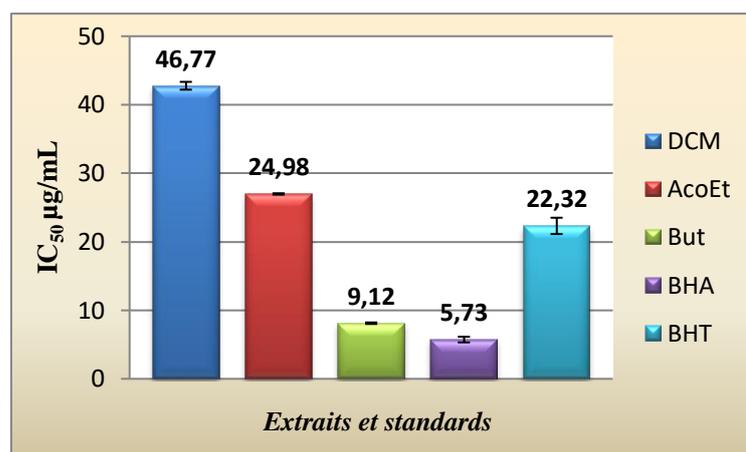


Figure 44 : Activité antioxydante des différents extraits testée par DPPH \cdot (Valeur des IC_{50}).

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits et des composés standards (BHA, BHT), vis-à-vis le radical libre DPPH \cdot , montre que l'activité antiradicalaire dépend de la concentration, autrement dit le pourcentage d'inhibition du DPPH \cdot est proportionnelle avec la concentration des extraits.

A partir des résultats obtenus, nous constatons que l'extrait butanolique a manifesté une excellente activité antiradicalaire au DPPH \cdot ($IC_{50} = 9,12 \pm 0,11$ µg/mL), comparativement au standard BHA ($IC_{50} = 5,73 \pm 0,41$ µg/mL). L'extrait de l'acétate d'éthyle avec une valeur de l' $IC_{50} = 24,98 \pm 0,21$, était cinq fois plus faible que celle du BHA ($IC_{50} = 5,73 \pm 0,41$ µg/mL), par contre cette activité était proche à celle du BHT ($IC_{50} = 22,32 \pm 1,19$ µg/mL). Cependant, l'extrait dichlorométhanique a montré la plus faible activité par rapport aux autres extraits. (Tableau 9, Figure 45).

L'activité inhibitrice du radical DPPH \cdot pourrait s'expliquer par : le piégeage de ces radicaux libres par les polyphénols contenus dans les extraits, notamment les composés flavoniques qui ont des structures chimiques spécifiques. Ce qui veut dire, par la haute sélectivité du DPPH \cdot , car il ne réagit qu'avec les flavonoïdes contenant des groupes

hydroxyles dans le cycle B [9], ainsi que les acides aromatiques comportant plus d'un groupe hydroxyle [10].

II. 2. 2. Réduction du fer par la méthode de FRAP

La capacité réductrice des extraits est un indicateur significatif de l'activité donatrice d'électrons, qui est un mécanisme important de l'action antioxydante. L'estimation de cette capacité peut s'effectuer en mesurant les valeurs de $A_{0,5}$. Les valeurs obtenues avec celles des témoins (acide ascorbique et α -tocophérol), sont regroupées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Valeurs d'absorbances des différents extraits après la réduction du fer.

[C] Extraits	Absorbance							$A_{0,5}$ $\mu\text{g/mL}$
	3,125 μg	6,25 μg	12,50 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
DCM	0,27±0,03	0,31±0,04	0,39±1,22	0,44±0,4	0,58±1,03	0,64±2,17	0,71±1,31	31,06±1,49
AcoEt	0,21±0,18	0,33±1,04	0,45±0,05	0,57±0,08	0,61±0,1	0,69±2,14	0,73±0,12	24,87±0,89
But	0,19±2,02	0,41±4,01	0,53±0,01	0,54±0	0,55±0,08	0,57±0,22	0,58±0,11	19,42±0,25
Acide ascorbique	0,35±0,05	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,37±0,20	1,44±0,21	6,77±1.15
α -Tocophérol	0,11±0,00	0,16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	1,81±0,09	34.93±2.38

$A_{0,5}$: la concentration à l'absorbance 0,5.

Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe de l'absorbance en fonction des concentrations des extraits et des contrôles positifs (Figure 45).

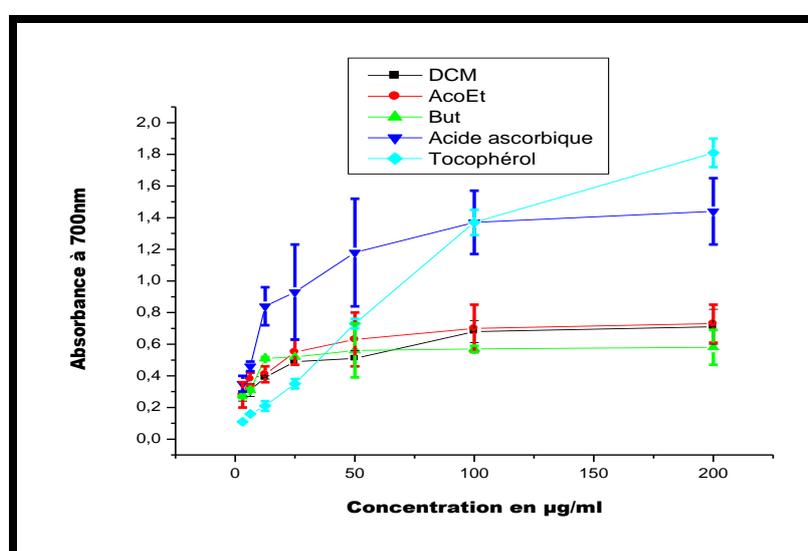


Figure 45 : Courbe des absorbances en fonction des concentrations des extraits (Pouvoir réducteur).

Les valeurs de $A_{0,50}$ des extraits ainsi que celle de l'acide ascorbique et de l' α -tocophérol sont illustrées sur l'histogramme ci-dessous (Figure 46).

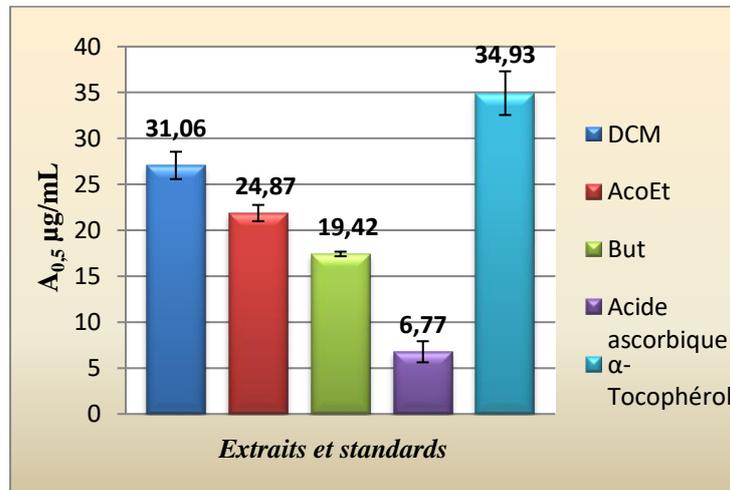


Figure 46 : Valeurs des $A_{0,50}$ du test FRAP pour les différents extraits.

A partir des résultats obtenus, on s'aperçoit que les trois extraits ont exhibés une capacité de réduire le fer (tableau 10, figure 46). Le meilleur pouvoir réducteur a été obtenu pour l'extrait butanolique par rapport aux autres extraits de la même plante avec une valeur de $A_{0,50}=19,42\pm 0,25$ µg/mL. Ce résultat est deux fois plus supérieur que l' α -tocophérol ($A_{0,50}=34,93\pm 2,38$ µg/mL) et trois fois plus faible que l'acide ascorbique ($A_{0,50}=6,77\pm 1,15$ µg/mL).

Sur l'ensemble des résultats, on constate aussi que les deux extraits d'acétate d'éthyle et du dichlorométhane, ont manifestés une bonne activité par rapport à l' α Tocophérol avec des $A_{0,50}$ de $24,87\pm 0,89$ et de $31,06\pm 1,49$ µg/mL respectivement.

II. 2. 3. Réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC)

Cette méthode repose sur la réduction du complexe cuivre-néocuproïne [Nc_2-Cu^{2+}], cette réaction est évaluée à titre des valeurs $A_{0,50}$ des extraits et des références (BHA, BHT) mentionnées ci-dessous :

Tableau 11 : Valeurs d'absorbances des différents extraits avec le complexe cuivre-néocuproïne.

[C] Extraits	Absorbance							
	3,125 µg	6,25 µg	12,50 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0,5} µg/mL
DCM	0,09±0	0,19±0,01	0,28±0,02	0,24±0,4	0,49±0	0,67±1,52	1,35±0,94	61,45±1,08
AcoEt	0,14±1,11	0,26±4,31	0,31±0,02	0,42±0,01	0,59±2,21	0,71±0,81	1,55±0,66	48,66±0,93
But	0,19±0,4	0,24±0,31	0,34±0,32	0,43±0,5	0,74±0,22	0,91±0,19	1,78±0,29	26,54±0,65
BHT	0,19±0,01	0,33±0,04	0,66±0,07	1,03±0,07	1,48±0,09	2,04±0,14	2,32±0,28	9,62±0,87
BHA	0,46±0,00	0,78±0,01	1,34±0,08	2,36±0,17	3,45±0,02	3,76±0,03	3,93±0,01	3,64±0,19

A_{0,50} : la concentration à l'absorbance 0,5.

Les résultats obtenus on permit de tracer la courbe de l'absorbance en fonction des concentrations des extraits et des témoins (Figure 47).

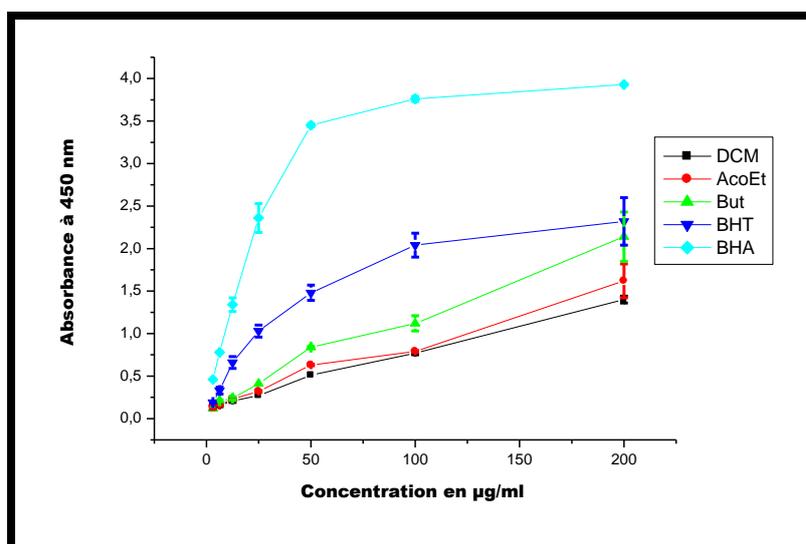


Figure 47 : Courbe d'absorbance de CUPRAC en fonction de la concentration des différents extraits.

Les valeurs de A_{0,50} des extraits ainsi que celle du BHT et du BHA sont exhibées sur l'histogramme de la figure 48.

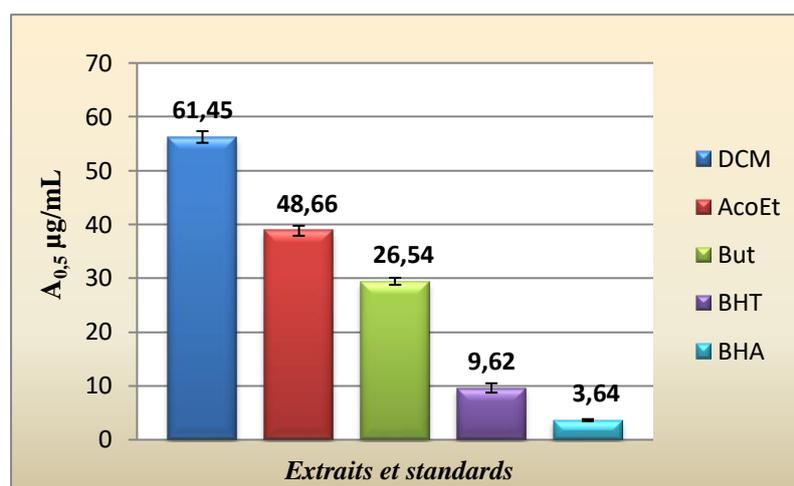


Figure 48 : Valeurs des $A_{0,50}$ du test CUPRAC pour les différents extraits.

L'exploration du tableau 11 et de la figure 48, montre que l'extrait butanolique exhibait la plus grande activité avec une valeur de $A_{0,5}$ de $26,54 \pm 0,65$ µg/mL, par rapport aux autres extraits. Cependant, cette activité reste faible comparant à celle des standards (Trois fois plus faible que le BHT ($A_{0,5}$: 9.62 ± 0.87 µg/mL) et huit fois plus faible que le BHA ($A_{0,5}$: 3.64 ± 0.19 µg/mL)). Les extraits d'acétate et du dichlorométhane ont manifesté une activité de réduction moins efficace avec des valeurs de $A_{0,5}$ égale à : $48,66 \pm 0,93$; $61,45 \pm 1,08$ µg/mL respectivement.

II. 2. 4. Réduction par la formation du complexe Fe^{+2} - phénantroline

Suite à une réaction d'oxydoréduction, un complexe Fe^{+2} -phénantroline de couleur rouge-orangé est formé. Cette réaction est évaluée par la mesure des valeurs de $A_{0,50}$ des extraits et des références (BHA, BHT). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Valeurs d'absorbances des extraits avec le complexe Fe^{+2} - phénantroline.

[C] Extraits	Absorbance							$A_{0,5}$ µg/mL
	0,781µg	1,562µg	3,125µg	6,25µg	12,50µg	25µg	50µg	
DCM	$0,13 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$	$0,338 \pm 0$	$0,40 \pm 0$	$0,57 \pm 0$	$0,58 \pm 0,02$	$26,63 \pm 0,11$
AcoEt	$0,08 \pm 1,07$	$0,11 \pm 2,01$	$0,23 \pm 1,76$	$0,28 \pm 0,34$	$0,39 \pm 0,4$	$0,50 \pm 0,68$	$0,55 \pm 0,22$	$19,82 \pm 0,15$
But	$0,21 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,02$	$0,58 \pm 1,71$	$0,65 \pm 3,01$	$0,66 \pm 2,21$	$11,23 \pm 0,16$
BHT	$0,47 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,03$	$1,23 \pm 0,02$	$1,84 \pm 0,01$	$3,48 \pm 0,03$	$4,84 \pm 0,01$	$2,24 \pm 0,17$

BHA	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	0,93±0,07
-----	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

$A_{0,50}$: la concentration à l'absorbance 0,5.

Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe des absorbances en fonction des concentrations des extraits et des témoins (Figure 49).

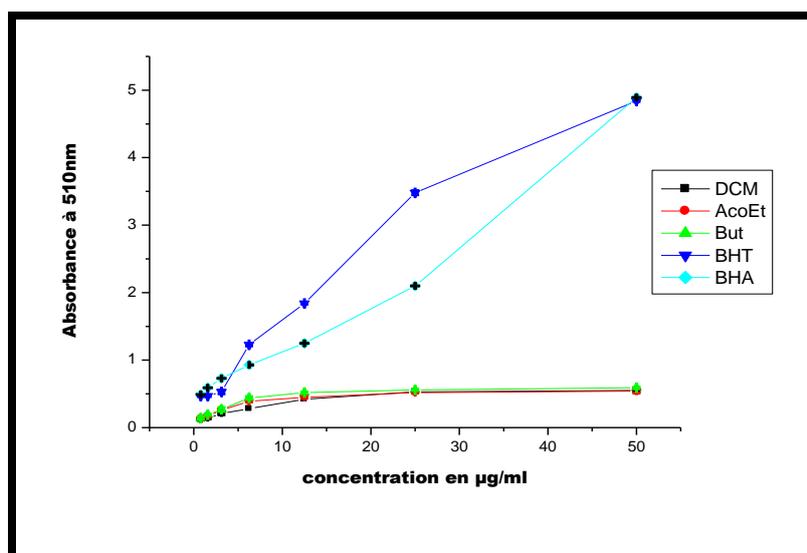


Figure 49 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (Phénantroline).

Les valeurs de $A_{0,50}$ des extraits ainsi que celles de BHT et BHA sont représentées sur la figure 50.

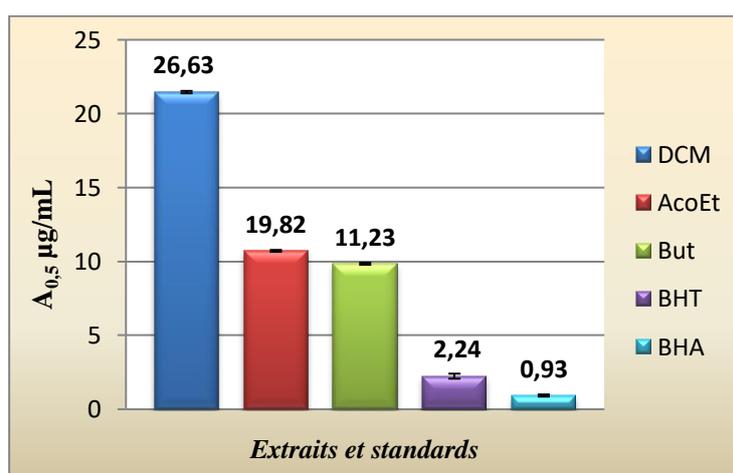


Figure 50 : Valeurs des $A_{0,50}$ des différents extraits avec le complexe Fe^{+2} - phénantroline.

A partir des résultats obtenus, on remarque que tous les extraits sont capables de réduire le fer et de former un complexe Fe^{+2} - phénantroline. Comparé à l'extrait dichlorométhanique qui exhibait une activité moins efficace ($A_{0,5}$: $26,63 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$), l'extrait butanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle ont présentés un pouvoir réducteur plus important avec une valeur de $A_{0,5} = 11,23 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ et $19,82 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ respectivement. Cette activité réductrice était presque dix fois plus inférieure à celle du BHA ($A_{0,5}$: $0,93 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) et cinq fois plus faible que le BHT ($A_{0,5}$: $2,24 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$).

Les résultats de l'activité antioxydantes sont en total concordance avec la richesse des deux extraits But et AcoEt, en : total phénolique ($112,14 \pm 0,45$; $94,69 \pm 0,61$) et total flavonoïdes ($296,05 \pm 0,58$; $263,61 \pm 1,17$) respectivement.

Au cours de cette étude, on peut conclure que la variation du potentiel réducteur, pourrait être principalement due à la capacité réductrice des polyphénols, en tant qu'antioxydant dépendant du degré d'hydroxylation et du degré de conjugaison. En effet, de nombreuses recherches expliquent que l'activité dépend essentiellement de trois critères, qui sont : la présence de structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (positions 3',4' groupement catéchol), de la conjugaison de la molécule entière (double liaison C2-C3), avec le groupe carbonyle en position 4 (oxo), et de la présence du groupement hydroxyle en position 3 en combinaison avec la double-liaison C2-C3 [11,12].

La figure ci-dessous illustre ces trois critères :

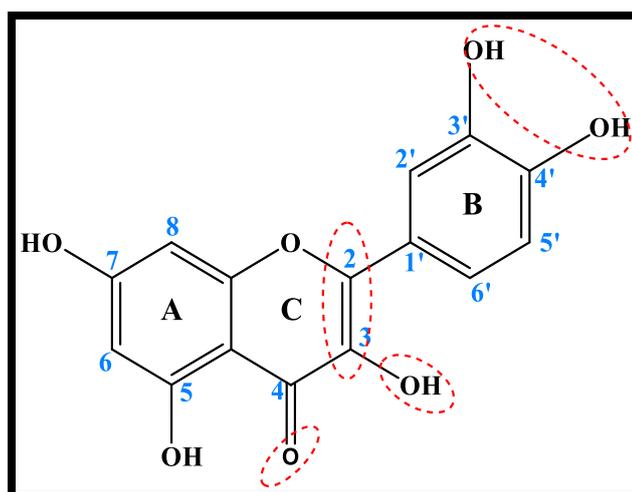


Figure 51: Eléments essentiels pour l'activité antioxydante.

II. 3. Détermination du facteur de protection solaire (SPF)

L'activité photoprotectrice des extraits a été évaluée par un test *in-vitro*, selon la méthode SPF en appliquant l'équation mathématique de Mansur et *al* (1986). Cette activité est

une mesure de l'efficacité de la formation de protection solaire. Plus le SPF, est élevé, plus une protection contre les rayons UV est efficace et donc une prévention des coups de soleil et des dommages qu'ils peuvent provoquer est établie.

Dans ce travail, le SPF des extraits, ont été évalués *in-vitro* par spectrophotométrie UV. Les résultats obtenus des tests effectués sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 13 : Valeurs du facteur de protection solaire (SPF).

Extraits	Valeurs de SPF
DCM	25,42±0,81
AcoEt	36,20±0,52
But	45,12±0,37

Tableau 14 : Catégories de protection affichées sur les produits solaires en fonction des facteurs de protection mesurés, selon la recommandation de la commission européenne (RCE) 2006.

Catégorie indiquée	Facteur de protection indiqué	Facteur de protection solaire mesuré
" Protection faible"	6	6 - 9,9
	10	10 - 14,9
"Protection moyenne"	15	15 - 19,9
	20	20 - 24,9
	25	25 - 29,9
"Protection haute"	30	30 - 49,9
	50	50 - 59,9
"Protection très haute"	50+	60 ≤

D'après les valeurs de SPF obtenues, on constate que les deux extraits butanolique et celui de l'acétate d'éthyle, possèdent une haute activité photoprotectrice, vis-à-vis les UV-B avec des valeurs de l'ordre de $45,12 \pm 0,37$ et de $36,20 \pm 0,52$ respectivement, située dans l'intervalle [30 - 49,9]. Tandis que l'extrait dichlorométhanique manifeste une activité photoprotectrice moyenne, avec une valeur de l'ordre de $25,42 \pm 0,81$, située dans l'intervalle [25 - 29,5].

Tableau 15 : Pourcentage des rayons UV-B bloqués [13].

SPF	POURCENTAGE
2	50% des UV-B,
15	93% des UV-B,
20	95% des UV-B
30	97% des UV-B
50	98% des UV-B

En comparant les valeurs de SPF de nos extraits, avec celles indiquées dans le tableau, on remarque que nos extraits ont la capacité de bloquer aux environs de 95 % des rayonnements UV-B pour l'extrait dichlorométhanique et 97 % pour les autres extraits (Acétate d'éthyle et butanolique). Cela est dû certainement à la présence des flavonoïdes et des composés phénoliques. Ces substances ont été mentionnées comme des groupements fonctionnels dans les plantes et les fruits, qui jouent un rôle essentiel envers le traitement des inflammations et des érythèmes. Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes et des composés phénoliques renforce aussi la protection vis-à-vis les UV en modulant la réponse cellulaire et en piégeant les espèces radicalaires oxygénées. D'ailleurs, plusieurs brevets ont réclamé l'utilisation des flavonoïdes dans les préparations des produits protecteurs contre les rayons UV [14-17].

II. 4. Résultats d'activités anti-microbiologiques

Nous avons testé *in-vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits de la plante "*Clinopodium nepeta*" par la méthode de diffusion sur disques sur milieu solides, en utilisant le milieu de culture Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures.

L'activité antimicrobienne a été évaluée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les échantillons à tester, vis-à-vis sept germes pathogènes (Cinq bactéries et deux levures).

© *Test préliminaire*

Lors des essais biologiques sur les extraits, on prend en considération la toxicité du solvant, ce dernier ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les extraits dissoutes, car le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés [18].

Pour cette raison, le DMSO a été testé comme contrôle négatif, car les résultats obtenus ont montrés que ce solvant est adéquat et ne présente aucun effet sur l'inhibition de la croissance des souches microbiennes. La figure ci-dessous représente le résultat du test préliminaire :

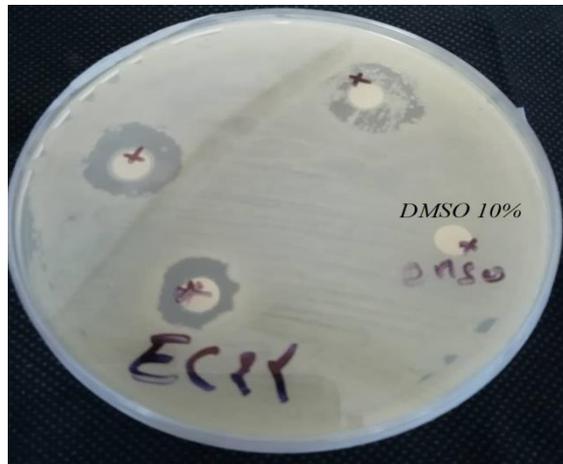


Figure 52 : Résultat du test préliminaire du solvant sur les souches microbiennes.

© Test de résistance

Les différents extraits ont été testés sur des souches de référence ; *Escherichia coli* (ATCC25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC42238), *Salmonella typhimurium* (ATCC700603), *Bacillus subtilis* (ATCC6633), *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*.

Les résultats de la sensibilité des souches aux extraits (antibiogrammes) sont résumés ci-dessous :

Tableau 16 : Résultats de l'activité antimicrobienne *in-vitro* des extraits en utilisant la méthode de diffusion du disque.

Souche testée / Extraits	Diamètre d'inhibition en mm						
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans_F24</i>	<i>Candida albicans_F36</i>
DCM	13	14	13	8	14	18	14
AcoEt	15	15	15	17	22	13	12
But	10	15	11	-	11	15	15

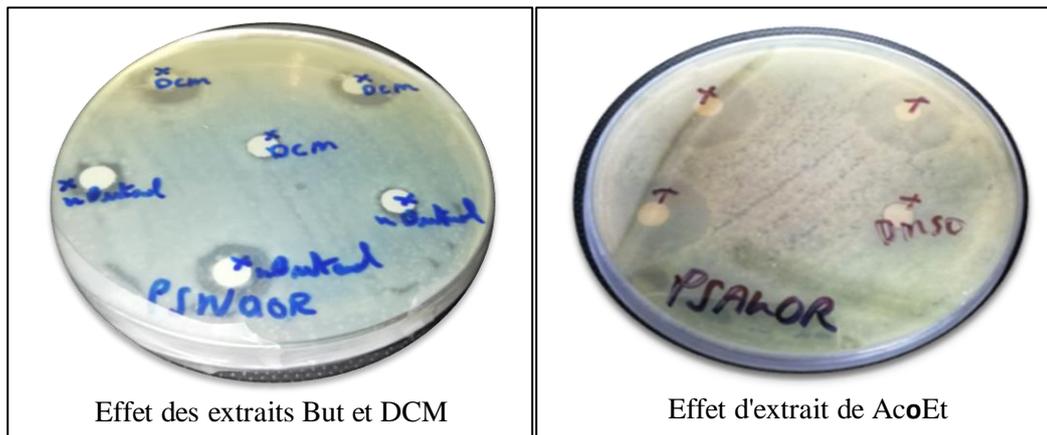


Figure 53 : Effet inhibiteur des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa*.



Figure 54: Effet inhibiteur des extraits sur *Salmonella typhimurium*.

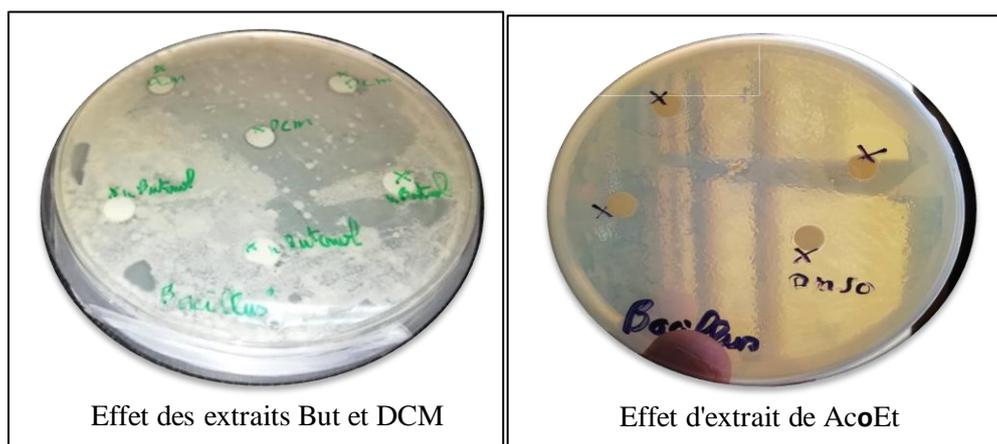


Figure 55 : Effet inhibiteur des extraits sur *Bacillus subtilis*.

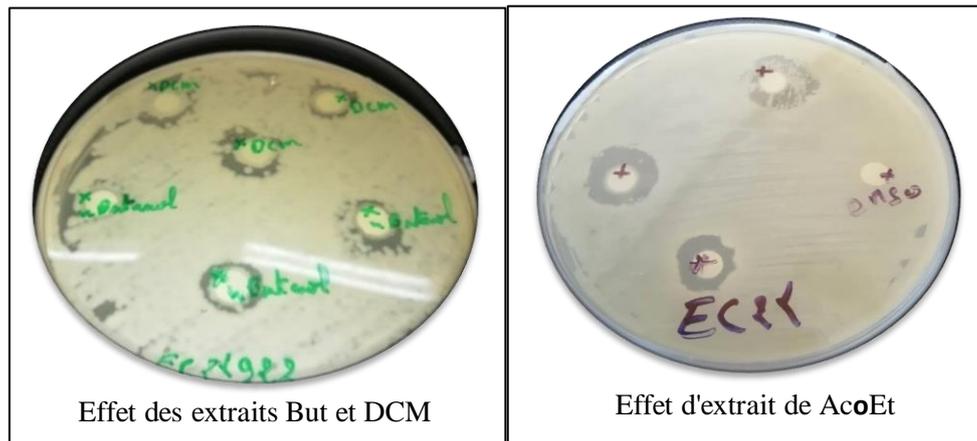


Figure 56 : Effet inhibiteur des extraits sur *Escherichia coli*.

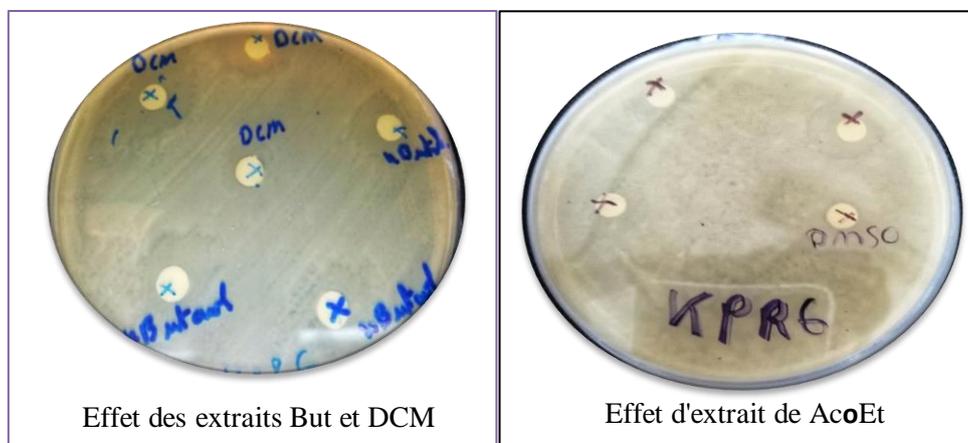


Figure 57 : Effet inhibiteur des extraits sur *Klebsiella pneumoniae*.

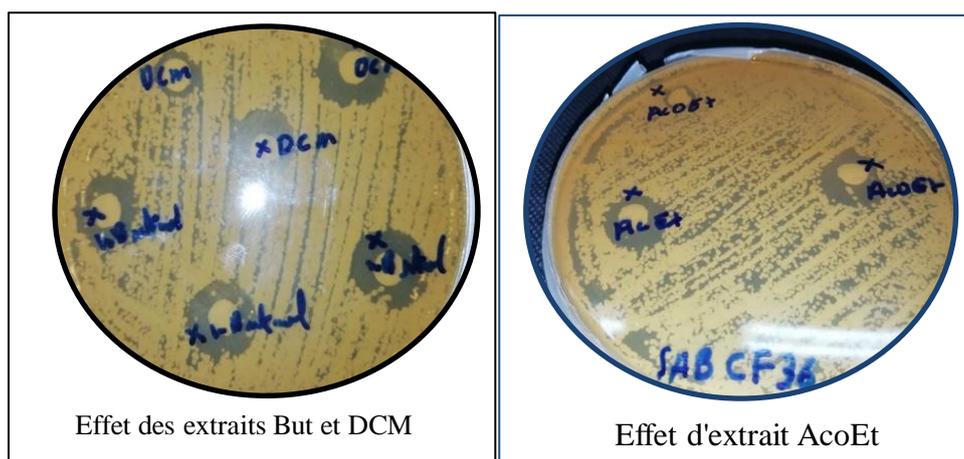


Figure 58 : Effet inhibiteur des extraits sur *Candida albicans*_F36.

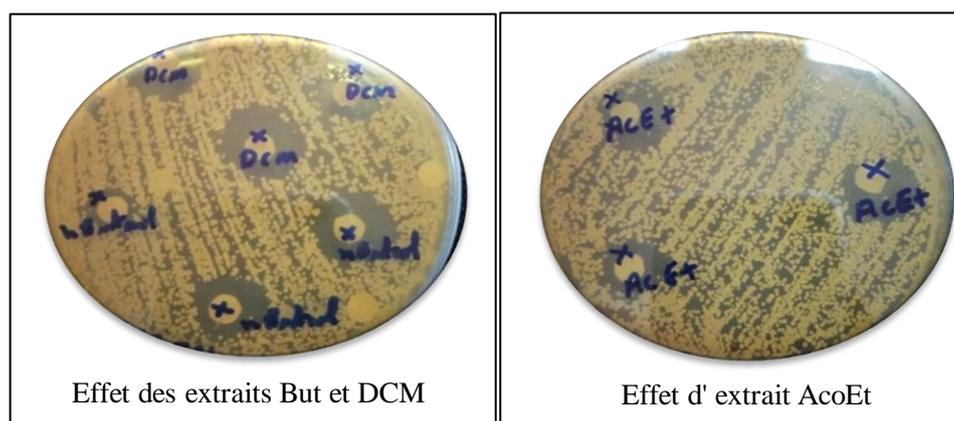


Figure 59: Effet inhibiteur des extraits sur *Candida albicans_F24*.

D'après les résultats obtenus, on constate que les trois extraits testés ont montrés une activité inhibitrice de la plupart des souches de référence. Les diamètres d'inhibition étaient faibles pour deux souches, avec des valeurs entre 8 mm à 10 mm. La *Bacillus subtilis* était la souche la plus résistante, par contre la *Pseudomonas aeruginosa* était très sensible avec un diamètre d'inhibition de 22 mm.

Plusieurs publications ont démontrées la relation entre l'activité antimicrobienne et la présence des composés flavoniques. Cette activité est due à la tendance de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes [19]. Pour cela on peut relier la quantité des flavonoïdes présente dans la plante étudiée avec les résultats obtenus du pouvoir antimicrobien.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] P. Iserin, M. Masson, J. Restellini, E. Ybert, A. De Laage de Meux, F. Moulard, *et al.*, "Larousse des plantes médicinales identification, préparation, soins," *Editions Larousse, Paris*, p. 15, **2001**.
- [2] H. OUAHI, "L'étude de l'effet fongicide des extraits aqueux et éthaloniques de Pistacia lentiscus L," Mémoire de Master, Université de Bouira, **2019**.
- [3] P.-G. Pietta, "Flavonoids as antioxidants," *Journal of natural products*, vol. 63, pp. 1035-1042, **2000**.
- [4] A. Podszędek, "Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 40, pp. 1-11, **2007**.
- [5] S. Vuorela, "Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics," **2005**.
- [6] A. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, N. Vidal, J. Lesgards, and P. Stocker, "Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity," *European Food Research and Technology*, vol. 224, pp. 801-809, **2007**.
- [7] K. Tawaha, F. Q. Alali, M. Gharaibeh, M. Mohammad, and T. El-Elimat, "Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species," *Food chemistry*, vol. 104, pp. 1372-1378, **2007**.
- [8] C. Popovici, I. Saykova, and B. Tylkowski, "Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH," **2010**.
- [9] T. Yokozawa, C. P. Chen, E. Dong, T. Tanaka, G.-I. Nonaka, and I. Nishioka, "Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical," *Biochemical pharmacology*, vol. 56, pp. 213-222, **1998**.
- [10] A. von Gadow, E. Joubert, and C. F. Hansmann, "Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, pp. 632-638, **1997**.
- [11] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free radical biology and medicine*, vol. 20, pp. 933-956, **1996**.
- [12] P.-G. Pietta, "Flavonoids as antioxidants," *Journal of natural products*, vol. 63, pp. 1035-1042, **2000**.
- [13] M. Eskenazi, "Les produits de protection solaire de nouvelle génération," **2017**.
- [14] F. Bonina, M. Lanza, L. Montenegro, C. Puglisi, A. Tomaino, D. Trombetta, *et al.*, "Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 145, pp. 87-94, **1996**.
- [15] K. Zhang, E.-B. Yang, W.-Y. Tang, K. P. Wong, and P. Mack, "Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols," *Biochemical pharmacology*, vol. 54, pp. 1047-1053, **1997**.
- [16] A. Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, M. L. Pellegrino, B. Tita, C. Messina, *et al.*, "'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 56, pp. 167-174, **2003**.
- [17] B. More, S. Sakharwade, S. Tembhurne, and D. Sakarkar, "Evaluation of Sunscreen activity of Cream containing Leaves Extract of Butea monosperma for Topical application," *International Journal of Research in Cosmetic Science*, vol. 3, pp. 1-6, **2013**.
- [18] T. Yrjönen, "Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products," **2004**.

- [19] K. Ulanowska, A. Tkaczyk, G. Konopa, and G. Węgrzyn, "Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains," *Archives of Microbiology*, vol. 184, pp. 271-278, **2006**.

Conclusion générale

&

Perspectives



Ce travail a été élaboré dans l'espérance d'apporter du nouveau au réservoir phytochimique des plantes médicinales et de valoriser les connaissances de la flore Algérienne.

Après un screening phytochimique, des activités biologiques d'une plante à usage médicinale traditionnel issues de cette flore appelée "*Clinopodium nepeta*" ont été élaborés. Cette plante appartenant à la famille des Lamiaceae a été récoltée de la région d'Annaba (Algérie).

Ce travail nous a permis :

- ✚ De révéler par des tests de screening phytochimique, la richesse de la plante investiguée en métabolites secondaires, tel que les flavonoïdes, les stérols et stéroïdes, les tannins catéchiques, les huiles volatiles et les coumarines.
- ✚ D'évaluer le rendement d'extraction réalisé et qui était relativement faible. Le rendement le plus élevé a été observé pour l'extrait butanolique avec 3,50 %, suivi par les deux autres extraits avec 1,954 % pour l'extrait d'acétate d'éthyle et 1,952 % pour l'extrait dichlorométhanique.
- ✚ De démontrer la présence des polyphénols et des flavonoïdes en quantité importante notamment dans les extraits butanolique et acétate d'éthyle, par deux méthodes colorimétriques : celle de "Folin-Ciocalteu" et celle de l' $AlCl_3$.

L'étude de l'activité antioxydante en utilisant quatre méthodes complémentaires (Piégeage du DPPH^{*}, CUPRAC, FRAP et le complexe phénantroline), a montré que les extraits étudiés sont dotés d'un potentiel antioxydant important, surtout celui de l'acétate d'éthyle et butanolique. Ce résultat est dû probablement à leurs richesses en polyphénols et flavonoïdes, ce qui concorde avec la grande teneur de cette plante en ces deux composés. En outre, ces résultats montrent que les trois extraits évalués possèdent une activité antioxydante plus puissante que celle de l' α -Tocophérol (Vitamine E).

L'évaluation *in-vitro* de l'activité photoprotectrice des extraits, par le test SPF (facteur de protection solaire), a exhibé que les deux extraits butanolique et celui de l'acétate d'éthyle possèdent un haut potentiel photoprotecteur contre les UV-B. Tandis que l'extrait dichlorométhanique a manifesté un potentiel relativement moyen.

Une sensibilité moyenne des souches microbiennes testées aux concentrations utilisées des extraits a été confirmée. L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de notre travail ouvre plusieurs perspectives pour l'utilisation de "*Clinopodium nepeta*" et ne constitue qu'un début dans le domaine de la recherche des substances naturelles biologiquement actives.

Pour une valorisation plus étendue de la plante investiguée, quelques perspectives sont envisagées à savoir :

- ✓ Développer le test de l'activité antimicrobienne par la détermination de la CMI et la CMB.
- ✓ Elargir le travail pour d'autres activités biologiques tel que : l'activité cytotoxique, l'activité anti inflammatoire, anti tumorale et anti enzymatique.
- ✓ Analyser par HPLC couplée à la masse ou par LC-MS les différents extraits obtenus.
- ✓ Isoler le ou les principe (s) actif (s) responsables des différentes activités.
- ✓ Valoriser le potentiel de la plante dans l'inhibition de la corrosion.

On mentionne que ces travaux ont fait l'objet de deux participations dans deux conférences, une nationale et l'autre internationale sur les plantes médicinales

Annexes

