

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبي بكر بلقايد - تلمسان

Université Aboubakr Belkaïd – Tlemcen –
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des
Sciences de la Terre et de L'Univers
Département de Biologie s/v



Laboratoire de recherche

« Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique »

MEMOIRE

Pour l'obtention du **diplôme de MASTER**

En : Biologie

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

M^{lle} BAROUDI Sihem et Mme. BELGHIT Wafaa

Thème

Recherche *in vitro* de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits aqueux de *Citrus limon*, *Syzygium aromaticum*, *Zingiber officinale* et de leur formulation polyherbale

Soutenu publiquement, le : **22 / 06 /2023**

Devant le jury composé de :

Mr. Azzi R.	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mme. MEDJDOUB H.	MCB	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mme. MERGHACHE D.	MCA	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mme. BENARIBA N.	MCA	Université de Tlemcen	Encadreur

Année universitaire : **2022 / 2023**

Remerciements

Nous remercions le Dieu, notre créateur de nous avoir guidé, aidé et donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail

*Tout d'abord nous tenons surtout à adresser nos plus vifs remerciements à notre encadreur **Dr. BENARIBA N.** Maître de conférences classe **A** au Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen qui nous a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux. Merci pour vos aides précieux et vos orientations. On arrive jamais à exprimer nos sincères remerciements. Veuillez bien nos profonds respects.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement **Mr. AZZI R.** professeur au département de Biologie, et vice doyen chargé de la post graduation, la recherche scientifique et les relations extérieurs de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire. Nous le remercions pour ses conseils et ses orientations.*

*Nous exprimons nos profondes gratitude et nos remerciements à **Dr. MEDJDOUB H.** Maître de conférences de classe **B** au Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail. Nous la remercions pour leurs encouragements et conseils. Veuillez bien recevoir nos profonds remerciements et respects.*

*Nos remerciements s'adressant aussi à **Dr. MERGHACHE D.** Maître de Conférences de classe **A** au Département de Biologie, Université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail et leurs précieux conseils. Veuillez bien recevoir nos remerciements et respects.*

*Nos sincères remerciements s'adressent à **Dr. Abbou Faiza** et **Melle Saadi Fatima** doctorante en biochimie appliqué pour leurs aides, leurs présences, leurs gentillesse et ces précieux conseils au cours de la réalisation de la partie expérimentale de ce travail.*

*Un grand merci est adressé à tous les membres du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimiques, Synthèse et Activité biologique de l'Université de Tlemcen, en particulier **Mme. SERIR Fouzia** et **Melle BENLADGHEM Rachida** pour leurs gentillesse et leurs aides, nous tenons à remercier **Mr. Baraka** pour ces aides et conseils.*

Enfin, nous remercions gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A l'aide du Dieu tout-puissant, j'ai pu achever ce travail, que je suis très heureuse de le dédier à ma précieuse maman pour son amour, son soutien, ses sacrifices et ses précieux conseils, pour son assistance et sa présence dans ma vie que Dieu vous protège.

A mon père, pour ses sacrifices pour m'aider à avancer dans la vie. Merci mes chers pour les valeurs nobles, l'éducation inestimable et le soutien permanent. Que Dieu vous accorde santé et bonheur.

A mes sœurs et frères, pour vos encouragements, vos conseils votre amour. Merci d'avoir me soutenir.

A tous ceux qui m'aiment et m'ont apporté leurs soutiens et leurs aides.

A toute la famille BAROUDI.

Aux âmes de mes grands-pères et mes grandes mères

A ma très chère binôme et sœur BELGHIT Wafaa qui a fourni des efforts pour que nous puissions réaliser ce travail, mes vœux de succès et de bonheur.

A tous mes enseignants de la promotion Biochimie appliquée 2021-2023 qui m'ont fait confiance et m'ont encouragé.

A toute la promotion Biochimie appliquée 2021-2023

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail « Que Allah vous garde et vous protège ».

SIHEM

Dédicace

Avec l'aide de Dieu, je dédie ce modeste travail à ma chère mère, à la lumière de ma vie, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, à la meilleure femme qui est toujours présente, qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Quoi que je fasse ou je dise, je ne saurai point te remercier comme il doit.

A mon cher père, à l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de soi et de bonheur, celui qui a su se montrer patient, compréhensif et qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.

À mon cher mari, pour la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail et à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitude.

*À ma charmante fille **Sofia Insaf***

Que Dieu les protège et que ce travail soit la preuve modeste d'un profond amour pour eux.

A mes précieuses sœurs : Marwa et Safaa et mes chères frères Menawar, Abd el-Rahman et Walid

A mes grands-mères, mes grands-pères maternelle et paternelle, que Dieu les garde

Mes chères tantes et mes chers oncles

*Toute la famille de **BELGHIT, LAYAD et FENIDEK.***

*A ma Binôme et sœur **BAROUDI SIHEM**, je vous remercie du fond du cœur pour ta patience, ton soutien et ta compréhension tout le long de ce projet.*

*A ma meilleure amie et sœur **HAMDAOUI KAMILA**, merci énormément pour ta présence à côté, tes conseils et ton encouragement.*

A mes amies : Mohamed el-Amin, Souhila et toute la promotion de Biochimie appliquée

A tous les membres du laboratoire antibiotiques et antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

WAFAA

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مضادات الأكسدة في المختبر ، باستخدام اختبار الجذر الحر DPPH و اختبار ارجاع الحديد FRAP ، فضلا عن تقييم النشاط المضاد للبكتيريا الذي تم اختباره من خلال طريقة الانتشار على الوسط الصلب باستخدام طريقة الأقراص والأبار الخاصة بالمستخلصات المائية لثمرة الليمون والقرنفل والزنجبيل الطازج الى جانب المستخلص المائي للتركيبية متعددة الأعشاب المتكونة من نفس النباتات السابقة الذكر ، المعدة تحت الارترجاع لمدة 30 دقيقة .

تحديد مستوى المركبات الفينولية في المستخلصات المائية للنباتات المعدة بشكل منفصل و في التركيبية متعددة الأعشاب بين مستويات معتدلة من البوليفينول (87,15 ميكروغرام مكافئ حمض غاليك /مليغرام من المستخلص) والفلافونويد (40,80 ميكروغرام مكافئ حمض كاتشين /مليغرام من المستخلص) والتانين المكثف (2,38 ميكروغرام مكافئ حمض كاتشين /مليغرام من المستخلص) في المستخلص المائي من القرنفل. هذا هو أعلى معدل مقارنة مع المستخلصات الأخرى.

أظهرت جميع المستخلصات نشاطا مضادا للاكسدة على الجذر الحر DPPH ، وخاصة مستخلص القرنفل ، التي تحتوي على $IC_{50} = 2,12$ ميكروغرام/مليانتر تليها مستخلص الصيغة $IC_{50} = 2,85$ ميكروغرام/مليانتر ثم المستخلص المائي للزنجبيل والليمون مع IC_{50} من 5,31 ميكروغرام/مليانتر و 5,78 ميكروغرام/مليانتر ، على التوالي. في اختبار ارجاع الحديد ، يحتوي المستخلص المائي للقرنفل على أفضل قيمة $EC_{50} = 32,37$ ميكروغرام/مليانتر مقارنة بالمقتطفات الأخرى ، في حين أن تأثير التركيبية كان منخفضا للغاية. في النشاط المضاد للبكتيريا ، فإن المستخلص المائي من القرنفل له دائما أفضل تأثير متبوعا باستخراج التركيبية المتعددة الأعشاب على *Staphylococcus aureus* ، *Enterococcus faecalis* ، *Bacillus cereus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Klebsiella pneumoniae* ، في حين أن المستخلص المائي من الزنجبيل ليس له تأثير مضاد للبكتيريا ملحوظ.

في ضوء النتائج ، وجدنا أن القرنفل له تأثير مضاد للجذر الحر ، وله القدرة على ارجاع الحديد ومضاد للجراثيم و لديه القدرة على السيطرة على هذا التأثير عندما يتم خلطه مع الزنجبيل وفاكهة الليمون خاصة في اختبار DPPH والنشاط المضاد للبكتيريا. بينما في اختبار FRAP يتم تثبيط تأثير القرنفل ، لأن مستخلص التركيبية ليس له تأثير مثير للاهتمام على ارجاع الحديد.

الكلمات المفتاحية: الليمون، القرنفل، الزنجبيل، صياغة متعددة الأعشاب، البوليفينول مضادات الأكسدة، مضاد حيوي

Abstract

The aim of this study was to evaluate antioxidant activity *in vitro*, using the DPPH and FRAP assays, as well as the evaluation of antibacterial activity tested by solid-state diffusion using the disc and well method of a polyherbal formulation consisting of lemon fruit, cloves and fresh ginger, prepared ginger, and of each plant prepared separately, prepared as a decoction under reflux for 30 min.

Determination of phenolic compound levels in the aqueous extract of the polyherbal formulation and in the extract of each plant species prepared separately revealed moderate levels of polyphenols (87,15 μg EGA/mg E), flavonoids (40,80 μg EC/mg E) and condensed tannins (2,38 μg EC/mg E) in the aqueous extract of cloves. This is the highest of the other extracts.

All the extracts showed strong antiradical activity on DPPH, particularly the clove extract. In particular clove extract, which recorded an $\text{IC}_{50} = 2,12 \mu\text{g/ml}$, followed by the formulation extract (IC₅₀ of 2,85 $\mu\text{g/ml}$), followed by aqueous ginger and lemon extracts with IC₅₀ values of 5,31 $\mu\text{g/ml}$ and 5,78 $\mu\text{g/ml}$, respectively. With regard to the iron-reducing capacity, the aqueous extract of nail presented the best EC₅₀ value of 32,37 $\mu\text{g/ml}$, compared with the other extracts, while the effect of the formulation was very slight.

In terms of antibacterial activity, the aqueous clove extract still had the best effect, followed by the polyherbal formulation extract on *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, while the aqueous ginger extract has no remarkable antibacterial effect.

In the light of the results, we found that cloves, which have an antiradical anti-free radical, iron-reducing and antibacterial effect, has the ability to dominate this effect when mixed with ginger and lemon fruit, particularly in the DPPH test. DPPH and antibacterial activity. Whereas in the FRAP test, the effect of cloves is inhibited, as the formulation extract shows no interesting effect on iron reduction.

Key words: Lemon, cloves, ginger, polyherbal formulation, polyphenol antioxidant, antibacterial

Résumé

L'objectif de cette étude porte à l'évaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante, en utilisant le test du DPPH et du FRAP, ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne testée par la méthode de diffusion sur milieu solide en utilisant la méthode des disques et de puits de la formulation polyherbale constituée du fruit de citron, des clous de girofle et du gingembre frais ainsi des extraits aqueux de chaque espèce végétale préparé séparément par décoction sous reflux pendant 30 min.

La détermination du taux des composés phénolique dans l'extrait aqueux de la formulation polyherbale et dans l'extrait de chaque espèce végétale préparé séparément a révélé un taux modéré en polyphénols (87,15 µg EAG/mg E), en flavonoïdes (40,80 µg EC/mg E) et en tanins condensés (2,38 µg EC/mg E) dans l'extrait aqueux des clous de girofle. Ce taux est le plus élevé par rapport aux autres extraits.

L'ensemble des extraits ont révélé une forte activité anti-radicalaire sur le DPPH en particulier l'extrait aqueux des clous de girofle qui a enregistré une $IC_{50} = 2,12 \mu\text{g/ml}$, suivie par l'extrait aqueux de la formulation (IC_{50} de 2,85 µg/ml) puis l'extrait aqueux de gingembre et de citron avec des valeurs de IC_{50} de 5,31 µg/ml et 5,78 µg/ml, respectivement. En ce qui concerne le test du pouvoir réducteur du fer, l'extrait aqueux des clous de girofle présente la meilleure valeur de EC_{50} (32,37 µg/ml) par rapport aux autres extraits, alors que l'effet de la formulation était très faible.

Dans l'activité antibactérienne, l'extrait aqueux des clous de girofle présente toujours le meilleur effet, suivie par l'extrait de la formulation polyherbale sur *Bacillus cereus*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa*, tandis que l'extrait aqueux du gingembre n'a aucun effet antibactérien remarquable.

A la lumière de ces résultats, nous avons constaté que les clous de girofle qui présente un effet anti-radicalaire, réducteur du fer et antibactérien prometteur a la capacité de dominer ces effets quand il est mélangé avec le gingembre et le fruit de citron en particulier dans le test de DPPH et l'activité antibactérienne. Tandis que dans le test du FRAP, l'effet des clous de girofle est inhiber, car l'extrait de la formulation polyherbale ne présente aucun effet intéressant sur la réduction du fer.

Mots clés : Citron, clous de girofle, gingembre, formulation polyherbale, polyphénols, antioxydant, antibactérien.

Liste des abréviations

- **ABTS** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **AlCl₃** : Chlorure d'aluminium
- **BHA** : Butyl hydroxy anisole
- **BHT** : Butyl hydroxy toluène
- **CAT** : La catalase
- **Cu²⁺** : Cuivre oxyde
- **CUPRAC** : CUPric Reducing Antioxydant Capacity
- **DPPH** : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.
- **EC₅₀** : Concentration efficace médiane
- **ERO** : Espèces réactives de l'oxygène
- **Fe²⁺** : Fer Ferreux
- **Fe³⁺** : Fer Ferrique
- **FeCl₃** : Chlorure de fer
- **FPH** : Formulation polyherbale
- **FRAP** : Ferric Reducing Antioxydant Power
- **GPx** : Glutathion peroxydase
- **GSH** : Glutathion
- **GSSG** : Glutathion-disulfure
- **H⁺** : Hydrogène
- **H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène
- **H₃O⁺ Cl⁻** : L'acide chlorhydrique concentré
- **H₃PMo₁₂O₄₀** : Acide phosphomolybdique
- **H₃PW₁₂O₄₀** : Acide phosphotungstène
- **HHDP** : Acide hexahydroxydiphénique
- **HOONO** : Peroxynitrite
- **IC₅₀** : La Concentration Inhibant 50%
- **K₃Fe (CN)₆** : Ferricyanure de potassium
- **MHA** : Muller Hinton Agar
- **Mo₈O₂₃** : Molybdène Mo₈O₂₃
- **Na₂CO₃** : Carbonate de sodium
- **NaNO₂** : Nitrite de sodium
- **NaOH** : Hydroxyde de sodium.
- **NO•** : Monoxyde d'azote
- **NOS** : Nitrique oxyde synthase
- **O₂** : Oxygène
- **O₂•** : Anion super oxyde
- **OH** : Groupement hydroxyle
- **ORAC** : Oxygen Radical Absorbance Capacity
- **PBS** : Tampon phosphate salé (Phosphat buffer salin)
- **pH** : Potentiel en hydrogène
- **R%** : Rendement En %.
- **ROO•** : Radicaux peroxydés
- **SOD** : Superoxydes dismutase
- **TCA** : Acide Trichloracétique
- **TCS** : Les tanins condensés
- **THS** : Les tanins hydrolysables
- **ug EAG/mg E** : Microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait
- **ug EC/mg E** : Microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait
- **UrH•-** : Radicale urate
- **UV** : Ultra-violet
- **W₈O₂₃** : Tungstène

Liste des figures

Figure 01 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants	04
Figure 02 : Sources de production des radicaux libres	06
Figure 03 : structure de base des composés phénoliques	13
Figure 04 : Exemples des composés phénoliques.....	13
Figure 05 : structure générale de l'acide benzoïque (A) et de l'acide cinnamique (B).....	15
Figure 06 : Exemples des acides phénoliques	15
Figure 07 : Structure de base d'un flavonoïde	16
Figure 08 : Principaux types de flavonoïdes	16
Figure 09 : Structure générale de tanin condensé et hydrolysable	17
Figure 10 : Structure la molécule d'isoprène	18
Figure 11 : Exemple d'un vrai alcaloïde « La lobéline »	19
Figure 12 : Exemple d'un proto-alcaloïde « β-skytanthine »	20
Figure 13 : Exemple d'un pseudo-alcaloïde « Mescaline »	20
Figure 14 : Feuilles, fleurs et fruits de citron	22
Figure 15 : Arbre giroflier	26
Figure 16 : Les clous de girofle avant séchage (A) et après séchage (B)	26
Figure 17 : Eugénol composant majeur de l'huile essentielle des clous de girofle	27
Figure 18 : Rhizome de <i>Zingiber officinale</i>	28
Figure 19 : Description botanique de gingembre	28
Figure 20 : Quelques composants bioactifs de gingembre	29
Figure 21 : Matériel végétal citron, clou de girofle et gingembre (photo prise au laboratoire)	33
Figure 22 : Montage d'extraction à chaud sous reflux (Photo prise au laboratoire)	34
Figure 23 : Schéma explicatif de la préparation des différents extraits aqueux à partir du fruit de citron (<i>Citrus limon</i>), les clous de girofle (<i>Syzygium aromaticum</i>), les rhizomes de gingembre (<i>Zingiber officinale</i>) et la formulation des trois plantes	36
Figure 24 : Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (RH)	44
Figure 25 : Mécanisme réactionnel du test du FRAP en utilisant le K ₃ Fe (CN)	46
Figure 26 : Courbe étalon de l'acide gallique pour dosage des polyphénols	53

Figure 27 : Courbe étalon de la catéchine pour dosage des flavonoïdes (A) et le dosage des tanins condensés (B).....	54
Figure 28 : Effet anti-radicalaire de l'acide ascorbique sur le DPPH.....	56
Figure 29: Effet anti-radicalaire sur le DPPH des extraits aqueux du citron (A), du clou de girofle (B), du gingembre (C) et de la formulation (D)	57
Figure 30: Les valeurs de IC ₅₀ déterminées dans l'effet anti-radicalaire sur le DPPH	58
Figure 31 : Pouvoir réducteur du fer du BHA (Méthode de FRAP).....	59
Figure 32: Pouvoir réducteur du fer des extraits aqueux du citron (A), du clou de girofle (B), du gingembre (C) et de la formulation (D), (Méthode de PFRAP).....	60
Figure 33 : Valeurs de EC ₅₀ sur la réduction du fer (Méthode de FRAP).....	61
Figure 34 : Zones d'inhibition (mm) obtenues pour l'extrait aqueux du citron (Disques et puits)	63
Figure 35: Zones d'inhibition (mm) obtenues pour l'extrait aqueux des clous de girofle (disques et puits)	65
Figure 36 : Zones d'inhibition (mm) obtenues pour l'extrait aqueux de la formulation polyherbale	68

Liste des tableaux

Tableau 01: Principales espèces réactives oxygénées	05
Tableau 02 : Exemples des Antioxydants	07
Tableau 03: Composés phénoliques, Squelette de base et leurs propriétés	14
Tableau 04 : Quelques exemples des différents types de terpénoïdes	18
Tableau 05: Composition biochimique moyenne dans 100 g de citron	23
Tableau 06: Principaux constituants phytochimiques du citron	24
Tableau 07 : Mode opératoire du dosage des polyphénols totaux	40
Tableau 08 : Mode opératoire du dosage des flavonoïdes totaux	41
Tableau 09 : Protocole du dosage des tanins condensés	43
Tableau 10 : Protocole d'évaluation de l'activité antioxydante par le test de piégeage du radical libre DPPH	45
Tableau 11: Mode opératoire pour évaluation du pouvoir réducteur du fer (FRAP) en utilisant le réactif de ferricyanure de potassium K₃Fe (CN)₆	47
Tableau 12: Caractéristiques et rendements des extraits aqueux de : citron (<i>Citrus limon</i>), du clou de girofle (<i>Syzygium aromaticum</i>), du gingembre (<i>Zingiber officinale</i>) et de la formulation	52
Tableau 13: Screening phytochimique des extraits aqueux du Citron, Clou de girofle, Gingembre et de la formulation	53
Tableau 14: Taux de polyphénols totaux, de flavonoïdes et des tanins condensés dans les extraits aqueux du citron, du clou de girofle, du gingembre et de la formulation	55
Tableau 15: Effet anti-radicalaire de l'acide ascorbique sur le DPPH.....	56
Tableau 16: Effet anti-radicalaire des extraits aqueux sur le DPPH (%)	57
Tableau 17: Le pouvoir réducteur du fer (FRAP) par le BHA	58
Tableau 18 : Le pouvoir réducteur du fer (FRAP) par les extraits aqueux	59
Tableau 19 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'extrait de citron	62
Tableau 20 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'extrait de citron (Méthodes des puits)	62
Tableau 21: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenues pour l'extrait aqueux des clous de girofle (Méthode des disques)	64
Tableau 22: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus pour l'extrait aqueux des clous de girofle (Méthodes des puits)	64
Tableau 23: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus pour l'extrait aqueux du gingembre (Méthode des disques)	65
Tableau 24: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus pour l'extrait aqueux du gingembre (Méthodes des puits)	66
Tableau 25: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus pour l'extrait aqueux de la formulation polyherbale (Méthode des disques)	67
Tableau 26: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus pour l'extrait de la formulation polyherbale (Méthodes des puits).....	67

Table de matière

Introduction générale	01
<i>Synthèse bibliographique</i>	
I. Stress oxydant	
1. Définition du stress oxydant	04
2. Les radicaux libres	04
2.1. Définition des radicaux libres	04
2.2. Les principaux types des espèces réactives d'oxygène (ERO).....	05
2.3. Sources de production des radicaux libres	06
3. Les antioxydants.....	06
3.1. Définition des antioxydants	06
3.2. Classification des antioxydants	07
3.2.1. Les antioxydants enzymatiques	07
3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques	08
1) Le système antioxydant non enzymatique d'origine endogène	08
2) Le système antioxydant non enzymatique d'origine alimentaire	09
3.3. Utilisation des antioxydants	09
3.4. Mode d'actions des antioxydants	10
3.5. Dommage oxydatif aux lipides, protéines et ADN	10
II. Métabolites secondaires	
1. Définition des Métabolites Secondaires	12
2. Classification des métabolites secondaires	12
2.1. Les composés phénoliques	12
1) Les acides phénoliques (C ₆ -C ₁ ou C ₆ -C ₃)	14
2) Flavonoïdes	15
3) Tanins	17
2.2. Les terpènes	18
2.3. Les alcaloïdes	19
III. Plantes étudiées	
1. <i>Citrus limon</i> (Citron)	22
1.1. Description botanique	22
1.2. Classification	22
1.3. Composition chimique et molécules bioactives	23
1.4. Effets thérapeutiques de <i>Citrus limon</i>	25
1.5. Le système antioxydant de <i>Citrus limon</i>	25
1.6. Propriétés antibactériennes de <i>Citrus limon</i>	25
2. <i>Syzygium aromaticum</i> (Clous des girofles).....	26
2.1. Description botanique	26
2.2. Classification	27
2.3. Composition chimique.....	27
2.4. Propriétés thérapeutiques du <i>Syzygium aromaticum</i>	27
3. <i>Zingiber officinale</i> (Gingembre)	28
3.1. Description botanique	28
3.2. Classification du <i>Zingiber officinale</i>	29
3.3. Composition chimique	29
3.4. Propriétés antioxydantes et antibactérienne du <i>Zingiber officinale</i>	30
4. Formulation polyherbale à base des plantes végétales	30

Revue expérimentale

I. Matériel et méthodes

1. Etude phytochimique	33
1.1. Matériel végétal	33
1.2. Préparation des extraits aqueux	34
1.2.1. Préparation de l'extrait aqueux du citron	34
1.2.2. Préparation de l'extrait aqueux des clous de girofle	34
1.2.3. Préparation de l'extrait aqueux du gingembre	34
1.2.4. Préparation de l'extrait aqueux de la formulation polyherbale	35
1.3. Calcul du rendement des extraits	35
1.4. Screening phytochimique	37
1.5. Dosages des polyphénols totaux	38
1.6. Dosage de flavonoïdes totaux	40
1.7. Dosage des tanins condensés	42
1. Evaluation des activités biologiques	43
2.1. Evaluation du pouvoir antioxydant	43
2.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH (2,2- Diphényl-1-picrylhydrazyl)...	43
2.1.2. Pouvoir réducteur de fer « FRAP »	46
2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne	48
2.2.1. Méthode de diffusion sur milieu solide (gélose)	48
1) Préparation du milieu de culture	48
2) Préparation de l'inoculum	48
3) Ensemencement des plaques par écouvillonnage	48
4) Méthode des disques	49
5) Méthode des puits	49
6) Lecture des plaques et interprétation des résultats	50

II. Résultats et interprétations

1. Etude phytochimique	52
1.1. Rendement et propriétés des extraits	52
1.2. Screening phytochimique	52
1.3. Taux de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins condensés	53
2. Activités biologiques	55
2.1. Pouvoir antioxydant des extraits aqueux de citron, du clou de girofle, du gingembre et de la formulation polyherbale	55
2.1.1. Effet anti-radicalaire des extraits sur le piégeage du radical libre DPPH (2,2- Diphényl-1-picrylhydrazyl)	55
2.1.2. Pouvoir réducteur du fer des extraits « FRAP »	58
2.2. Effet anti bactérien des extraits aqueux de citron, du clou de girofle, du gingembre et de la formulation polyherbale évalué par Méthode de diffusion sur milieu solide.....	61
2.2.1. Effet de l'extrait aqueux du citron (Méthode des disques et des puits)	61
2.2.2. Effet de l'extrait aqueux des clous de girofle (Méthode des disques et des puits)	63
2.2.3. Effet de l'extrait aqueux de gingembre (Méthode des disques et des puits).....	65
2.2.4. Effet de l'extrait de la formulation polyherbale (Méthode des disques et des puits).....	66
Discussion	70
Conclusion	76
Références bibliographiques	78

Introduction générale

La recherche de ressources naturelles qui peuvent être utilisées d'une manière complémentaire ou alternative à l'utilisation des médicaments de synthèse constitue l'objectif principal du secteur de la santé publique. La médecine traditionnelle nous offre plusieurs plantes endémiques qui sont considérées comme sources des principes actifs puissants afin de lutter contre le stress oxydatif, les maladies infectieuses, les maladies métaboliques et neuro dégénératives (**Favier, 2006**).

Les plantes médicinales qui constituent une source inépuisable des molécules bioactives, sont largement exploités dans les différents domaines de la recherche scientifiques pour le développement de nouvelles thérapeutiques, nutritives ou cosmétiques (**Eddouks et al., 2007**).

Dans le domaine pharmaceutique, 60% des molécules bioactives utilisées en thérapeutique sont d'origine végétale. Les progrès de la chimie de synthèse et de l'hémisynthèse ont optimisé un nombre important de nouvelles classes de molécules anticancéreuses, anti-inflammatoires, antioxydantes, antidiabétiques et antimicrobiennes (**Bourgaud et al., 2001; Kar, 2007**).

Actuellement, en Algérie la valorisation des propriétés thérapeutiques des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle a suscité un grand intérêt. De nombreux travaux scientifiques sont réalisés dans ce contexte.

Au cours de la pandémie COVID-19, la société algérienne a fréquemment utilisé une préparation médicinale comme remède préventif et curatif de cette infection. Il s'agit d'une formulation polyherbale préparée sous forme de tisane à base de trois espèces végétales le fruit du citron (*Citrus limon*), les clous de girofle (*Syzygium aromaticum*) et le rhizome du gingembre frais (*Zingiber officinale*).

Pour cela nous nous sommes intéressés à l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait aqueux de cette formulation polyherbale et des extraits aqueux du fruit de *Citrus limon*, des clous de *Syzygium aromaticum* et du rhizome de *Zingiber officinale*. L'expérimentation de cette étude regroupe deux grandes parties. Une étude phytochimique basée sur la préparation des extraits aqueux de la formulation (qui regroupe le fruit du citron, le gingembre frais et les clous de girofle), et de chaque échantillon préparé séparément, ensuite la détermination de leurs taux en composés

phénoliques. La deuxième partie de notre étude consiste à l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante en utilisant le test du DPPH et du FRAP, ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne en utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Stress oxydant

I. Stress oxydant

1. Définition du stress oxydant

Le stress oxydant signifie un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) appelés encore composés pro-oxydants, et ceux qui sont responsables de leur contrôle et leur élimination et qui sont les antioxydants, ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes de défense (**figure 01**). Plusieurs conditions peuvent conduire à l'apparition de ce désordre y compris l'âge, l'alimentation, l'exposition aux polluants ou aux métaux lourds, les infections ainsi que le déficit immunitaire (**Di Meo et Venditti, 2020**).

Le stress oxydant est un processus pathologique qui intervient dans le phénomène du vieillissement et de nombreuses maladies comme les maladies cardiovasculaire, neuro-dégénératives (Alzheimer, parkinson,...), le cancer, le diabète (**Zahir et al., 2020**).

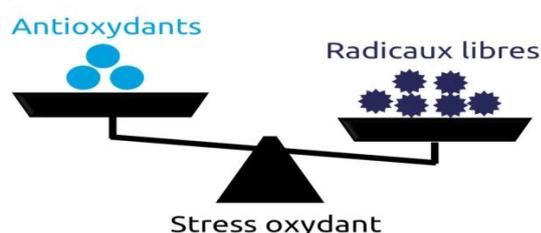


Figure 01 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants

2. Les radicaux libres

2.1. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un nombre impair d'électrons sur sa couche périphérique (externe) ce qui les rend extrêmement réactif. Ces molécules sont caractérisées par leur instabilité et leur réaction rapide avec d'autres composants, afin de capter l'électron nécessaire pour acquérir leur stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical attaque la molécule stable la plus proche, en lui arrachant son électron ; la molécule attaquée devient alors elle-même une molécule instable (**Bayir, 2005**).

2.2. Les principaux types des espèces réactives d'oxygène (ERO) (Tableau 01)

Tableau 01: Principales espèces réactives oxygénées (Sies, 1993)

Espèces réactives oxygénées (ERO)	
Radicalaires	Non radicalaires
$\cdot\text{OH}$ Radical hydroxyle	H_2O_2 Peroxyde d'hydrogène
$\text{RO}\cdot$ Radical alkoxy	ROOH Peroxyde organique
$\text{ROO}\cdot$ Radical peroxy	HOCl Acide hypochloreux
$\text{O}_2\cdot^-$ Anion superoxyde	$^1\text{O}_2$ Oxygène singulet
$\text{NO}\cdot$ Radical oxynitrique	$\text{ONOO}\cdot$ Peroxynitrite

a. L'anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$)

Le radicale superoxyde $\text{O}_2\cdot^-$ est l'ERO qui possède la plus faible réactivité, formé par la réduction mono électrique de l'oxygène (addition d'un seul électron), donne naissance au radicale hydroxyle $\text{HO}\cdot$ très réactif et d'une constante de vitesse faible. Cependant, l' $\text{O}_2\cdot^-$ est capable de produire d'autres radicaux beaucoup plus réactifs. Il s'agit de toxicité indirecte (Haioun et Hamoudi, 2015).

b. Radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$

Le radicale hydroxyle $\text{OH}\cdot$ est l'oxydant le plus puissant des ERO avec une constante de vitesse élevée et peut être formé à partir de l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence des métaux de transition comme le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) qui agissent comme catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle (Chaabi, 2008).

c. Peroxyde d'hydrogène H_2O_2

L'eau oxygénée ou peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un oxydant moléculaire (ayant tous ses électrons périphériques appariés) beaucoup moins puissant produit par la réduction bi électronique de l'oxygène (Halmi, 2015).

d. Monoxyde d'azote $\text{NO}\cdot$

Le monoxyde d'azote radicalaire est produit de manière endogène lors du métabolisme de l'arginine par les nitrique oxyde synthases (NOS) dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. Il est caractérisé par une réactivité limitée et une demi vie de quelques secondes (Blanc et al., 2005). Toutefois, le $\text{NO}\cdot$ peut former avec l'anion super oxyde le peroxynitrite (HOONO) qui est un oxydant puissant et

diffusible, ayant une demi-vie plus prolongée capable d'endommager de nombreuses molécules organiques (**Haleng, 2007**).

2.3. Sources de production des radicaux libres

La création et l'accumulation des radicaux libres dans l'organisme sont liées à l'environnement et le mode de vie des individus. Plusieurs facteurs exogènes favorisent le stress oxydatif, principalement le tabac, l'exposition aux rayons UV, les champs électriques, les polluants industriels, les pesticides, ainsi qu'une alimentation malsaine (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool,..) (**figure 02**). La production endogène des radicaux libres est plus importante que celle d'origine exogène, et elle est contrôlée par les systèmes de défense qui participe au bon déroulement des réactions immunitaires (**Favier, 2006**).

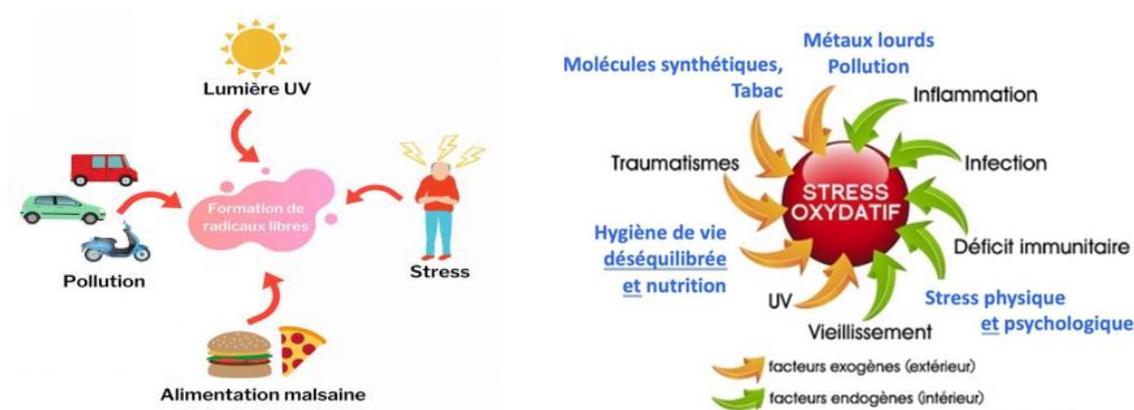


Figure 02 : Sources de production des radicaux libres

3. Les antioxydants

Pour se protéger du stress oxydatif, les organismes vivants ont développé un arsenal d'antioxydants, avec des enzymes (superoxyde dismutase, catalase et glutathion-peroxydase), et des vitamines (A, E, C).

3.1. Définition des antioxydants

Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire. Ces substances sont présentes à faible concentration par rapport à un substrat oxydable, capables d'inhiber ou de prévenir son

oxydation en limitant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif (**Leong et al., 2002**). Les antioxydants sont des.

3.2. Classification des antioxydants

On distingue deux types d'antioxydants (**tableau 02**), les antioxydants enzymatiques ou endogènes qui regroupent les enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), les protéines (ferritine, albumine), les systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases ; et les antioxydants non enzymatiques ou exogènes apportés par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines, caroténoïdes, ubiquinone et polyphénols.

Tableau 02 : Exemples des Antioxydants (Flora, 2009)

Antioxydants	Exemples
Caroténoïdes	β -carotène, Lycopène, Lutéine
Enzymes	SOD, Catalase, GPx
Glutathion	Glutathion
Minéraux	Zinc, Sélénium, Cuivre
Les composés phénoliques	Quercétine, Catéchine
Vitamines	α -tocophérol, Acide ascorbique

3.2.1. Les antioxydants enzymatiques

- *Catalase (CAT)*

La catalase est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, son rôle principal consiste à l'élimination des peroxydes lipidiques résultants de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène selon la formule suivante (**Nicholls, 2012 ; Péry & Garric, 2017**),



- *Superoxydes dismutases (SOD)*

Le superoxyde dismutase est une métalloprotéine capable d'éliminer l'anion superoxyde par une action de dismutation. Il catalyse la conversion de deux ions superoxydes et deux protons en peroxyde d'hydrogène et oxygène selon la réaction suivante (Haleng et al., 2007),



- *Glutathion peroxydase*

La glutathion peroxydase est une enzyme tétramérique à sélénium qui peut catalyser l'oxydation des deux molécules de glutathion (GSH) aux dépens du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en glutathion-disulfure (GSSG) et en deux molécules d'eau (H_2O) selon la réaction suivante (Halliwell et Gutteridge, 2008).



3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques

1) Le système antioxydant non enzymatique d'origine endogène

- *Glutathion*

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants et il est considéré comme le principal antioxydant non enzymatique intracellulaire, aidant les cellules pour la lutte contre les radicaux libres. Il est également impliqué dans une grande variété de processus chimiques dans l'organisme (Valko, 2011).

- *Acide urique*

L'acide urique est un puissant piègeur de radicaux $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$ et $\text{NOO}\cdot$ en produisant le radical urate ($\text{UrH}^{\cdot-}$), qui est relativement stable en raison de la délocalisation des électrons célibataires sur son noyau purine (Halliwell et Gutteridge, 2008).

- *Bilirubine*

La bilirubine est un composé liposoluble et un cytoprotecteur antioxydant physiologique majeur, elle peut protéger la cellule contre les dommages associés à un stress oxydatif correspondant à un excès d' H_2O_2 . Ce composé est capable de piéger les radicaux peroxydes, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle (Algeciras-Schinnich et al., 2007).

2) Le système antioxydant non enzymatique d'origine alimentaire

➤ *Vitamine E*

La vitamine **E** fait partie de la famille des tocophérols. Cette vitamine étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut séquestrer les radicaux libres et empêchent la propagation des réactions de peroxydation lipidique. Son rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydés (**ROO•**) pour former un radical tocophéryle (**Dellatre et al ., 2005**).

➤ *La Vitamine C*

La vitamine **C** ou l'acide L- ascorbique, est un excellent piègeur des **ERO (HO• ou O₂•)**. Elle inhibe la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine **E** à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Elle a de nombreuses fonctions telle que la contribution au bon fonctionnement du système immunitaire et la régénération d'autres antioxydants, tel que l' α -tocophérol, le glutathion et les α -carotènes (**Carr et Frei, 1999**).

➤ *β carotène*

Le chef de file des caroténoïdes est le β -carotène, également appelé provitamine **A** car, après hydrolyse hépatique, il donne naissance à deux molécules de vitamine **A**. il est capable de piéger les radicaux hydroxyles et pyroxyles et ainsi d'inhiber les chaînes de peroxydations lipidiques, il neutralise également l'oxygène singulet (**Sarma., 2011**).

➤ *Polyphénols*

L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits, en légumes et en céréales. Les polyphénols constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. Ce sont d'excellents piègeurs des **ERO** et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (**Sarma, 2011**).

3.3. Utilisation des antioxydants

En plus de leur utilisation comme des antioxydants, pour le stress oxydatif afin de piéger les radicaux libres, les antioxydants sont largement utilisés par l'industrie comme conservateurs pour les aliments, les produits cosmétiques, ou encore pour préserver le caoutchouc ou l'essence.

- ✓ **Dans l'industrie chimique** : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation ;

- ✓ **Dans l'industrie agro-alimentaire** : pour éviter le rancissement des corps gras ;
- ✓ **Dans l'industrie teinturerie** : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture (**K. Bouhadjra, 2011**).

3.4. Mode d'actions des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant (**Favier, 2006**):

- Le captage de l'oxygène singulier ;
- La désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente ;
- La réduction de radicaux ou de peroxydes

I.3.5. Dommage oxydatif aux lipides, protéines et ADN

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'altération de l'ADN (**Hadj Salem J., 2009**), les protéines (oxydation) et les lipides (peroxydation), (**Jacops L., 2009**)...etc. Cette oxydation provoque des dommages surtout sur l'organisme en accélérant le vieillissement, les maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, le cancer et le diabète.

Chapitre II : Métabolites Secondaires

II. Métabolites secondaires

1. Définition des Métabolites Secondaires

D'un point de vue fonctionnel, les métabolites secondaires sont généralement opposés aux métabolites primaires (glucides, lipides et les acides aminés) qui regroupent l'ensemble des voies anaboliques et cataboliques indispensables à la survie et à la reproduction des cellules. Les métabolites secondaires sont définis comme l'ensemble des voies permettant la synthèse de petites molécules, non essentielles mais pouvant procurer un avantage sélectif dans certaines conditions, et constituent la base des principes actifs caractéristiques des plantes médicinales (**Mansour, 2009**).

2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont classés en trois grandes familles chimiques :

- Phénols et polyphénols ;
- Terpénoïdes ;
- Alcaloïdes ;

2.1. Les composés phénoliques

2.1.1. Définition des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonction hydroxyles (**Figure 03**). Actuellement, plus de 8000 structures chimiques regroupent une large gamme de molécules qui contribuent dans la croissance, la signalisation, le développement et la défense des plantes (**Urquiaga et Leighton., 2000; Chira et al., 2008**).

Les polyphénols sont des micronutriments particulièrement abondants dans les fruits, les céréales et les légumes ainsi que dans les boissons comme le thé, le café ou le jus de fruits.

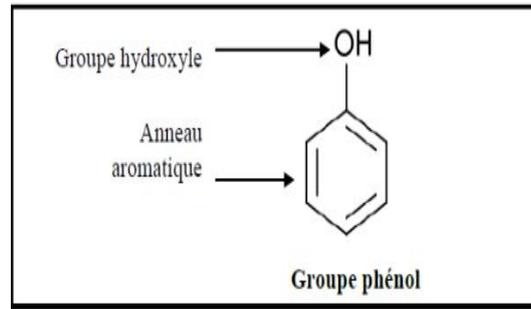


Figure03 : structure de base des composés phénoliques

2.1.2. Classification des composés phénoliques

Les polyphénols peuvent être divisés en différents groupes selon le nombre de leur cycle phénol ainsi que des éléments de structures qui lient les cycles les uns aux autres (**Figure 04 et Tableau 03**). Les polyphénols ont des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreux et anti hyper glycémiantes.

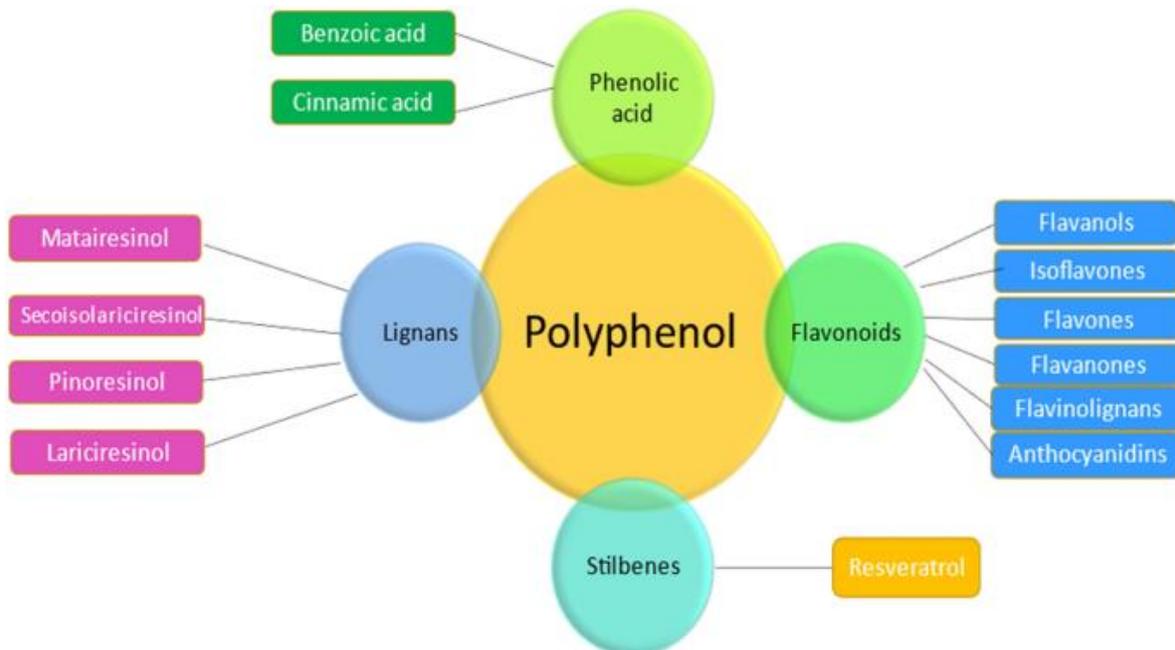


Figure 04 : Exemples des composés phénoliques (**Bharadvaja et al., 2023**)

Tableau 03: Composés phénoliques, Squelette de base et leurs propriétés (**Balasundram et al., 2006; Sanogo I. et Sissoko A., 2020**)

Classe de polyphénols		Squelette de base	Activités	Exemples
Acides phénoliques	Acide hydroxybenzoïque	C₆-C₁	Anti carcinogène Antimutagène Antioxydante	Acide gallique, acide vanillique, procyanidine B1, Théo galline
	Acide hydroxycinnamique	C₆-C₃		Acide caféique, acide férulique, acide p-coumarique, acide rosmarinique
Flavonoïdes	Flavonols	C₆-C₃-C₆	Anti carcinogène Antimutagène Antioxydante Antimicrobienne Antifongique	Hespéridine, naringénine, quercétine, kaempférol, lutéoline
	Flavones			
	Flavanones			
	Anthocyanes.		Antioxydante	Cyanidine, pelargonidine
Tanins		(C₁₅) n	Antioxydante Antitumorale	

1) Les acides phénoliques (C₆-C₁ ou C₆-C₃)

Les acides phénoliques sont des composés organiques contiennent au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, elles peuvent être estérifiées, étherifiées et liées à des sucre sous forme d'hétérosides (**Figure 06**). Ces acides phénoliques sont solubles dans les solvants polaires ; présents en abondance dans les aliments (**Wichtl et Anton, 2009**).

Les acides phénoliques sont divisés en deux classes :

- ✓ Les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ;
- ✓ Les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide coumarique, caféique et férulique (**Figure 05**) (**Pandey et Rizvi, 2009**).

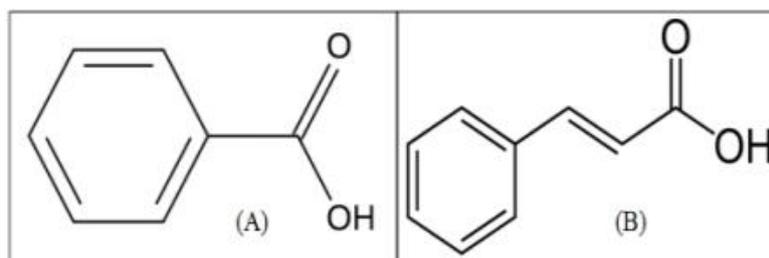


Figure 05 : structure générale de l'acide benzoïque (A) et de l'acide cinnamique (B) (Bruneton, 1993 ; Wichtl et Anton, 2009 ; Collin et Crouzet, 2011)

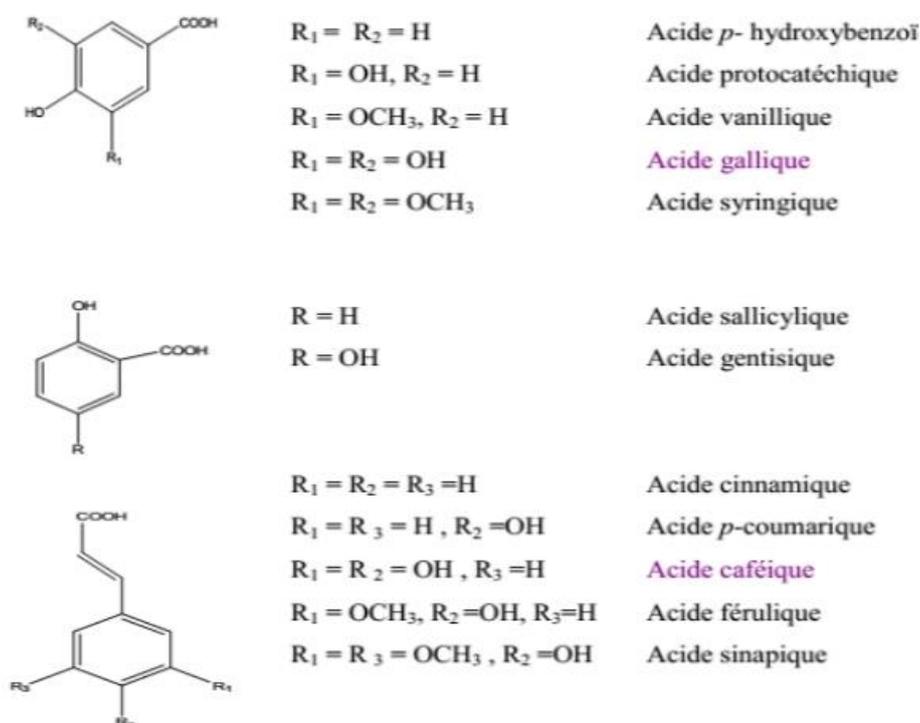


Figure 06: Exemples des acides phénoliques (Bruneton, 1999)

2) Flavonoïdes

La classe la plus largement répandue de polyphénols est celle des flavonoïdes qui représentent dans les aliments, plus de 6000 composés naturels (Erlund, 2004). Ils se caractérisent par 3 cycles, **A**, **B** et **C**, dont seuls **A** et **B** sont des cycles phénoliques, le cycle **C** étant un cycle chromane. Cette structure est généralement noté C₆-C₃-C₆. La structure générale de cette famille présente le cycle **B** en position **C2** du cycle **C** (Figure 07) (Tsao, 2010).

Ils sont fréquents dans les fruits et les légumes, le thé, le café, les aliments et les boissons d'origine végétale, tels que le cacao et le vin. Les flavonoïdes ont des propriétés biologiques importantes : antioxydante, anti-inflammatoire, antiseptique, vitaminique, anti hypertensive et anti-hyper insulinémie.

et jouent un rôle important dans les processus de défense contre les rayonnements UV, le stress oxydatif et la résistance aux phytopathologies (**Bors et al., 1997; Montoro et al., 2005 ; Beretz et Cazenave, 1991**).

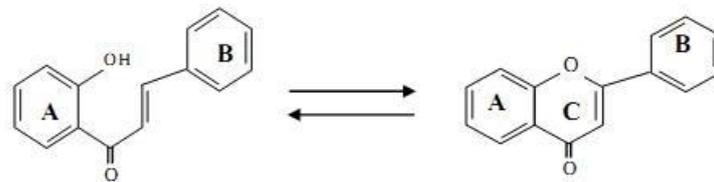


Figure 07: Structure de base d'un flavonoïde (**Heller et Forkmann, 1993**)

Les principales flavonoïdes regroupent des sous-classes, qui sont Flavones et flavanols, Flavonones, flavanols et dihydroflavanols, et les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines (**Figure 08**) (**Rahmani, 2020**).

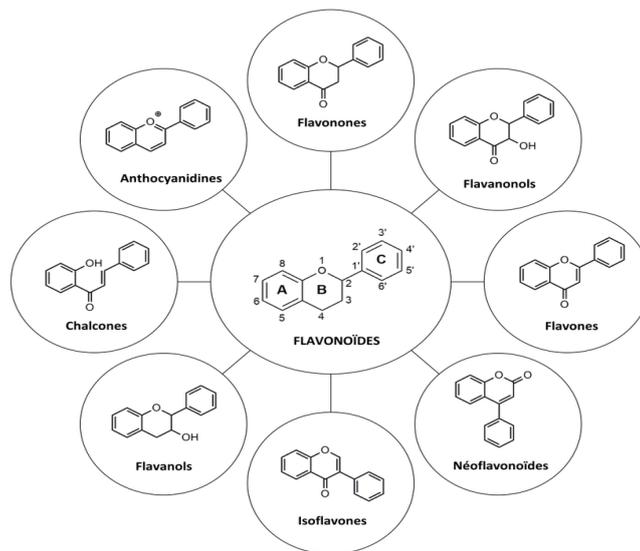


Figure 08: Principaux types de flavonoïdes (**Luthar Z., 1992**)

3) Tanins

Les tanins sont des substances d'origine végétale, non azotées, de structure polyphénolique, et ayant une structure complexe qui leur confèrent la capacité de précipiter les protéines et s'associer avec plusieurs molécules. Les tanins sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales, diverses boissons, et le thé, de plus ils sont caractérisés par leurs propriétés astringentes, anti diarrhéiques, antibactériennes et antifongiques (**Chaouche, 2014**).

Deux sous-classes se distinguent parmi les tannins (**Figure 09**) :

- **Les tanins hydrolysables « THS » :** sont des esters d'acide gallique ou de son produit de condensation : l'acide éllagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés (**Jarrige R. & Ruckebusch Y., 1995**). Ces substances s'hydrolysent facilement et rapidement en milieu acide et alcalin ou sous l'action d'enzymes, pour donner des glucides et des acides phénoliques (**Leinmuller et al., 1991**).
- **Les tanins condensés « TCS » :** sont des composés phénoliques hétérogènes, l'unité de base ou monomère de ces TCS est un flavan-3-ol (catéchine) lié par des liaisons de type C-O-C (type A) ou C-C (Type B) (**Mueller-Harvey, 2001; Schofield et al., 2001; Jean Bruneton, 2009**).

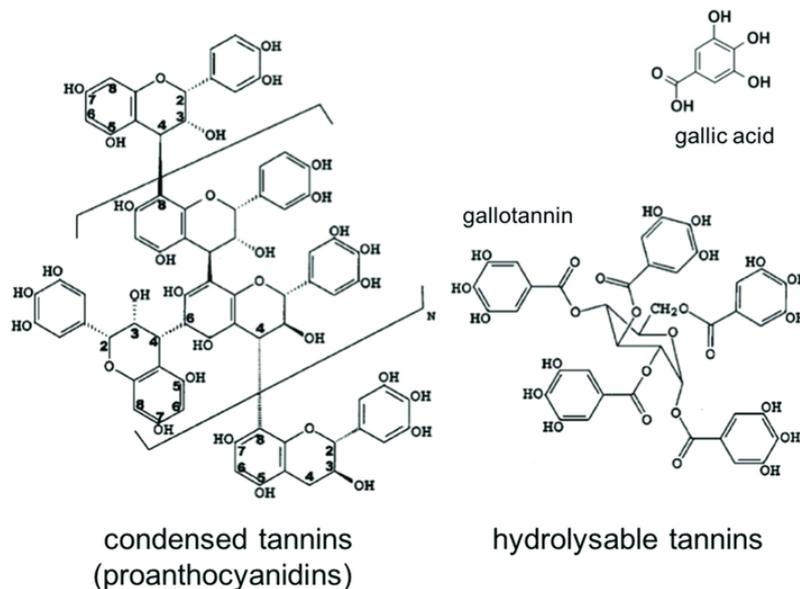


Figure 09: Structure générale de tanin condensé et hydrolysable (**Bruneton, 2009**)

2.2. Les terpènes

Les terpènes, également désignés sous la nomination d'isoprénoïdes, constituent une vaste famille de substances naturelles. Le squelette carboné de ces composés est formellement constitué d'un élément de base commun à un squelette ramifié, à cinq atomes de carbone et dérivé de l'isoprène (**Figure 10**) (**Hopkins, 2003**). Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue : Hémi (**C₅**), mono (**C₁₀**), sesqui (**C₁₅**) qui ont des propriétés antipaludiques, di (**C₂₀**), tri (**C₃₀**), tétra (**C₄₀**) et poly terpènes (> **C₄₀**) (**Tableau 04**) (**Silva et al., 2019**).

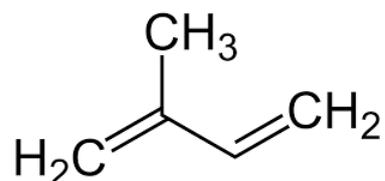
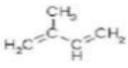
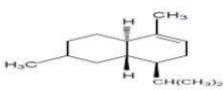
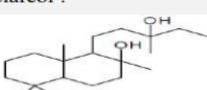
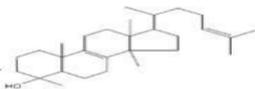
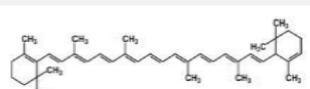


Figure 10 : Structure la molécule d'isoprène (**Calsamiglia et al., 2007**)

Tableau 04 : Quelques exemples des différents types de terpénoïdes (**Belbache, 2003**)

Terpènes	Unités isoprénique	Atomes carbone	de	Exemple
Hemiterpene	1	C5		Isoprène 
Monoterpènes	2	C10		Menthol : 
Sesquiterpènes	3	C15		β-Cadinène : 
Diterpénoïdes	4	C20		Scalaréol : 
Triterpène	6	C30		Lanostérol : 
Tetraterpène	8	C40		Caroténoïdes : 
Polyterpène	>8	>40		Caoutchouc

2.2.1. Activités biologiques des terpènes

Les terpénoïdes jouent de multiples rôles chez les plantes, certaines sont des pigments photosynthétiques (les caroténoïdes) ou des hormones (l'acide abscissique), tandis que d'autres sont utilisés tant que composants de la structure des membranes (les stérols) ou des transporteurs d'électrons (ubiquinone) (Ravan et al., 2014). Les terpènes, en général, possèdent des propriétés Antioxydantes, antimicrobiennes, antifongique, anticarcinogéniques, antimalariales, Antidépessives et diurétiques (SanogoI. et Sissoko A., 2020).

2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques, rencontrés principalement chez les végétaux, mais aussi chez certains animaux et microorganismes (Kambouche N. et al., 2008 ; Achille R. et al., 1980). Ils ont des propriétés Antioxydantes, analgésiques, anti-inflammatoires et anti peroxydation lipidique. Ils présentent une structure complexe, leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique (Badiaga, 2011).

Selon leur origine de biosynthèse, on distingue trois types d'alcaloïdes :

a. Les vrais alcaloïdes : Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel (Figure 11). Ces alcaloïdes sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques (Badiagua, 2011).

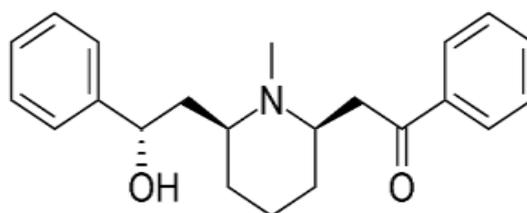


Figure 11 : Exemple d'un vrai alcaloïde « La lobéline » (Badiagua, 2011)

b. Les proto-alcaloïdes : Les proto-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (Figure 12) (Badiagua, 2011).

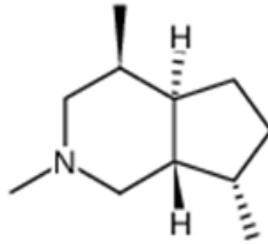


Figure 12 : Exemple d'un proto-alkaloïde « **β -skytanthine** » (Badiagua, 2011)

c. Les pseudo-alkaloïdes : Les pseudo-alkaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, ils ont un caractère basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont solubles dans l'eau (**Figure 13**) (Badiaga, 2011).

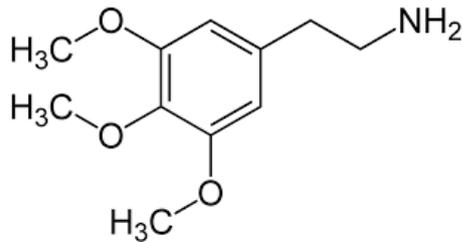


Figure 13 : Exemple d'un pseudo-alkaloïde « **Mescaline** » (Badiagua, 2011)

Chapitre III : Plantes étudiées

1. *Citrus limon* (Citron)

1.1. Description botanique

Le citronnier, un membre de la famille des Rutacées, est un petit arbre (arbuste) vert et aromatique dont la taille peut varier de 2 à 10 mètres de haut, porte 5 à 6 branches charpentières très fournies en rameaux, les racines superficielles forment un réseau dans les 80 premiers centimètres de sol. Les feuilles des citronniers sont des feuilles vertes, alternatives et persistantes, très adurantes en raison des multiples poches à essence qu'elles contiennent, qui sont visibles à l'œil nu (**P. Goetz 2014**).

Le fruit de citronnier est une baie cortiquée selon les espèces, la fleur se transforme en fruit mur, de forme ronde, allongée ou ovale (8 à 12 cm de long sur 5 à 6 cm de diamètre), présentant un téton à une extrémité et quelque fois à chaque extrémité (**Figure 14**) (**Espirad, 2002**). Il existe sous deux formes : le citron doux, fruit décoratif de cultivars à jus peu ou pas acide néanmoins classé *Citrus limon* (L); et le citron acide, le plus commun de nos jours, dont le jus a un pH d'environ 2,5.



Figure 14: Feuilles, fleurs et fruits de citron (**Espirad, 2002**)

1.2. Classification

Selon **Padrini** et **Lucheroni (1996)**, la classification de *Citrus limon* dans la systématique est comme suit ;

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous –classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Sapindale</i>
Famille	<i>Rutaceae</i>
Genre	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>Citrus limon</i>

1.3. Composition chimique et molécules bioactives

Comme les autres agrumes, les feuilles et les fruits très juteux de citron sont des sources de composés naturels, tels que 90% d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3), dont l'acidité est due essentiellement à l'acide citrique accompagné de faibles quantités d'acide malique, caféique et férulique (**Tableau 05**).

Tableau 05: Composition biochimique moyenne dans 100 g de citron (Souci *et al.*, 2008)

Constituant	Teneur moyenne	Constituant	Teneur moyenne
Eau (g)	89,2	Bêta-Carotène (µg)	3
Protéines (g)	0,8	Vitamine E (mg)	0,8
Glucides (g)	2,45	Vitamine C (mg)	53
Lipides (g)	0,3	Vitamine B1 (mg)	0,05
Sucres (g)	2,2	Vitamine B2 (mg)	0,02
Fibres (g)	2	Vitamine B3 (mg)	0,2
Sodium (mg)	< 3	Vitamine B5 (mg)	0,19
Magnésium (mg)	8,93	Vitamine B6 (mg)	0,08
Potassium (mg)	149	Vitamine B9 (mg)	11
Calcium (mg)	18	Phosphore (mg)	15,5

Le citron est un fruit remarquable par sa haute teneur en vitamine C et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables de flavonoïdes et des polyphénols. Les citrons frais sont faibles en calories et en sucres, mais les fibres

(cellulose, hémicellulose et pectines) représentent 2,1 % du poids total. La teneur en protéines ne dépasse pas 1g /100g. Diverses substances minérales ont été identifiées dans le citron, il est riche en calcium, magnésium et potassium qui est le minéral le plus abondant (**Tableau 06**) (**P. Goetz, 2014**).

Tableau 06: Principaux constituants phytochimiques du citron (**P. Goetz, 2014**)

Matière	Famille de constituants	Constituants chimiques
Jus	Flavanones Citroflavonoïdes	de naringine et d'hésperidine (faite d'une flavanone l'hésperétine et le disaccharide-rutinosose) ériodictyol 7-rutinoside, citroflavonoïdes, caroténoïdes, nobilétine
	Acides organiques	d'acide citrique d'acide malique
	Hydrates de carbone	de saccharose, de glucose, lévulose, etc
	Vitamines	de vitamine C (acide ascorbique) de vitamines A et bêta-carotène (provitamine A) Traces de vitamines B1, B2 et B3 ou P, P
	Minéraux et matières générales	Sodium, calcium ; phosphore; silicium, cuivre, phosphore : manganèse, zinc Protéines ; lipides ; glucides ; sucres simples
Peau de citron	Huile essentielle	90 % D-limonène (monoterpène cyclique) 0,4 %, bêtapinène (11,58 %), gammatérpinène (9,28 %), sabinène (1,83 %), alphapinène (1,75 % à 5 %) citronellal, alphaterpinéol, linalyl-acétate, acétate de géranyl, coumarine et autres constituants mineurs

1.4. Effets thérapeutiques de *Citrus limon*

Diverses études expérimentales ont montré l'existence d'une relation importante entre les flavonoïdes du citron et la diminution de l'oxydation (**Gonzalez-Molina et al., 2010**).

- Les écorces et les graines sont employées pour renforcer les défenses immunitaires indispensables, et traiter les maladies dégénératives telles que l'hypertension (**Oboh, 2012**) ;
- La consommation du citron frais ou leurs jus semble être associée à une amélioration des profils lipidiques sanguins, la survie chez les personnes âgées, moins de risque de cancers.

1.5. Le système antioxydant de *Citrus limon*

Le citron est important en raison de ses propriétés nutritionnelles et antioxydantes. Les antioxydants les plus connus sont les caroténoïdes (surtout le β -carotène), l'acide ascorbique, les tocophérols (vitamine E) et les polyphénols. Ces derniers incluent les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques (**Herberg et al., 2004**).

Les résultats de **Parhiz et al., 2015** ont montré que l'activité antioxydante des flavonoïdes de *Citrus limon* est basée sur l'activité de piégeage des radicaux libres afin d'augmenter les défenses cellulaires antioxydantes, et selon **Xavie et al., (2007)**, la vitamine C de *C. limon* empêche la formation des radicaux libres et protège l'ADN des mutations.

1.6. Propriétés antibactériennes de *Citrus limon*

Les études de **Espina et al., (2012)** et **Hamdan et al., (2013)** ont montré que l'huile essentielle de *C. limon* présente une activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries Gram (+) comme *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus capitis*, *Micrococcus luteus*, et sur les bactéries Gram (-) : *Pseudomonas fluorescens* et *Escherichia coli*.

2. *Syzygium aromaticum* (Clou de girofle)

2.1. Description botanique

Le giroflier est un arbre de la famille des Myrtacées, qui pousse uniquement dans les pays tropicaux, qui peut vivre jusqu'à 150 ans (Cechini, 2003 ; Sophie, 2015). C'est un grand arbre en forme conique, et au tronc gris clair, d'une hauteur moyenne de 10 à 12 mètres, qui peut atteindre jusqu'à 20 mètres de haut. Elancé, très touffu, à feuilles persistantes, coriaces, opposées et entières (Figure 15) (Max et Robert, 2003). Ses feuilles persistantes sont ovales et coriaces. Les fleurs à quatre pétales blanc rosé sont caractérisées par leurs sépales rouges persistants. Avant l'épanouissement, les boutons floraux sont nommés « Clous de girofle ». C'est à cette époque qu'on les récolte avant de les laisser sécher plusieurs jours, au soleil jusqu'à ce qu'ils perdent leur couleur rose et prennent une teinte brun foncé (Figure 16) (Auzis, 2007).

Le fruit est une baie appelée « anthofle » allongée de 2,5 cm de long sur 1 à 1,5 cm de large, de couleur rouge foncé à maturité (G.-J., Chavanne M., Flamand E., Jullien A., 1986).



Figure 15: Arbre giroflier (Max et Robert, 2003)



(A)



(B)

Figure 16 : Les clous de girofle avant séchage (A) et après séchage (B) (Auzis, 2007)

2.2. Classification (Ghedira et al., 2010)

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta (= phanérogames)</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina (= angiospermes)</i>
Classe	<i>Magnoliopsida (= dicotylédones)</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille	<i>Myrtaceae</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i>

2.3. Composition chimique

Les clous de girofle sont riches en substances bioactives principalement en huiles essentielles (18 à 20%) riches en eugénol (85 à 95%) (**Figure 17**), en acétate d'eugénol (5 à 10%), α - et β -caryophyllène (5 à 12%) ; en huile fixe (16%) et de faibles teneurs d'amidon et des fibres cellulosiques (**Ghedira et al., 2010 ; Paul et Ferdinand, 2005**). Ils contiennent également des flavonoïdes (0,5%), des tanins (12%), acide phénolique, stérols et des triterpènes (**Max et Robert, 2003**).

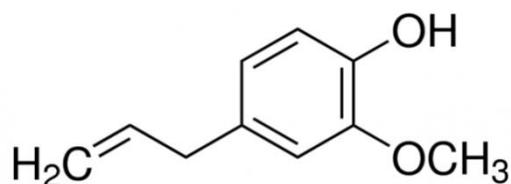


Figure 17: Eugénol composant majeur de l'huile essentielle des clous de girofle
(Ghedira et al., 2010 ; Paul et Ferdinand, 2005)

2.4. Propriétés thérapeutiques du *Syzygium aromaticum*

Les clous de girofle possèdent des propriétés qui sont dues essentiellement lié à l'eugénol qu'il est rapidement métabolisé et caractérisé par ses propriétés, antioxydante, antimicrobienne et antifongique, antivirale, anti-inflammatoire qui soulage les douleurs musculaires ou les rhumatismes, son effet anesthésiant local dans le soin des plaies et dans les odontalgies, sa propriété antiseptique permet de désinfecter les plaies. Il traite les

troubles digestifs en atténuant les maux d'estomac, il est utilisé égale comme antidépresseur.

L'eugénol est un puissant inhibiteur de la croissance des bactéries Gram (+) comme *Bacillus cereus* ; *Bacillus subtilis* ; *Staphylococcus aureus* et Gram (-) telles que : *Escherichia coli* ; *Salmonella typhi* et *Pseudomonas aeruginosa*. (Singh et al., 2009).

3. *Zingiber officinale* (Gingembre)

3.1. Description botanique

La famille des Zingiberaceae est une importante famille botanique qui regroupe plus de 1000 espèces différentes. *Zingiber officinale* est une plante vivace, tropicale et herbacée. Originare des régions tropicales d'Asie tropicale et subtropicale, et mesure environ 1,30 mètre de haut. Il s'agit d'une plante stérile c'est-à-dire n'entraîne pas de reproduction sexuée. La multiplication de la plante se fait grâce aux bourgeonnements de son rhizome à l'origine de nouvelles plantes (Figure 18) (Gigon, 2012).



Figure 18: Rhizome de *Zingiber officinale* (Zerrouk, 2017)

Le *Zingiber officinale* est divisé en deux parties, la partie souterraine représente le rhizome et les racines et, le rhizome de *Zingiber officinale* constitue la partie active de la plante (Faivre et al., 2006). La partie aérienne regroupe les feuilles et les tiges (Figure 19) (Gigon, 2012).

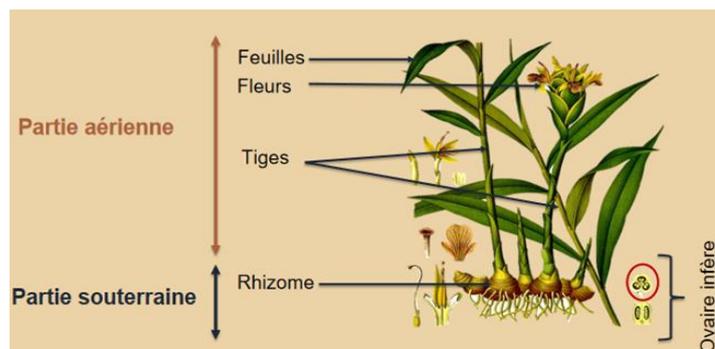


Figure 19: Description botanique de gingembre (Gigon, 2012)

3.2. Classification du *Zingiber officinale* : Classification botanique du gingembre (Faivre et al., 2006 ; Gigon, 2012) :

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Trachéobionta</i>
Embranchement	<i>Spermatophyte</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Sous-classe	<i>Zingiberidae</i>
Ordre	<i>Zingiberales</i>
Famille	<i>Zingiberacées</i>
Sous-famille	<i>Zingibéroïdées</i>
Genre	<i>Zingiber</i>
Espèce	<i>Zingiber officinale</i>

3.3. Composition chimique

La composition chimique du gingembre est complexe : outre l'amidon qui représente une grande partie du poids de la plante environ 60%, il contient des protéines et des lipides (10%), et des huiles essentielles, on distingue l'oléorésine, il est riche en composés phénoliques piquants, des vitamines et des minéraux sont également présents (Bruneton J., 2009). Il contient également quelques flavonoïdes comme la quercétine, la rutine, l'acide gallique, l'acide férulique et l'acide vanillique (Figure 20) (Ghasemzadeh et al., 2010).

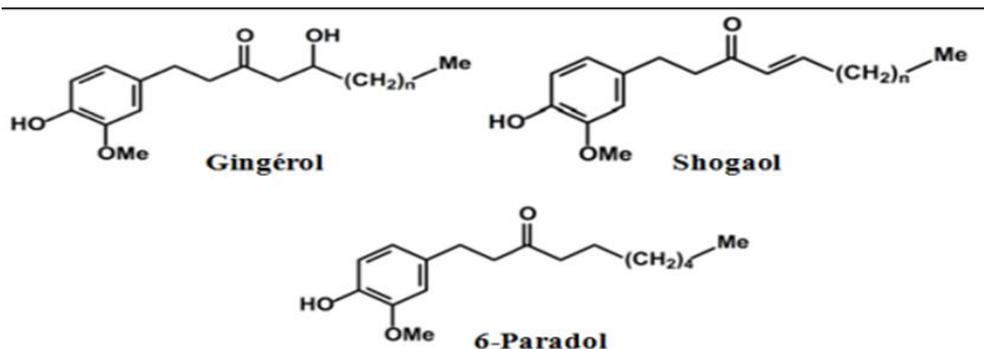


Figure 20: Quelques composants bioactifs de gingembre (Banerjee et al., 2011)

3.4. Propriétés antioxydantes et antibactérienne du *Zingiber officinale*

Le gingembre contient jusqu'aux 12 composés importants qui lui offrent une excellente propriété antioxydante 40 fois plus élevée que la vitamine E (Singh et Kaur, 2012). Ce dernier protège les cellules contre les facteurs responsables du vieillissement cutané (causés par les radicaux libres). L'action antioxydante du gingembre a été proposée comme un agent protecteur contre la toxicité et les rayonnements (Haksar et al., 2006), et comme un médicament antiulcéreux.

Cette propriété antioxydante de *Zingiber officinale* est liée au gingérol qui est un agent très efficace pour la prévention contre les rayonnements ultra-violets, et aussi contre les affections de la peau induites par ces rayonnements. Ce composé inhibe la synthèse de $NO\bullet$ et prévient les dommages de $NOO\bullet^-$ dépendantes, et serait capable aussi d'inhiber la NADPH oxydase (Topic et al., 2002 ; Ippoushi et al., 2003).

Selon la bibliographie les huiles essentielles du gingembre sont de puissants antibactériens notamment les souches *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas sp* (Ficker et al., 2003 ; Sabulal et al., 2003).

4. Formulation polyherbale à base des plantes végétales

La préparation de formulation polyherbale (FPH) est une recette traditionnelle de l'usage des plantes médicinales pour le traitement de certaines maladies, généralement elle est préparée ou prescrite par les herboristes ou les gens ayant une bonne connaissance des plantes médicinales. L'objectif de l'usage des formulations est l'augmentation de l'effet

thérapeutique du mélange des plantes en essayant de créer un effet synergique entre les principes actifs des plantes choisis pour la préparation de FPH.

Récemment certains tests ont été réalisés sur l'effet thérapeutique des FPH, comme l'activité antidiabétique de FPH à base de *Citrullus colocynthis*, *Punica granatum L*, *Coriandrum sativum*, *Juniperus thurifera L.*, *Foeniculum vulgare*, et *Artemisia herba-alba*, qui a révélé une amélioration de l'hyperglycémie et l'hypertriglycéridémie chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine (**Barouki A., Mouchahana S. et Boud C., 2022**).

Dans la société algérienne et pendant la période du COVID-19, une FPH a été largement utilisée comme une tisane préventive et curative de cette infection, elle est constituée du fruit du citron, des clous de girofle et le rhizome frais du gingembre.

Revue expérimentale

Matériel et méthodes

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche: Antibiotiques Antifongiques Physico-chimie, Synthèse et activité biologiques (**LAPSAB**), Département de biologie, Faculté des sciences de la Nature et de la Vie et des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou-Bakr Belkaid-Tlemcen. Elle comporte deux grandes parties :

- Partie phytochimique qui consiste à la préparation des extraits aqueux du citron (*Citrus limon*), du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), du gingembre (*Zingiber officinale*) et de la formulation polyherbale (mélange) des trois échantillons ; un criblage phytochimique et le dosage de polyphénols totaux, flavonoïdes et de tanins condensés dans les extraits préparés.
- Partie activités biologiques qui porte sur la recherche *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits en utilisant le test de DPPH et du FRAP, ainsi que l'activité antibactérienne.

1. Etude phytochimique

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour cette étude est le fruit du citron, les clous de girofle, et les rhizomes frais du gingembre. Ces échantillons ont été achetés chez l'herboriste du centre-ville de Tlemcen, à l'exception du citron qui a été acheté du marché.

Au laboratoire, le jour de l'extraction les échantillons ont été nettoyés par l'eau de robinet, séchés avec du papier ensuite pesés pour lancer les extractions (**Figure 21**).



Figure 21 : Matériel végétal citron, clou de girofle et gingembre (photo prise au laboratoire)

1.2. Préparation des extraits aqueux

La préparation des extraits aqueux a été réalisée par décoction (50°C) pendant 30 minutes, en utilisant l'eau distillée (**Figure 22**).



Figure 22 : Montage d'extraction à chaud sous reflux (Photo prise au laboratoire)

1.2.1. Préparation de l'extrait aqueux du citron

Une quantité de 25g du fruit du citron a été coupé en petits morceaux et mélangée avec 100 ml d'eau distillée, l'ensemble est porté à extraction par décoction pendant 30 minutes.

1.2.2. Préparation de l'extrait aqueux des clous de girofle

Une quantité de 2,5g des clous de girofle a été mélangée avec 100 ml d'eau distillée, l'ensemble est porté à extraction par décoction pendant 30 minutes.

1.2.3. Préparation de l'extrait aqueux du gingembre

25g des rhizomes frais du gingembre ont été coupés en petits morceaux et mélangée avec 100 ml d'eau distillée, l'ensemble est porté à extraction par décoction pendant 30 minutes.

1.2.4. Préparation de l'extrait aqueux de la formulation polyherbale

La formulation polyherbale est basée sur le mélange des trois échantillons précédents en quantités appropriées. La préparation a été réalisée comme suit :

25g de citron (coupés en petits morceaux), 2,5g des clous de girofle, et 25g du gingembre (coupés en petits morceaux) ont été mélangées avec 200 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à extraction par décoction pendant 30 minutes.

Après 30 min d'extraction, les différents extraits ont été filtrés sur papier filtre, ensuite séchés à l'étuve à 37 °C pendant 24 h. Les extraits obtenus sous forme de poudre sont conservés dans des tubes à température ambiante jusqu'au jour d'utilisation. La **Figure 23** résume le protocole d'extraction.

1.3. Calcul du rendement des extraits

Le rendement indique le rapport entre la masse du produit sec récupéré après extraction et la masse du matériel végétal initiale ayant servi pour l'extraction multiplié par cent (100) selon la formule suivante:

$$R (\%) = M / M_0 \times 100$$

- ✓ **R (%)** : Rendement exprimé en %;
- ✓ **M**: Masse en gramme de l'extrait sec résultant;
- ✓ **M₀** : Masse en gramme du matériel végétal initial.

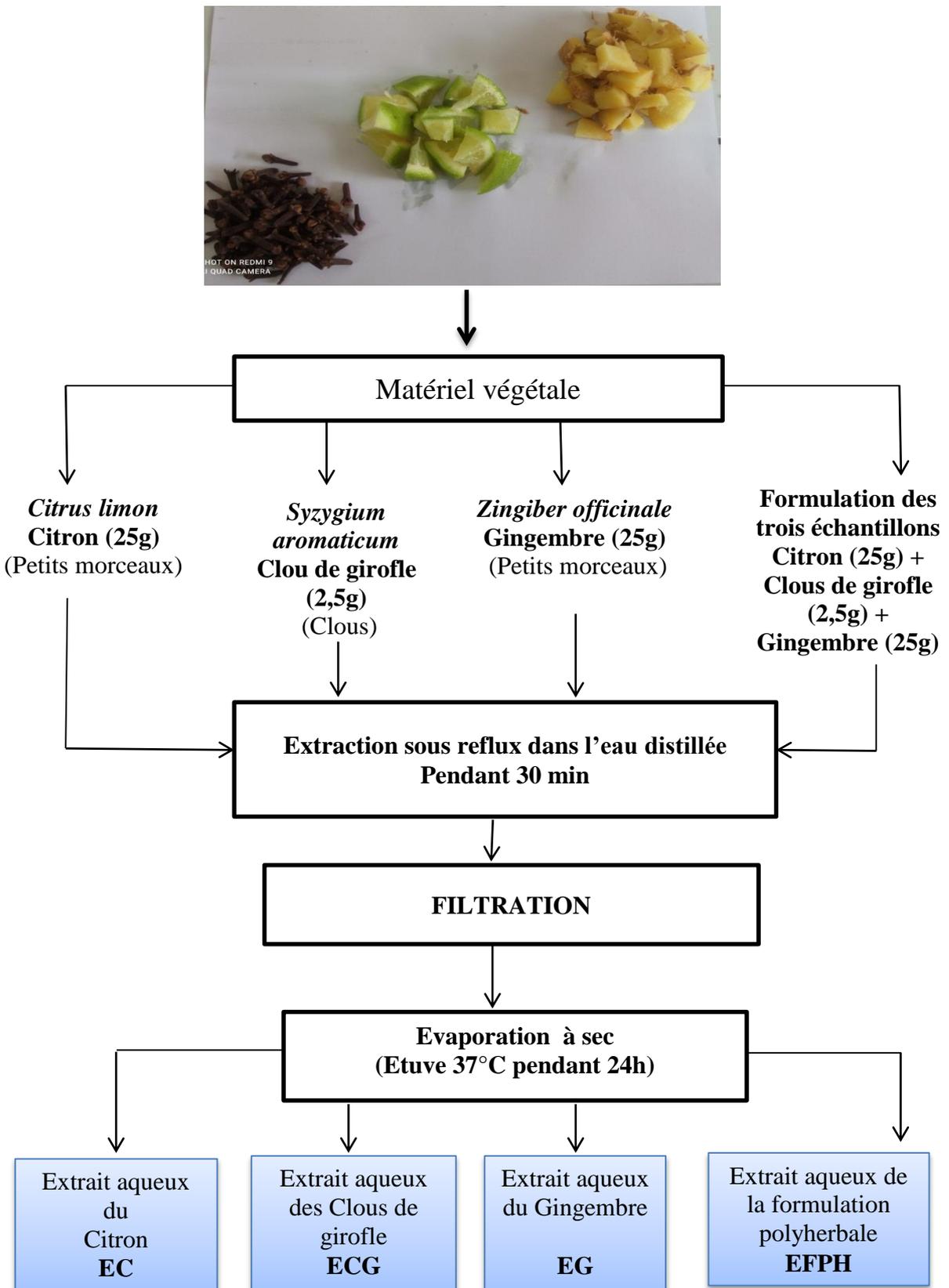


Figure 23: Schéma explicatif de la préparation des différents extraits aqueux à partir du fruit de citron (*Citrus limon*), les clous de girofle (*Syzygium aromaticum*), les rhizomes de gingembre (*Zingiber officinale*) et la formulation des trois plantes

1.4. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les différents extraits aqueux récupérés. La mise en évidence de la présence des métabolites secondaires dans les extraits de plantes est assurée par des tests phytochimiques basés sur des réactions de coloration et de précipitation, réalisés selon les techniques décrites par **Bruneton, (1999); Harbone (1998)**.

1.4.1. Les alcaloïdes

Dans deux tubes à essais, 0,5 ml de l'extrait est acidifié par quelques gouttes de HCl (1%), ensuite 0,5 ml du réactif de Mayer est ajouté dans le premier tube, et 0,5 ml du réactif de Wagner est ajouté dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement, révèle la présence des alcaloïdes.

1.4.2. Les composés phénoliques

▪ Les tanins

Dans un tube à essai introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 0,25 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ (1%). Le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

▪ Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, mélanger 1 ml d'extrait avec 1 ml de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose, rouge ou jaune révèle la présence des flavonoïdes.

▪ Les quinones libres

Un volume de 1ml d'extrait est mélangé avec 0,1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%). L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

▪ Anthraquinones

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 1 ml de NH₄OH (10%), les tubes sont mélangés au vortex. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones.

1.4.3. Les composés terpéniques

• Les terpénoïdes (Test de Slakowski)

Dans un tube à essai, 1 ml de l'extrait à analyser est mélangé avec 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml de l'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

- **Les saponosides (test de mousse)**

Dans un tube à essai, 10 ml de l'extrait à analyser est fortement agité pendant 15 secondes, puis le tube est laissé au repos pendant 15 minutes. La persistance d'une mousse de 1 cm ou plus de hauteur indique la présence de saponosides.

1.4.4. Les composés réducteurs

Dans un tube à essai, ajouter 1 ml de liqueur de Fehling (0,5 ml réactif A et 0,5 ml réactif B) à 1 ml d'extrait à analyser et incuber l'ensemble 08 minutes dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

1.5. Dosages des polyphénols totaux

L'estimation de la teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits a été réalisée par la méthode de dosage décrite par **Vermerius et Nicholson, (2006)** en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

1.5.1. Principe

Cette méthode colorimétrique est basée sur la réduction des constituants du réactif de Folin-Ciocalteu : l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), par les phénols présents dans l'échantillon en un complexe d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de la coloration bleue développée est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu présente un maximum d'absorption à 700 nm.

1.5.2. Mode opératoire : résumé dans le tableau 07 (Benariba et al., 2013 ; Gheffour et al., 2015)

- ✓ Mélanger 0,1ml de chaque extrait à concentration connue (1mg/ml) avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% fraîchement préparée;
- ✓ Agitation des tubes;
- ✓ 1^{ère} incubation pendant 5 minutes à température ambiante;
- ✓ Ajouter 0,1ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 0,2 N;
- ✓ Agitation des tubes;
- ✓ 2^{ème} incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière;

- ✓ La lecture de l'absorbance (DO) est effectuée contre un tube blanc au spectrophotomètre à une longueur d'onde (λ) de 700 nm.

Une gamme étalon est réalisée, en parallèle, dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme témoin positif à différentes concentrations initiales croissantes (50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 ; 600 ; 700 ; 800 ; 900 ; 1000 $\mu\text{g/ml}$).

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits sont déterminées à partir de l'équation de la courbe étalon de l'acide gallique. Elles sont calculées selon la formule suivante, et exprimées en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g Eq AG/mg E}$).

$$[\text{Polyphénols}] = a.f / C$$

A : concentration finale des polyphénols déterminée à partir de la courbe d'étalon;

f : facteur de dilution (22);

C : concentration de l'extrait (1mg/ml).

Tableau 07 : Mode opératoire du dosage des polyphénols totaux

	Blanc	La gamme d'Acide gallique [$\mu\text{g/ml}$]											Extraits [1mg/ml]			
		50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	EC	ECCG	EG	EFPH
A. gallique (ml)	--	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	--	--	--	--
Extrait (ml)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,1	0,1	0,1	0,1
Eau distillée (ml)	0,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Na ₂ CO ₃ 2% (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1^{ère} Incubation pendant 5 min à température ambiante																
Folin-ciocalteu 0.2 N (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2^{ème} Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière																
Mesure de l'absorbance à 700 nm																

1.6. Dosage de flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes contenus dans les extraits des plantes étudiées a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par **Zhishen et al., (1999)**.

1.6.1. Principe :

La détermination du taux de flavonoïdes a été effectuée par la méthode utilisant le chlorure d'aluminium (AlCl_3). Ce dernier en milieu alcalin réagit avec les atomes d'oxygène du groupement hydroxyle (OH) libre des flavonoïdes en entraînant la formation d'un complexe stable de couleur jaune. Le complexe formé absorbe dans le visible à 510 nm.

1.6.2. Mode opératoire : résumé dans le **tableau 08 (Benariba et al., 2013)**

- ✓ Mélanger 250 μl (0,25 ml) de chaque extrait à concentration connue (1mg/ml) avec 1 ml d'eau distillée, et 75 μl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15 % ;
- ✓ Incubation pendant 6 minutes à température ambiante;
- ✓ Ajouter 75 μl de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % au mélange;
- ✓ Incubation pendant 6 minutes à température ambiante;
- ✓ Ensuite, 1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4%, sont ajoutés aux tubes;
- ✓ Le volume final est ajusté à 2,5 ml avec de l'eau distillée;
- ✓ Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, la mesure de l'absorbance est réalisée à 510 nm contre un blanc au spectrophotomètre.

Une courbe étalon de la catéchine utilisée comme contrôle positif avec des concentrations initiales croissantes (20 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 $\mu\text{g/ml}$), a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires.

Tableau 08 : Mode opératoire du dosage des flavonoïdes totaux

Volume	Blanc	La gamme de la Catéchine [$\mu\text{g/ml}$]							Extraits [1mg/ml]			
		20	50	100	200	300	400	500	EC	ECG	EG	EPH
Catéchine (μl)	-	250	250	250	250	250	250	250	---	---	---	---
Extrait (μl)	-	-	-	-	-	-	-	-	250	250	250	250
E.D (ml)	1,250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NaNO ₂ 15% (μl)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
1^{ère} Incubation pendant 6 min à température ambiante												
AlCl ₃ 10% (μl)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
2^{ème} Incubation pendant 6 min à température ambiante												
NaOH 4% (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Eau distillée (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Volume final (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
3^{ème} Incubation pendant 15 min à température ambiante												
Mesure de l'absorbance à 510 nm												

Les concentrations des flavonoïdes totaux contenues dans les extraits sont déterminées à partir de l'équation de la courbe étalon de la catéchine selon la formule suivante, et sont exprimées en microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g Eq C/mg E}$)

$$[\text{Flavonoïdes}] = a \cdot f / C$$

a : concentration des flavonoïdes déterminée à partir de la courbe étalon;

f : facteur de dilution (10);

C : concentration de l'extrait (1 mg/ml).

1.7. Dosage des tanins condensés

1.7.1. Principe

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode à la vanilline en milieu acide. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les tanins condensés en milieu acide en formant un complexe de couleur rose caractérisé par un maximum d'absorption à 500 nm.

1.7.2. Mode opératoire : résumé dans le **tableau 09 (Benariba et al., 2013 ; Gheffour et al., 2015)**

- ✓ Un volume de 50µl de chaque extrait à concentration connue (10 mg/ml) est mélangée avec 1500 µl de vanilline/Méthanol (4%, P/V) ;
- ✓ Un volume de 750µl de l'acide chlorhydrique concentré (H₃O⁺ Cl⁻) concentré est ajouté dans chaque tube.
- ✓ Après homogénéisation, le mélange est incubé à température ambiante pendant 20 minutes
- ✓ L'absorbance de cette préparation est mesurée à 500 nm contre un blanc au spectrophotomètre.

Une courbe étalon a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations initiales croissantes (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/ml).

Les concentrations des tanins condensés totaux contenus dans les extraits sont déterminées à partir de l'équation de la courbe étalon de la catéchine selon la formule suivante. Elles sont exprimées en microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait (**µg Eq C/mg E**).

$$[\text{Tanins}] = a \cdot f / C$$

a : concentration finale des Tanins déterminée à partir de la courbe d'étalon;

f: facteur de dilution (46);

C : concentration de l'extrait (1 mg/mL).

Tableau 09 : Protocole du dosage des tanins condensés

	Blanc	La gamme de la Catéchine [$\mu\text{g/ml}$]											Extraits [10mg/ml]			
		50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	EC	ECG	EG	FFPH
Catéchine (ul)	--	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	--	--	--	--
E.D (ul)	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	--	--	--	--
Extrait (ul)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50	50
Vanilline (μl)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Acide Chlorhydrique concentré (μl)	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Incubation pendant 20 min à température ambiante																
Lecture de l'absorbance à 500 nm																

2. Evaluation des activités biologiques

2.1. Evaluation du pouvoir antioxydant

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro*, le pouvoir antioxydant des molécules des métabolites secondaires des plantes, comme la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle), les ions ferriques pour le FRAP (Potassium Ferricyanide Antioxydant Power) ainsi que par la méthode de blanchiment de β -carotène (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998 ; Karagozler *et al.*, 2008; Bourkhiss *et al.*, 2010). Dans cette étude nous nous sommes intéressés au test du DPPH et la méthode de FRAP.

2.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH (2,2- Diphényl-1-picrylhydrazyl)

* Principe

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits est réalisée par le test anti-radicalaire sur le DPPH, en mesurant la capacité des extraits à piéger les radicaux libres.

Cette méthode utilise un radical relativement stable le DPPH• (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette, qui en présence des antioxydants est réduit en un composé de couleur jaune, le diphényl picryl hydrazine (**Figure 24**), dont la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants donneur de proton présents dans

l'échantillon. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du piégeage du DPPH (Sanchez Moreno, 2002; Parejo *et al.*, 2003).

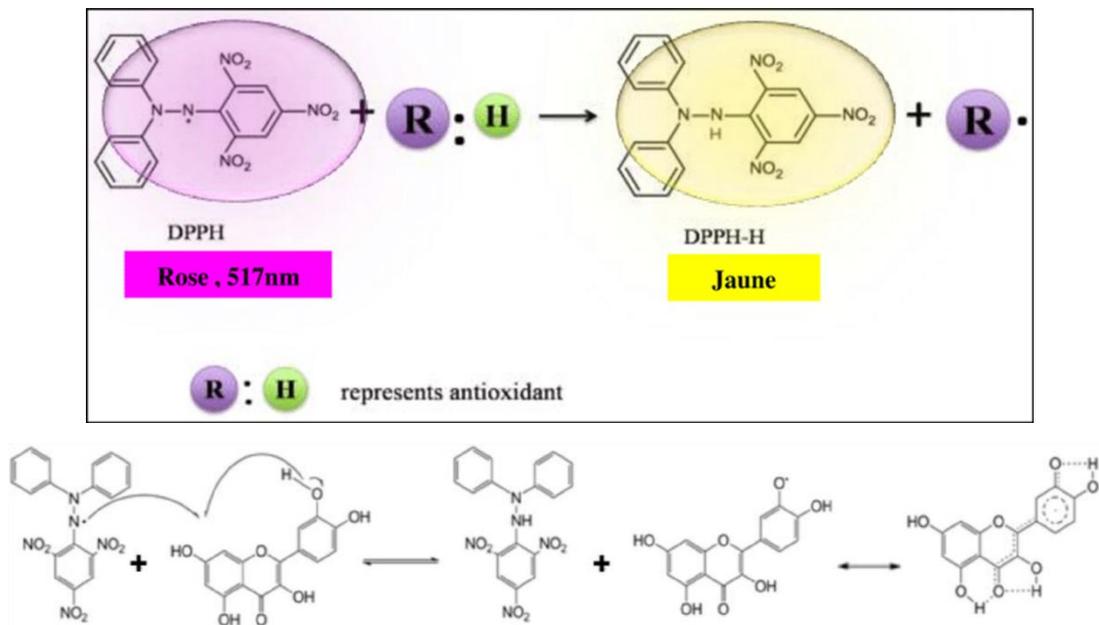


Figure 24 : Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (RH) (Ababsa, N et Boukaous, H., 2018)

* **Mode opératoire :** résumé dans le **tableau 10** (Benariba *et al.* 2013)

L'effet de chaque extrait sur le DPPH a été réalisé en triplicata selon le protocole suivant :

- ✓ Préparation du DPPH• à la concentration de 0.0025mg/ml dans du méthanol;
- ✓ Préparation des extraits dans de l'eau distillée à différentes concentrations (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 250, 500, 650, 1000, 1500 µg/ml);
- ✓ 50 µl de chaque solution d'extrait a été ajouté à 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH ;
- ✓ Préparation du tube blanc pour chaque concentration d'extrait : 1950 µl du méthanol et 50 µl de l'extrait ;
- ✓ Préparation du tube contrôle négatif : 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH avec 50 µl du méthanol. Le tube blanc du contrôle négatif renferme 2 ml du méthanol;
- ✓ Incubation des tubes pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante;
- ✓ Mesure de l'absorbance à **517 nm** contre le tube blanc au spectrophotomètre;

- ✓ L'acide ascorbique a été utilisé comme un contrôle positif testé selon le même mode opératoire à différentes concentrations initiales (20, 40, 80, 120, 160 ; 200 µg/ml);

Tableau 10 : Protocole d'évaluation de l'activité antioxydante par le test de piégeage du radical libre **DPPH**.

	La gamme de l'acide ascorbique [1mg/ml]						Extraits [1.5 mg/ml]				Control négatif	Blanc d'extrait	Blanc du contrôle négatif	
	20	40	80	120	160	200	EC	ECG	EG	EFPH				
Acide ascorbique (µg/ml)	20	40	80	120	160	200								
Acide ascorbique (µl)	50	50	50	50	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-
Les extraits (µl)	-	-	-	-	-	-	50	50	50	50	-	50	-	-
Méthanol (µl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	1950	2000	-
DPPH (µl)	1950	1950	1950	1950	1950	1950	1950	1950	1950	1950	1950	-	-	-
Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité														
Mesure de l'absorbance à 517 nm														

Les résultats de la réduction du DPPH exprimés en pourcentage sont calculés selon la formule ci-dessous. Les résultats sont également exprimés en termes de valeur de **IC₅₀**, qui représente la concentration du substrat responsable de la réduction du **50%** de la forme radicalaire du **DPPH**. Cette valeur, qui est inversement proportionnelle à l'activité antioxydante de l'échantillon, a été déterminée à partir de l'équation des graphes du **DPPH (%) = f(C)**.

$$\text{DPPH \%} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

DPPH% : Pourcentage de réduction du DPPH;

A. contr : Absorbance du témoin négatif ;

A. ext : Absorbance de l'extrait.

2.1.2. Pouvoir réducteur de fer « FRAP »

* Principe

Le pouvoir réducteur du fer des extraits aqueux a été évalué par le test de ferricyanure de potassium. Cette technique colorimétrique est basée sur la mesure de la capacité des extraits testés à réduire de fer ferrique (Fe^{3+}) présents dans le ferricyanure de potassium en fer ferreux (Fe^{2+}). Cette réaction est révélée par l'addition de FeCl_3 dans le milieu qui forme un complexe de couleur bleu-vert avec le fer ferreux (Fe^{2+}) appelé le bleu de Prussian caractérisé par un maximum d'absorbance à 700 nm (**Figure 25**). Une augmentation de l'absorbance indique une augmentation de l'activité antioxydante de l'extrait testé (**Daouda, 2015, bougandoua et al. 2013**).

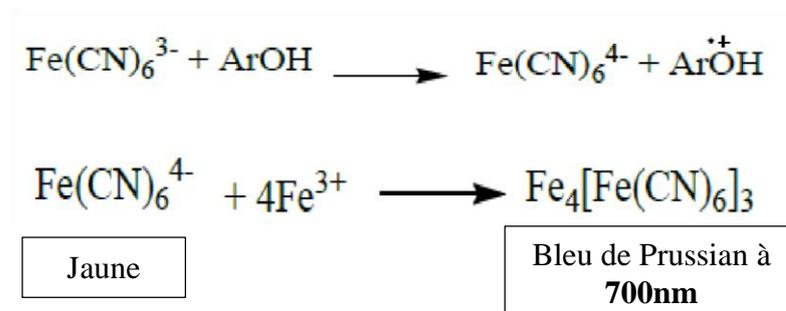


Figure 25: Mécanisme réactionnel du test du **FRAP** en utilisant le $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

* Mode opératoire : résumé dans le **tableau 11**

L'évaluation de l'activité antioxydante par la réduction du fer a été réalisée selon le protocole suivant (**Karagozler et al. 2008**) :

- ✓ 100 μl de chaque extrait à différentes concentrations (150, 250, 500, 650, 1000, 1500 $\mu\text{g/ml}$) est mélangé avec 250 μl d'une solution tampon phosphate 0,2N (pH = 6,6) ;
- ✓ Ajouter 250 μl de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% ;
- ✓ Incubation des tubes dans l'étuve à 50° pendant 20min ;
- ✓ Après refroidissement des tubes à température ambiante pendant 10 minutes;
- ✓ 250 μl d'acide trichloracétique **TCA (10%)** a été ajouté pour arrêter la réaction ;
- ✓ 500 μl de chaque tube est mélangé avec 500 μl d'eau distillée et 100 μl d'une solution de chlorure de fer **FeCl_3 (0,1%)** ;

La mesure des absorbances se fait contre un tube blanc à 700 nm au spectrophotomètre.

L'antioxydant de référence le **BHA (Butyl hydroxyanisole)** est utilisé comme contrôle positif à différentes concentrations initiales (60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 µg/ml).

Tableau 11: Mode opératoire pour évaluation du pouvoir réducteur du fer (FRAP) en utilisant le réactif de ferricyanure de potassium **K₃Fe (CN)₆**

Concentration BHA (µg/ml)	60	80	100	120	140	160	180	200	Extraits				Blanc
									EC	ECG	EG	EFPH	
BHA (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	---	---	---	---	---
Extraits (µl)	---	---	---	---	---	---	---	---	100	100	100	100	---
Eau distillée (µl)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	100
PBS (0,2N ; pH=6,6) (µl)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
K ₃ Fe(CN) ₆ 1% (µl)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Incubation dans l'étuve pendant 20 min à 50°C													
TCA 10% (µl)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Volume pris de chaque tube (µl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Eau distillée (µl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
FeCl ₃ 0,1% (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mesure de l'absorbance à 700 nm													

Les résultats sont exprimés en absorbance en fonction de la concentration, dont la concentration efficace moyenne (**EC₅₀**) qui correspond à une absorbance égale à 0,5, a été déterminée à partir de l'équation de la courbe d'absorbance en fonction des concentrations des extraits $Absorbance = f(C)$.

2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits de citron, de clous de girofle, du gingembre ainsi que la formulation a été évaluée par la méthode des disques et la méthode des puits sur milieu solide.

Cette étude a été réalisée sur des souches bactériennes de référence disponibles au niveau du laboratoire de recherche LAPSAB. Nous avons choisis des bactéries Gram positif : *Bacillus cereus* ATCC 10876 (BC), *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 (EF), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ST), et des bactéries Gram négatif : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (KPM), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PS) et *Escherichia coli* ATCC 8739 (EC).

2.2.1. Méthode de diffusion sur milieu solide (gélose) (Clisi; 2015)

1) Préparation du milieu de culture

- ✓ Préparer le Muller Hinton Agar (MHA) à partir d'une poudre de gélose Mueller Hinton déshydratée ;
- ✓ Après 2 heures de stérilisation à l'autoclave, la gélose refroidis et versée dans des boites de Pétri devant les becs (zone stérile).

2) Préparation de l'inoculum

- Réaliser une pré-culture au préalable des bactéries à tester sur gélose nutritive pendant 24h à 37 °C.
- Cinq colonies sont prélevées à partir de la pré-culture, et mises en suspension dans 2 ml d'eau physiologique (9 g / l de NaCl);
- La suspension obtenue est vortexée pendant 15 secondes, sa turbidité est ajustée au colorimètre à **625 nm** pour obtenir d'un inoculum ajusté à $(1-2 \times 10^8 \text{ CFU/ml})$ (0,5 Mc Farland), dont sa turbidité est équivalente à une norme de 0,5 Mc Farland et une absorbance entre **0.08 et 0.13**.

3) Ensemencement des plaques par écouvillonnage

- ✚ Trempez un écouvillon stérile dans la suspension ajustée ;
- ✚ Inoculer la surface séchée des boites de pétri MHA en étalant l'écouvillon sur toute la surface de la gélose stérile ;
- ✚ Répétez cette procédure en stries 3 fois, en tournant la plaque d'environ 60 ° à chaque fois pour assurer une distribution uniforme de l'inoculum ;
- ✚ Tamponner le bord de la gélose.

4) Méthode des disques

- Dans une boîte Pétri stérile (vide) imbiber un disque en papier buvard par l'extrait (20 µl) et déposer-le à l'aide d'une pince stérile dans la boîte préalablement inoculée par la souche et compléter la procédure pour toutes les concentrations ;
- Appuyez par la pince sur chaque disque pour assurer un contact complet avec la surface de la gélose.
- Ne pas déposer les disques à la proximité du bord de la plaque. Si les disques sont placés trop près du bord de la plaque, les zones peuvent ne pas être complètement arrondies.
- Les plaques sont inversées et placées dans un incubateur à 37° C pendant 18 heures à 24 heures.

5) Méthode des puits

- Des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller Hinton gélose sontensemencées aseptiquement par une suspension bactérienne de 2×10^8 cellules/ml, qui provient d'une culture jeune.
- L'ensemencement de l'inoculum se fait par écouvillonnage sur la gélose par des stries serrées tout en tournant la boîte à 60°C à trois reprises.
- Après solidification du milieu (10 à 15 minutes), la gélose est perforée à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur stérile. Les puits ainsi formés sont remplis des extraits aqueux à tester (environ 30 µl par puits) à différentes concentrations (200, 100, 50, 25 et 12.5 mg/ml) (Valgars et al., 2007).
- Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 37 °C pendant 18 à 24heures et la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition uniformément circulaire (mm). Un extrait est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieure à 9 mm (Lee et al., 2007).

6) Lecture des plaques et interprétation des résultats

- Dans la méthode de diffusion sur milieu solide (Méthode des disques ou des puits) le résultat est exprimé en diamètre de zone d'inhibition autour de chaque disque ou puits ;
- Si la plaque a étéensemencée de manière satisfaisante et que l'inoculum était correct, les zones d'inhibition résultantes seront uniformément circulaires ;

-
- Mesurez le diamètre (D) de la zone d'inhibition au millimètre dont l'échelle de classification est comme suit :
 - $D \leq 8$ mm : Souche résistante ;
 - $9 \text{ mm} \leq D \leq 14$ mm : Souche sensible ;
 - $15 \text{ mm} \leq D \leq 19$ mm: Souche très sensible ;
 - $D \geq 20$ mm : Souche extrême sensible.

Résultats et interprétations

1. Etude phytochimique

1.1. Rendement et propriétés des extraits

Après extraction et récupération des extraits, le rendement calculé a été exprimé en pourcentage. Le **tableau 12** résume les caractéristiques ainsi que les rendements des différents extraits aqueux. On remarque que les extraits sont récupérés sous forme de produit solide de couleur marron. Leur solubilité est totale dans l'eau distillée.

L'extrait aqueux des clous de girofle présente le meilleur rendement **9,03 %** par rapport aux autres extraits, suivi par l'extrait de citron, la formulation polyherbale et le gingembre, qui présentent des rendements de **5,81 % ; 4,12 % et 1,62 %**, respectivement.

Tableau 12: Caractéristiques et rendements des extraits aqueux de : citron (*Citrus limon*), du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), du gingembre (*Zingiber officinale*) et de la formulation

Extraits	Couleur	Aspect	Rendement (%)	Solubilité
Citron	Marron	Pâteux	5,81	Eau distillée
Clou de girofle	Marron	Pâteux	9,03	Eau distillée
Gingembre	Marron	Poudre	1,62	Eau distillée
Formulation	Marron	Pâteux	4,12	Eau distillée

1.2. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les différents extraits aqueux préparés. Le **tableau 13** résume les résultats qualitatifs, qui révèlent la présence des métabolites secondaires dans chaque extrait.

Les tests phytochimiques ont montré la présence des flavonoïdes et des terpénoïdes dans l'ensemble des extraits, et l'absence des alcaloïdes ainsi que les anthraquinones. Les quinones libres sont présentes au niveau de l'extrait du gingembre et de la formulation polyherbale, tandis que les saponosides sont détectés dans l'extrait du citron et du clou de girofle. Ce dernier avec l'extrait de la formulation ont partagé la présence des tanins. Les sucres réducteurs sont observés dans la majorité des extraits à l'exception de l'extrait de clou de girofle.

Tableau 13: Screening phytochimique des extraits aqueux du Citron, Clou de girofle, Gingembre et de la formulation

		Extrait aqueux Citron	Extrait aqueux Clou de girofle	Extrait aqueux Gingembre	Extrait aqueux de Formulation
Alcaloïdes	Réactif de Mayer	-	-	-	-
	Réactif de Wagner	-	-	-	-
Tanins		-	+	-	+
Flavonoïdes		+++	++	+	++
Quinones libres		-	-	++	+
Anthraquinones		-	-	-	-
Saponosides		++	+	-	-
Terpénoïdes : test de Slakowski		+++	+	++	+++
Composés réducteurs		+++	-	+	++

(-) : Absence ; (+) : Faiblement présent ; (++) : Moyennement présent; (+++) : Fortement présent

1.3. Taux de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins condensés

Le taux de polyphénols, de flavonoïdes et des tanins condensés dans les différents extraits a été déterminé à partir des équations de la régression linéaire des courbes étalons en utilisant l'acide gallique pour la détermination des taux des polyphénols et la catéchine pour déterminer le taux des flavonoïdes et des tanins condensés (**Figure 26**, **Figure 27**).

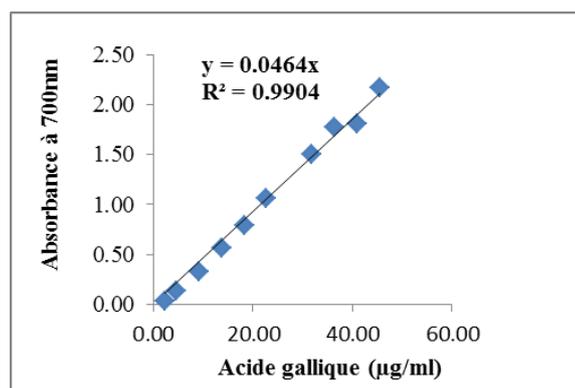


Figure 26 : Courbe étalon de l'acide gallique pour dosage des polyphénols

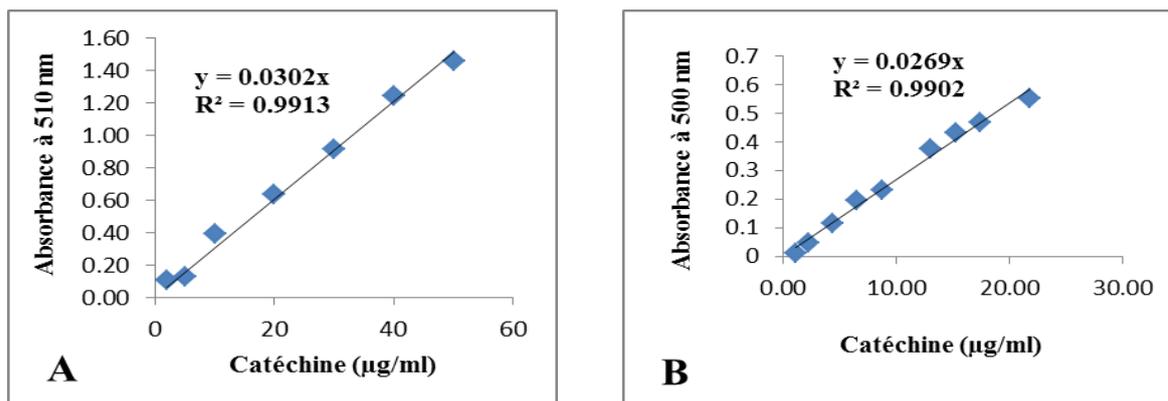


Figure 27 : Courbe étalon de la catéchine pour dosage des flavonoïdes (**A**) et le dosage des tanins condensés (**B**)

Le **tableau 14** représente les résultats obtenus concernant le taux de polyphénols totaux, de flavonoïdes et des tanins condensés dans les extraits aqueux du fruit de citron, des clous de girofle, des rhizomes de gingembre et de la formulation (des trois échantillons précédents ensemble), dont les résultats sont exprimés en microgramme Equivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait (**µg EAG/mg E**) et en microgramme Equivalent de la catéchine par milligramme d'extrait (**µg EC/mg E**), respectivement.

L'extrait aqueux des clous de girofle a révélé un taux élevé en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés avec des taux de **87,15 µg EAG/mg E** ; **40,80 µg EC/mg E** et **2,38 µg EC/mg E**, respectivement par rapport à l'extrait aqueux du gingembre qui renferme un taux de polyphénols de **43,07 µg EAG/mg E** et **27,95 µg EC/mg E** de flavonoïdes avec un taux non déterminé en tanins condensés.

L'extrait aqueux du citron a révélé le taux le plus faible en polyphénols **25,45 µg EAG/mg E** par rapport aux autres extraits. La formulation renferme un taux de polyphénols de **33,50 µg EAG/mg E**. Cette dernière présente le plus faible taux en flavonoïdes **10,14 µg EC/mg E** et en tanins condensés **1,26 µg EC/mg E**.

Tableau 14: Taux de polyphénols totaux, de flavonoïdes et des tanins condensés dans les extraits aqueux du citron, du clou de girofle, du gingembre et de la formulation

Espèces	Polyphénols ($\mu\text{g EAG/mg E}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EC/mg E}$)	Tanins condensés ($\mu\text{g EC/mg E}$)
<i>Citrus limon</i>	$25,45 \pm 0,011$	$14,05 \pm 0,019$	Non déterminé
<i>Syzygium aromaticum</i>	$87,15 \pm 0,015$	$40,80 \pm 0,022$	$2,38 \pm 0,010$
<i>Zingiber officinale</i>	$43,07 \pm 0,013$	$27,95 \pm 0,027$	Non déterminé
Formulation polyherbale	$33,50 \pm 0,003$	$10,14 \pm 0,004$	$1,26 \pm 0,0002$

3. Activités biologiques

3.1. Pouvoir antioxydant des extraits aqueux de citron, du clou de girofle, du gingembre et de la formulation polyherbale

L'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits et de la formulation a été testée par le test du DPPH et du FRAP.

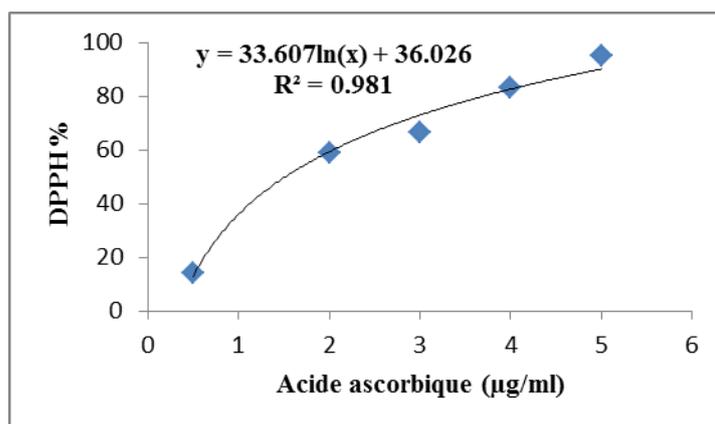
2.1.1. Effet anti-radicalaire des extraits sur le piégeage du radical libre DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl)

Les résultats obtenus à propos des extraits du fruit de *Citrus limon*, les clous de *Syzygium aromaticum*, les rhizome de *Zingiber officinale* et la formulation polyherbale, ainsi que du contrôle positif l'acide ascorbique sur le piégeage du radical libre DPPH, exprimés en pourcentage de réduction du DPPH en fonction des concentrations, sont représentés dans les **tableaux 15 et 16**, et les **figures 28 et 29**.

Selon les résultats obtenus (**Figures 28 et 29**), et à partir de l'équation de la régression logarithmique nous avons calculées la concentration inhibitrice moyenne (IC_{50}) qui correspond au piégeage de 50% du DPPH (**figure 30**). Dans le **tableau 15**, on remarque une augmentation du pourcentage de réduction du radical DPPH proportionnelle à la concentration de l'acide ascorbique (contrôle positif), ce dernier à la concentration de $5\mu\text{g/ml}$ arrive à réduire **95,12 %** du DPPH avec une IC_{50} de **1,51 $\mu\text{g/ml}$** .

Tableau 15: Effet anti-radicalaire de l'acide ascorbique sur le DPPH

	Concentrations d'acide ascorbique ($\mu\text{g/ml}$)					IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	0,5	2	3	4	5	
Réduction de DPPH (%)	14,37 $\pm 0,019$	58,76 $\pm 0,008$	66,29 $\pm 0,010$	83,16 $\pm 0,012$	95,12 $\pm 0,046$	01,51 $\pm 0,080$

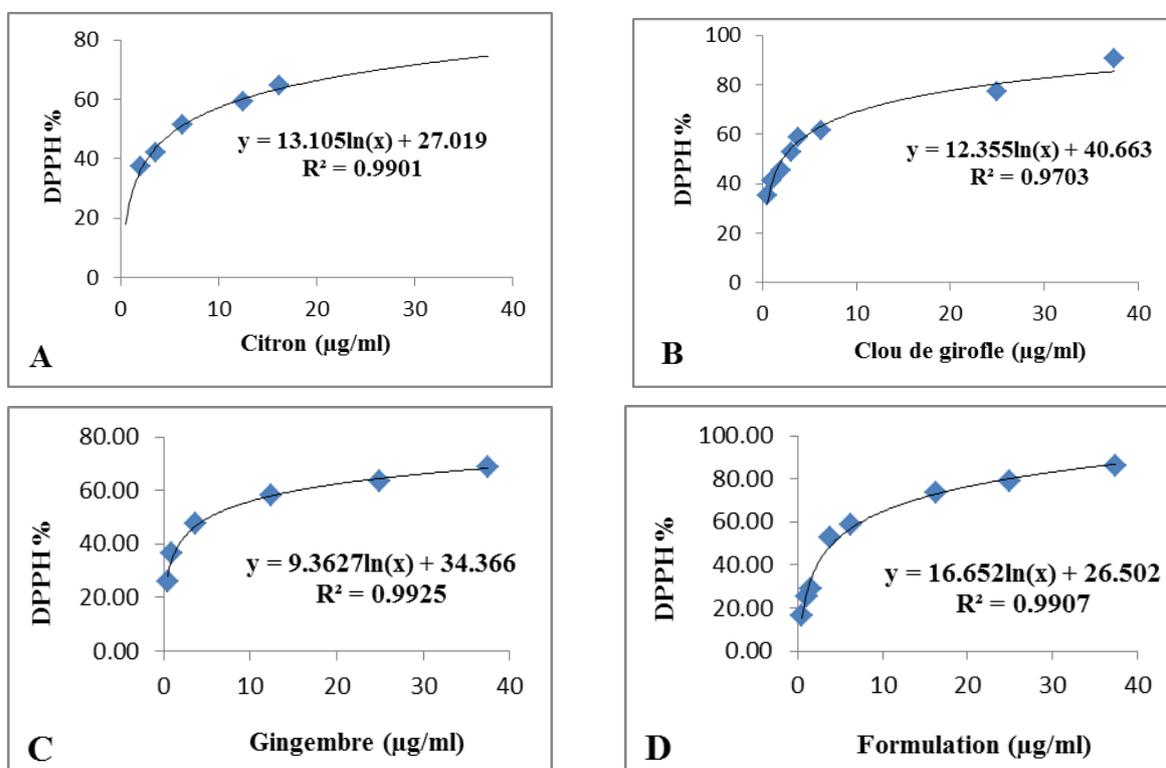
**Figure 28 :** Effet anti-radicalaire de l'acide ascorbique sur le DPPH

L'effet anti-radicalaire des extraits aqueux du citron, des clous de girofle, du gingembre et de la formulation sont représentés dans le **tableau 16** et la **figure 28**. Le meilleur effet a été observé dans l'extrait aqueux des clous de girofle qui arrive à réduire **90,58%** du DPPH à la concentration de 37,5 $\mu\text{g/ml}$, suivi par l'extrait aqueux de la formulation (**85,94 %**), et du gingembre (**68,59 %**). Tandis que l'extrait aqueux du citron arrive à **64,53 %** de la réduction du DPPH.

Plus la valeur de IC₅₀ est faible plus l'activité anti radicalaire sur le DPPH des extraits est efficace. Dans nos résultats, les extraits des plantes étudiées présentent des valeurs de IC₅₀ très intéressantes qui sont de l'ordre de **2,12 $\mu\text{g/ml}$** pour l'extrait aqueux des clous de girofle, **2,85 $\mu\text{g/ml}$** pour l'extrait aqueux de la formulation, **5,31 $\mu\text{g/ml}$** pour l'extrait aqueux du gingembre et **5,78 $\mu\text{g/ml}$** pour l'extrait aqueux du citron (**Figure05**).

Tableau 16: Effet anti-radicalaire des extraits aqueux sur le DPPH (%)

Extraits	Concentrations des extraits (µg/ml)												IC ₅₀ (µg/ml)
	0.5	1	1.5	2	3	3.5	3.75	6.25	12.5	16.25	25	37.5	
Citron		--	--	37,21 ± 0,029	--	41,92 ± 0,021	--	51,26 ± 0,000	59,32 ± 0,008	64,53 ± 0,021	--	--	5,78 ± 0,034
Clou de girofle	35,45 ± 0,004	41,03 ± 0,011	--	45,43 ± 0,003	52,78 ± 0,018	--	58,65 ± 0,007	61,32 ± 0,025	--	--	77,11 ± 0,157	90,58 ± 0,000	2,12 ± 0,010
Gingembre	25,87 ± 0,017	36,30 ± 0,182	--	--	--	--	47,59 ± 0,038	--	58,21 ± 0,003	--	63,24 ± 0,014	68,59 ± 0,017	5,31 ± 0,043
Formulation	16,20 ± 0,051	25,29 ± 0,014	28,97 ± 0,006	--	--	--	52,70 ± 0,004	58,87 ± 0,031	--	73,49 ± 0,083	78,67 ± 0,004	85,94 ± 0,005	2,85 ± 0,062

**Figure 29:** Effet anti-radicalaire sur le DPPH des extraits aqueux du citron (A), du clou de girofle (B), du gingembre (C) et de la formulation (D)

Selon les résultats obtenus, on remarque une augmentation du pourcentage de réduction de DPPH proportionnelle aux concentrations des extraits, dont les extraits aqueux des clous de girofle et de la formulation présentent le meilleur effet anti radicalaire sur le DPPH avec des valeurs de IC₅₀ très proche de celle de l'acide ascorbique (IC₅₀=1,51 µg/ml). Pour cela, on constate que le clou de girofle par son effet anti-radicalaire puissant

sur le DPPH est responsable de l'effet anti-radicalaire de la formulation, ce résultat est probablement lié à l'effet dominant du clou de girofle et non pas l'effet synergique dans la formulation, qui renferme en plus du clou de girofle le citron et le gingembre.

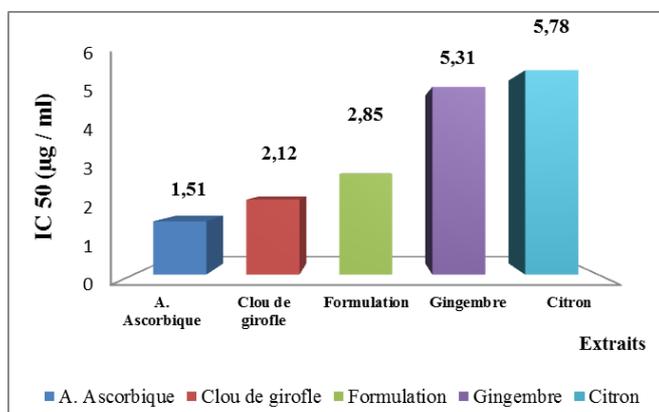


Figure 30: Les valeurs de IC₅₀ déterminées dans l'effet anti-radicalaire sur le DPPH

2.1.2. Pouvoir réducteur du fer des extraits « FRAP »

Le potentiel antioxydant sur la réduction du fer des extraits aqueux du fruit de *Citrus limon*, des clous de *Syzygium aromaticum*, des rhizomes de *Zingiber officinale*, et de la formulation a été déterminé en utilisant comme contrôle positif le BHA (Butyl Hydroxyanisole) dont les résultats obtenus sont mentionnés dans le **tableau 17** et la **figure 31**.

Le **tableau 17** montre que le BHA présente un pouvoir réducteur du fer élevé dont la concentration efficace moyenne (EC₅₀), qui correspond à une absorbance de 0,5, arrive à **15.92 µg/ml** (Figure 30).

Tableau 17: Le pouvoir réducteur du fer (FRAP) par le BHA

	Concentrations de BHA (µg/ml)						EC ₅₀ (µg/mL)
	10	13,33	16,67	20	23,33	30	
Absorbances	0,36	0,44	0,50	0,56	0,63	0,69	15,92
(700 nm)	± 0,010	± 0,000	± 0,001	± 0,014	± 0,021	± 0,003	± 0,050

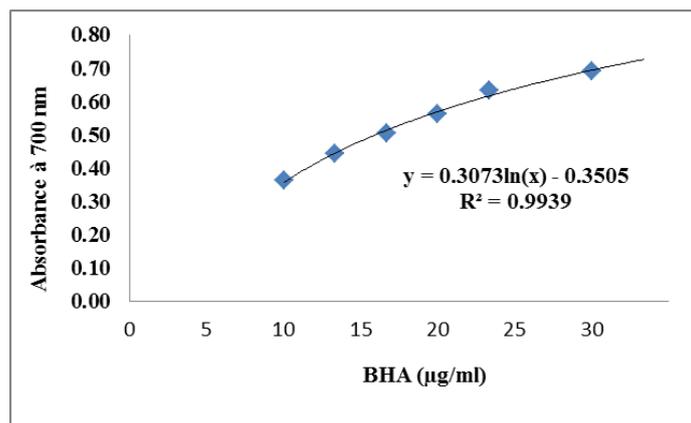


Figure 31 : Pouvoir réducteur du fer du BHA (Méthode de FRAP)

L'effet des extraits aqueux étudiés sur le pouvoir réducteur du fer est représenté dans le **tableau 18** et la **figure 32**. A partir de ces résultats, on remarque un pouvoir réducteur du fer élevé de l'extrait aqueux du clou de girofle, qui présente une EC_{50} de **32,37 µg/ml**. Cette valeur est nettement plus faible que celles des extraits du citron, du gingembre et de la formulation, qui ont montré des valeurs de EC_{50} de **115,65 µg/ml** ; **250 µg/ml** et **522,30 µg/ml**, respectivement.

Tableau 18 : Le pouvoir réducteur du fer (FRAP) par les extraits aqueux

Extraits	Concentrations des extraits (µg/ml)						EC_{50} (µg/ml)
	25	41,67	83,33	108,33	166,67	250	
Citron	0,25 ± 0,014	0,31 ± 0,011	---	0,49 ± 0,037	0,57 ± 0,023	0,63 ± 0,114	115,65 ± 0,074
Clou de gingembre	0,38 ± 0,006	0,61 ± 0,009	0,89 ± 0,000	0,91 ± 0,030	1,06 ± 0,046	---	32,37 ± 0,12
Gingembre	0,04 ± 0,007	0,11 ± 0,008	0,15 ± 0,034	0,21 ± 0,086	---	0,51 ± 0,011	250 ± 0,080
Formulation	0,23 ± 0,021	0,26 ± 0,011	0,33 ± 0,008	---	0,38 ± 0,002	0,45 ± 0,004	522,30 ± 0,039

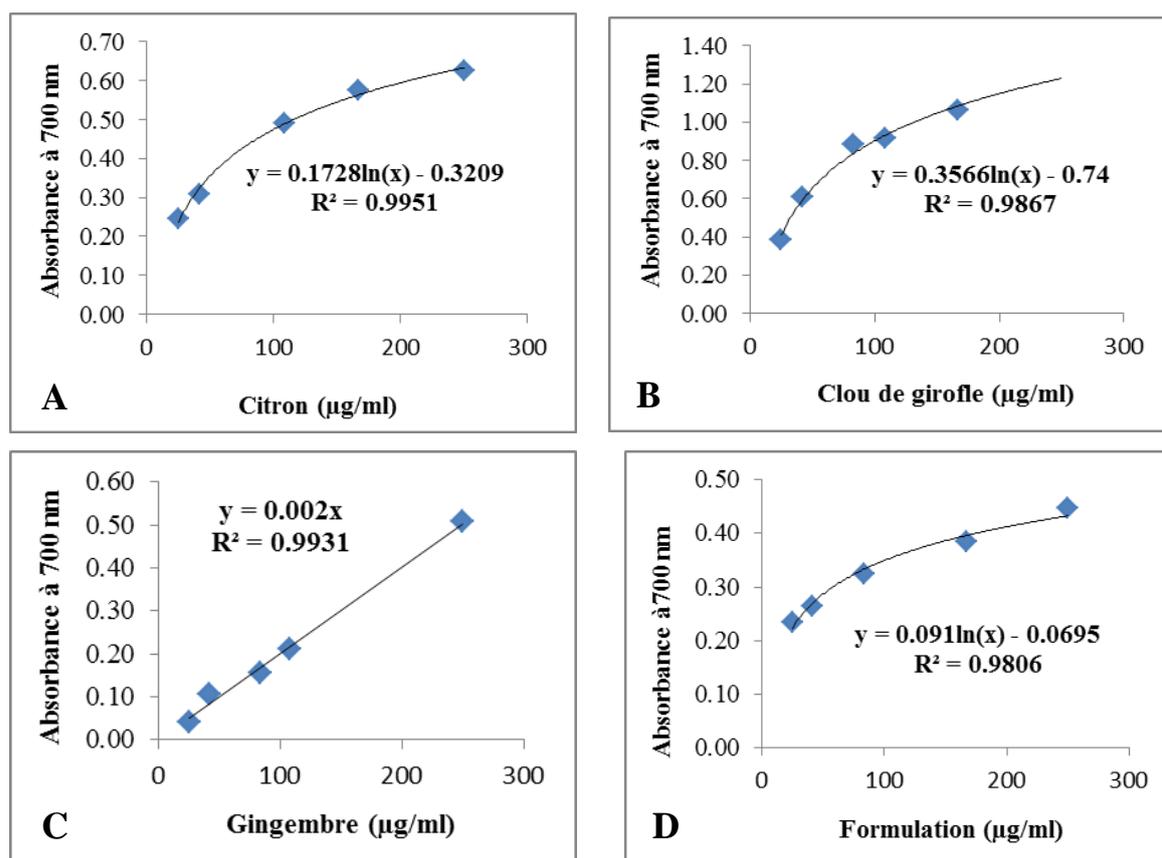


Figure 32: Pouvoir réducteur du fer des extraits aqueux du citron (A), du clou de girofle (B), du gingembre (C) et de la formulation (D), (Méthode de PFRAP)

Selon les résultats obtenus dans la **figure 33**, on observe que l'extrait aqueux du clou de girofle présente le meilleur pouvoir réducteur du fer avec une EC_{50} de **32,37 $\mu\text{g/ml}$** , qui est proche de celle du BHA (**15,92 $\mu\text{g/ml}$**), contrairement aux autres extraits qui ont présenté des valeurs élevées de EC_{50} , citron **115,65 $\mu\text{g/ml}$** , gingembre **250 $\mu\text{g/ml}$** , la formulation **522,3 $\mu\text{g/ml}$** . Pour ce test, et contrairement au test du DPPH, l'effet du clou de girofle a été masqué dans la formulation par les autres extraits d'où on remarque que le pouvoir réducteur du fer par la formulation était le plus faible.

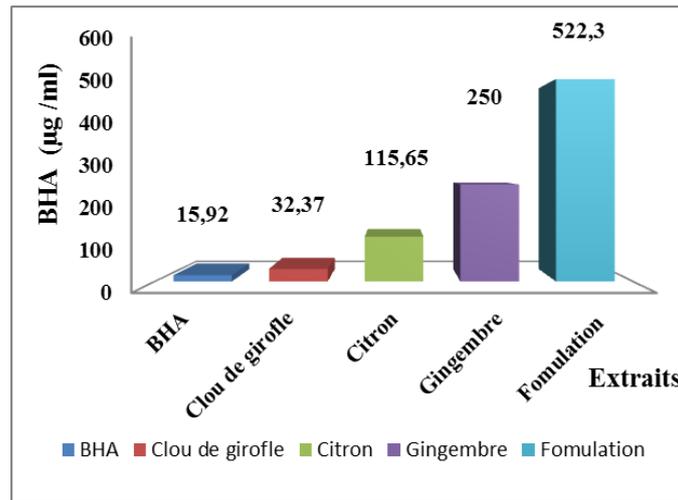


Figure 33 : Valeurs de EC₅₀ sur la réduction du fer (Méthode de FRAP)

2.2. Effet anti bactérien des extraits aqueux de citron, du clou de girofle, du gingembre et de la formulation polyherbale évalué par Méthode de diffusion sur milieu solide

Cette étude est basée sur la mesure du diamètre des zones d'inhibition après 18 à 24 heures d'incubation déterminés pour les extraits aqueux du *Citrus limon*, de *Syzygium aromaticum*, de *Zingiber officinale* et de leur formulation polyherbale. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'extérieur des boîtes de pétri fermées qui ont développés des zones claires autour de chaque disque ou puits.

Les bactéries sont définies sensibles ou résistantes selon une échelle de classement basée sur le diamètre (D) mesuré en millimètre (mm) de chaque zone d'inhibition (Atmani et Baira ; 2015).

- $D \leq 8$ mm : Souche résistante (-);
- $9 \text{ mm} \leq D \leq 14$ mm : Souche sensible (+);
- $15 \text{ mm} \leq D \leq 19$ mm: Souche très sensible (++);
- $D \geq 20$ mm : Souche extrême sensible (+++)

2.2.1. Effet de l'extrait aqueux du citron (Méthode des disques et des puits)

Les résultats du pouvoir antibactérien de l'extrait aqueux du citron sur les souches bactériennes étudiées figurent dans les **tableaux 19** et **20**.

Pour la méthode des disques, la souche *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 est la plus sensible (11 mm) à l'extrait aqueux du citron notamment à la forte concentration 200

mg/ml. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 sont les souches les plus résistantes à cet extrait. Concernant la méthode des puits, cet extrait présente un effet antibactérien sur la totalité des souches qui sont sensibles avec un diamètre maximal de 13 mm, à l'exception de *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 qui est très sensible avec un diamètre d'inhibition de 17 mm.

La comparaison des résultats des deux méthodes (des puits et des disques) nous a permis de constater que la méthode des puits permet d'obtenir des diamètres de zones d'inhibition supérieurs à ceux obtenus par la méthode des disques.

Tableau 19 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'extrait de citron
(Méthode des disques)

		Extrait du citron (mg /ml)				
		200	100	50	25	12,5
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	10	8	R	R	R
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	11	R	R	R	R
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R	R	R	R	R
Bactéries Gram négatif	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	R	R	R	R	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	9	9	8	8	R
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	9	9	R	R	R

R : Résistante

Tableau 20 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'extrait de citron
(Méthodes des puits)

		Extrait de citron (mg /ml)				
		200	100	50	25	12,5
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	12	12	10	R	R
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	17	12	R	R	R
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13	11	R	R	R
Bactéries Gram négatif	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	11	10	R	R	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13	11	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	13	11	R	R	R

Selon la **figure 34** qui montre le diamètre maximal des zones d'inhibition (mm) de l'effet antibactérien de l'extrait aqueux de citron sur les souches étudiées, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 est la souche la très sensible par rapport aux autres souches dans les deux techniques utilisées.

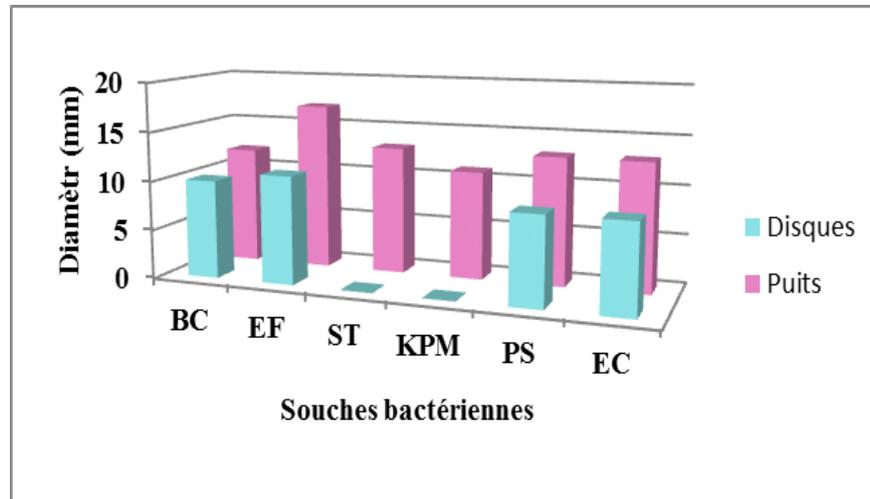


Figure 34 : Zones d'inhibition (mm) obtenues pour l'extrait aqueux du citron (Disques et puits)

2.2.2. Effet de l'extrait aqueux des clous de girofle (Méthode des disques et des puits)

L'extrait aqueux du clou de girofle révèle un effet antibactérien très important exprimé par la sensibilité de la majorité des souches bactériennes étudiées. Les résultats obtenus sont représentés dans les **tableaux 21** et **22**.

Dans la méthode des disques, la souche extrêmement sensible l'extrait aqueux du clou de girofle est *Bacillus cereus* ATCC 10876 avec un diamètre d'inhibition de 20 mm. Les souches désignées sensibles sont *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui présentent des diamètres variables entre 11 et 12 mm. Tandis que, *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 sont les deux souches résistantes.

Dans la méthode des puits, certaines souches sont sensibles à l'extrait de clous de girofle comme *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 ayant présentés des diamètres de 19,18 et 15 mm, respectivement. D'autres souches sont extrêmement sensibles comme *Staphylococcus*

aureus ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec des diamètres de 27 et 22mm, respectivement. *Escherichia coli* ATCC 8739 est la seule souche résistante.

Tableau 21: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenues pour l'extrait aqueux des clous de girofle (Méthode des disques)

		Extrait de clou de girofle (mg /ml)				
		200	100	50	25	12,5
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	20	17	15	10	10
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	12	10	9	8	7
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11	10	R	R	R
Bactéries Gram négatif	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	R	R	R	R	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11	9	8	R	R
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	R	R	R	R	R

Tableau 22: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus pour l'extrait aqueux des clous de girofle (Méthodes des puits)

		Extrait de clou de girofle (mg /ml)				
		200	100	50	25	12,5
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	15	11	11	9	7
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	19	15	12	10	9
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27	21	20	18	16
Bactéries Gram négatif	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	18	15	12	11	10
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	22	20	17	R	R
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	R	R	R	R	R

La figure 35 montre le diamètre maximal des zones d'inhibition (mm) qui résume l'effet antibactérien de l'extrait aqueux de clou de girofle sur les différentes souches bactériennes étudiées. Dans cette figure on remarque que *Bacillus cereus* ATCC 10876 est la souche extrêmement sensible dans la méthode des disques, tandis que dans la méthode

des puits on remarque que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est la souche extrêmement sensible. *Escherichia coli* ATCC 8739 la souche la plus résistante dans les deux méthodes.

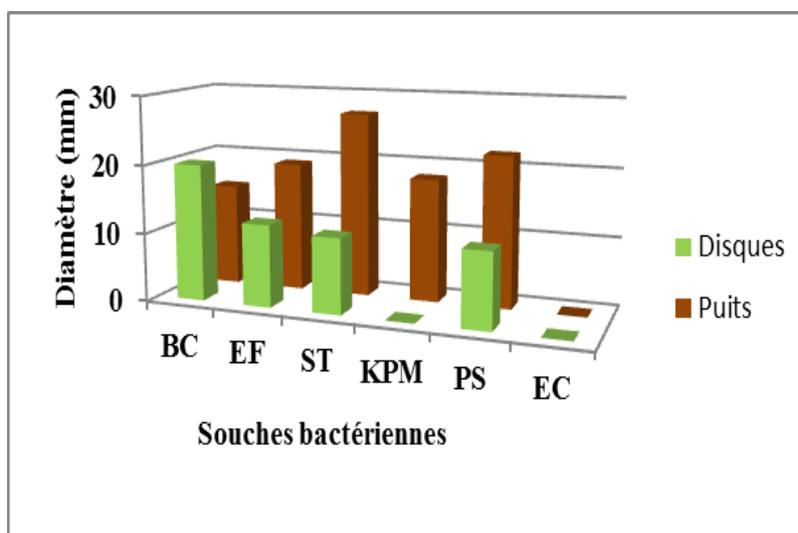


Figure 35: Zones d'inhibition (mm) obtenues pour l'extrait aqueux des clous de girofle (disques et puits)

2.2.3. Effet de l'extrait aqueux de gingembre (Méthode des disques et des puits)

L'extrait aqueux du gingembre n'a aucun effet antibactérien sur les souches bactériennes étudiées qui ont montré une résistance en utilisant les deux méthodes. Les résultats obtenus sont montrés dans les **tableaux 23** et **24**.

Tableau 23: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus pour l'extrait aqueux du gingembre (Méthode des disques)

		Extrait de gingembre (mg/ml)				
		200	100	50	25	12,5
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	R	R	R	R	R
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	R	R	R	R	R
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R	R	R	R	R
Bactéries Gram négatif	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	R	R	R	R	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	R	R	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	R	R	R	R	R

Tableau 24: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus pour l'extrait aqueux du gingembre (Méthodes des puits)

		Extrait de gingembre (mg /ml)				
		200	100	50	25	12,5
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	R	R	R	R	R
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	R	R	R	R	R
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R	R	R	R	R
Bactéries Gram négatif	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	R	R	R	R	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	R	R	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	R	R	R	R	R

2.2.4. Effet de l'extrait de la formulation polyherbale (Méthode des disques et des puits)

L'extrait aqueux de la formulation a montré un effet antibactérien sur l'ensemble des souches étudiées par les deux méthodes utilisées. Les résultats observés sont regroupés dans les **tableaux 25** et **26**.

Pour la méthode des disques, l'ensemble des souches sont sensibles à l'extrait aqueux de formulation dont *Bacillus cereus* ATCC 10876 semble la souche la plus sensible avec un diamètre de 13 mm.

Pour la méthode des puits, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 8739 sont les souches très sensibles avec des diamètres de 17 et 16 mm, respectivement. Le reste, sont des souches sensibles avec des diamètres qui varient entre 10 et 13 mm.

Tableau 25: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus pour l'extrait aqueux de la formulation polyherbale (Méthode des disques)

		Extrait de formulation (mg/ml)				
		200	100	50	25	12,5
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	13	9	9	7	R
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	10	9	7	R	R
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10	9	R	R	R
Bactéries Gram négatif	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	12	8	9	9	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12	9	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	9	R	R	R	R

Tableau 26: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus pour l'extrait de la formulation polyherbale (Méthodes des puits)

		Extrait de formulation (mg/ml)				
		200	100	50	25	12,5
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	13	12	11	8	R
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	12	9	8	R	R
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	17	16	12	10	R
Bactéries Gram négatif	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	10	R	R	R	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13	10	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	16	8	R	R	R

La figure 36 montre les diamètres des zones d'inhibition (mm) qui sont obtenus pour l'extrait aqueux de formulation vis-à-vis les différentes souches bactériennes étudiées. La figure montre que la totalité des souches sont sensibles dans la méthode des disques. Tandis que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 8739 semblent les souches les très sensibles dans la méthode des puits.

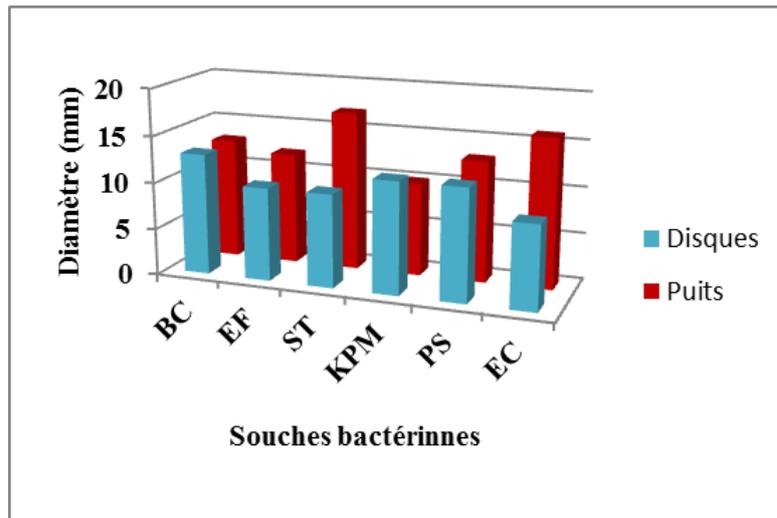


Figure 36 : Zones d'inhibition (mm) obtenues pour l'extrait aqueux de la formulation polyherbale

En conclusion, l'effet antibactérien diffère d'un extrait à autre selon la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes à ces extraits. Les résultats obtenus ont montré une résistance de l'ensemble des souches bactériennes étudiées vis-à-vis l'extrait aqueux du gingembre. Les autres extraits ont marqué la sensibilité des souches bactériennes à l'exception d'*Escherichia coli* ATCC 8739 qui est résistante à l'extrait aqueux du clou de girofle. Ce dernier a le diamètre de zone d'inhibition le plus élevé 27 mm pour la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 qui est extrêmement sensible à cet extrait, très sensible à l'extrait aqueux de la formulation (17 mm), et qui reste sensible à l'extrait aqueux du citron (13 mm).

Deux méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits étudiés, la méthode des disques et des puits, dont la méthode des puits a permis l'obtention de meilleurs résultats que ceux de la méthode des disques.

Discussion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH et FRAP) et antibactérienne (méthode de diffusion sur milieu solide) d'une formulation polyherbale fréquemment utilisées comme une tisane curative et préventive au cours de la pandémie du COVI-19. Cette formulation polyherbale est un mélange de trois espèces végétales le fruit du citron (*Citrus limon*), les clous de girofle (*Syzygium aromaticum*) et le rhizome du gingembre frais (*Zingiber officinale*).

Quatre extraits aqueux ont été préparés dans cette étude, un extrait du fruit de citron, un extrait du gingembre, un extrait des clous de girofle, et un extrait de la formulation qui regroupe les trois espèces ensemble. Après extraction, l'ensemble des extraits ont été récupérés sous forme de poudre de couleur marron, avec des rendements variables. L'extrait aqueux des clous de girofle a donné le rendement le plus élevé 9,03% par rapport aux autres extraits, ce rendement est inférieur à celui de l'extrait méthanolique des clous de girofle qui a présenté un rendement de 14,99 % (**Aidaoui R., Kamouche A., Menani I., 2021**). L'extrait aqueux du citron, a présenté un rendement de 5,81%, qui est très faible par rapport à l'étude de **Tigrine Nadir, (2016)**, qui a déterminé un rendement de 18% dans l'extrait de l'écorce du citron. L'extrait aqueux du gingembre a montré un très faible rendement 1,62% qui reste inférieur à celui obtenu par **Meghezzi S. et Dali M., (2018)** dans l'extrait méthanolique du gingembre 15,46 %. L'extrait aqueux de la formulation polyherbale récupérée sous forme de poudre a donné un rendement de 4,11%.

Le dosage des composés phénoliques dans l'extrait des clous de girofle a révélé une teneur élevée en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés qui sont de l'ordre de 87,15 µg EAG/mg E ; 40,80 µg EC /mg E et 2,38 µg EC /mg E, respectivement. Ces résultats sont supérieurs aux taux déterminés par **Aidaoui R., Kamouche A., Menani I., (2021)** dans l'extrait méthanolique des clous de girofle préparés par macération et qui renferme 15,174 mg EAG /g E de polyphénols totaux, et 0,503 mg EQ /g E de flavonoïdes.

L'extrait aqueux du citron montre une teneur en polyphénols de 25,45 µg EAG/mg E et 14,05µg EC/mg E en flavonoïdes avec un taux non déterminé en tanins condensés. Ces teneurs restent inférieures par rapport au taux déterminé par **Tigrine N., (2016)**, qui a montré que l'extraits éthanolique de l'écorce du citron a un taux de polyphénols de 108 µg EAG/ g ES et un taux de flavonoïdes de 23,3 µg EQ/ g ES, tandis que l'extrait éthanolique

de pulpe de citron a présenté un taux de 67,65 $\mu\text{g EAG/ g ES}$ pour les polyphénols et un taux de flavonoïdes de 13,35 $\mu\text{g EQ/ g ES}$.

Le taux de polyphénols déterminé dans l'extrait aqueux du gingembre en polyphénols (43,07 $\mu\text{g EAG/mg E}$) et en flavonoïdes (27,95 $\mu\text{g EC /mg E}$). Ces valeurs sont inférieures aux résultats présents dans l'extrait méthanolique du gingembre avec un taux de 417,888 mg AG/g E pour les polyphénols, tandis que les flavonoïdes ont révélé un taux de 83,036 mg EQ/ g E (**Meghezzi S. et Dali M., 2018**).

En ce qui concerne l'extrait aqueux de la formulation polyherbale, la teneur en polyphénols totaux est de 33,50 $\mu\text{g EAG/mg E}$, 10,14 EC /mg E pour les flavonoïdes et 1,26 $\mu\text{g EC /mg E}$ pour les tanins condensés. Pour la formulation aucun travail scientifique n'a été réalisé sur la détermination du taux des composés phénoliques.

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée *in vitro* en utilisant la méthode de piégeage des radicaux libres le DPPH et la méthode de réduction du fer FRAP. Les résultats obtenus concernant le test du DPPH ont révélé un pouvoir anti-radicalaire prometteur des extraits testés. Nous avons déterminé une très faible valeur de IC_{50} dans l'extrait aqueux des clous de girofle 2,12 $\mu\text{g/ml}$. Cette valeur est nettement inférieure à la valeur 0,1 mg/ml déterminée dans l'extrait méthanolique des clous de girofle préparé par **Aidaoui R., Kamouche A., Menani I., (2021)**. L'extrait aqueux du gingembre a également présenté une faible valeur de IC_{50} qui est de l'ordre de **5,31 $\mu\text{g /ml}$** et qui reste inférieure à 0,22 mg/ml obtenus dans l'extrait méthanolique de rhizome du gingembre (**Meghezzi S. et Dali M., 2018**).

Tigrine N., (2016) a enregistré un faible effet antiradicalaire du citron avec des valeurs élevées de IC_{50} ; 5,72 mg/ml dans l'extrait éthanolique de l'écorce de *Citrus*, et 10,35 mg/ml pour l'extrait éthanolique de pulpe de citron. Par contre la valeur de IC_{50} déterminée pour notre extrait aqueux du fruit du citron est nettement inférieure, elle est de 5,78 $\mu\text{g/ml}$ ce qui signifie une forte activité anti-radicalaire du fruit entier du citron.

L'extrait aqueux de la formulation polyherbale, a donné le meilleur effet anti radicalaire sur le DPPH avec une valeur de IC_{50} de 2,85 $\mu\text{g/ml}$, cette valeur reste très proche de celle de l'acide ascorbique ($\text{IC}_{50}=1,51 \mu\text{g/ml}$). En fonction de nos résultats, on constate que le clou de girofle par son effet anti-radicalaire puissant sur le DPPH est responsable de

l'effet anti-radicalaire de la formulation, ce résultat est probablement expliqué par un effet dominant des clous de girofle et non pas un effet synergique des constituants de la formulation. En conclusion, l'extrait de la formulation testé pour la première fois à un activité anti radicalaire puissante par rapport aux travaux antérieurs.

En ce qui concerne le test du FRAP, les résultats de l'absorbance obtenus des extraits révèlent un pouvoir réducteur du fer proportionnel à l'augmentation de la concentration avec une EC_{50} de 15,95 $\mu\text{g/ml}$ pour le BHA. Les extraits aqueux montrent une activité remarquable dans l'extrait de clou de girofle avec une EC_{50} de 32,37 $\mu\text{g/ml}$, qui présente le meilleur effet par rapport à l'extrait aqueux du citron ($EC_{50}= 115,65\mu\text{g/ml}$), l'extrait aqueux du gingembre ($EC_{50}= 250 \mu\text{g/m}$) et l'extrait de la formulation ($EC_{50}= 522,30\mu\text{g /ml}$). Ces résultats sont supérieurs aux résultats obtenus par **Droui F. et al., (2015)** qui ont testé le pouvoir réducteur du fer des extraits des clous de girofle et du gingembre en déterminant des EC_{50} de 3,05 mg AAE/100g et 2,95 mg AAE/100g, respectivement. Tandis que l'étude de **Hamidi F. et Limam F., (2018)** a montré un très faible potentiel réducteur du fer par l'extrait de l'écorce du citron qui a enregistré une valeur de EC_{50} trop élevée **49939 mg/ml**.

Contrairement au test du DPPH, le pouvoir réducteur du fer des clous de girofle par rapport aux autres extraits n'a pas été dominant dans l'extrait de la formulation, mais il a été probablement inhibé ou masqué par les autres constituants présents dans la formulation, ou il peut être inhibé par le mécanisme réactionnel du test du FRAP.

Au cours de notre étude, nous avons choisi la méthode de diffusion sur milieu solide en utilisant la méthode des disques et la méthode des puits pour tester le pouvoir antibactérien des extraits aqueux de trois espèces végétales (*Citrus limon*, *Syzygium aromaticum* et *Zingiber officinale*) sur des souches bactériennes disponibles au niveau du laboratoire LAPSAB. La méthode des puits nous a permis d'obtenir de meilleurs résultats par rapport à la méthode des disques. Nous avons testé des bactéries Gram positif : *Bacillus cereus* ATCC 10876 (BC), *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 (EF), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ST), et des bactéries Gram négatif : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (KPM), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PS) et *Escherichia coli* ATCC 8739 (EC).

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux des clous de girofle présente une forte activité antibactérienne par rapport aux autres extraits. Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus pour les extraits de clous de girofle et de la formulation varient entre 16-27 mm et 09-17 mm, respectivement. Cependant, l'extrait aqueux de gingembre a montré aucun effet antibactérien remarquable sur les souches testées.

La majorité des souches bactériennes testées ont été sensibles à l'extrait aqueux du clou de girofle. Dans la méthode des disques, la souche extrêmement sensible est *Bacillus cereus* ATCC 10876 avec un diamètre d'inhibition de **20 mm**, ensuite les souches désignées sensibles sont *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui présentent des diamètres variables entre 11 et 12 mm. Tandis que, *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 sont les deux souches résistantes. Dans la méthode des puits, certaines souches sont sensibles à l'extrait de clous de girofle comme *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 qui ont présenté des diamètres de 19, 18 et 15 mm, respectivement. D'autres souches sont extrêmement sensibles comme *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec des diamètres de 27 et 22 mm, respectivement. *Escherichia coli* ATCC 8739 est la seule souche résistante. Selon la bibliographie, l'eugénole, le constituant majeur des clous de girofle est un puissant inhibiteur de la croissance des bactéries Gram (+) comme *Bacillus cereus* ; *Bacillus subtilis* ; *Staphylococcus aureus* et Gram (-) telles que : *Escherichia coli* ; *Salmonella typhi* et *Pseudomonas aeruginosa*. (Singh et al., 2009).

Les résultats du pouvoir antibactérien de l'extrait aqueux du citron sur les souches étudiées montrent que, pour la méthode des disques, la souche *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 est la plus sensible (11 mm) à l'extrait aqueux du citron notamment à la forte concentration 200 mg/ml. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 sont les souches les plus résistantes à cet extrait. Tandis que dans la méthode des puits, cet extrait présente un effet antibactérien sur la totalité des souches qui sont sensibles avec un diamètre maximal de 13 mm, à l'exception de *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 qui est très sensible (17 mm).

Les études de Espina et al., (2012) et Hamdan et al., (2013) ont montré que l'huile essentielle de *C. limon* présente une activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries

Gram (+) comme *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus capitis*, *Micrococcus luteus*, et sur les bactéries Gram (-) : *Pseudomonas fluorescens* et *Escherichia coli*.

L'extrait aqueux de la formulation polyherbale a montré un effet antibactérien sur l'ensemble des souches étudiées par les deux méthodes utilisées. Pour la méthode des disques, l'ensemble des souches sont sensibles à l'extrait aqueux de formulation dont *Bacillus cereus* ATCC 10876 semble la souche la plus sensible avec un diamètre de 13 mm. Tandis que dans la méthode des puits, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 8739 sont des souches très sensibles avec des diamètres de 17 et 16 mm, respectivement. Le reste, sont des souches sensibles avec des diamètres qui varient entre 10 et 13 mm.

L'extrait aqueux du gingembre fait l'exception, et n'a aucun effet antibactérien sur les souches bactériennes étudiées qui ont montré une résistance en utilisant les deux méthodes. Par contre, dans la bibliographie c'est les huiles essentielles du gingembre qui ont le pouvoir antibactérien notamment sur les souches *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas sp* (Ficker et al., 2003 ; Sabulal et al., 2003).

En conclusion, l'effet antibactérien diffère d'un extrait à autre selon la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes à ces extraits. Les résultats obtenus ont montré une résistance de l'ensemble des souches bactériennes étudiées vis-à-vis l'extrait aqueux du gingembre. Les autres extraits ont marqué la sensibilité des souches bactériennes à l'exception d'*Escherichia coli* ATCC 8739 qui est résistante à l'extrait aqueux du clou de girofle. Ce dernier a enregistré la zone d'inhibition la plus élevée 27 mm de diamètre pour la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 qui est extrêmement sensible à cet extrait, très sensible à l'extrait aqueux de la formulation (17 mm), et qui reste sensible à l'extrait aqueux du citron (13 mm).

Le potentiel antibactérien prometteur de l'extrait aqueux des clous de girofle n'a pas été dominant dans l'extrait de la formulation polyherbale, peut-être qu'il a été masqué ou freiné par les autres constituants de la formulation, ce qui a révélé des zones d'inhibition moins importantes que celles mesurées pour l'extrait aqueux des clous de girofle.

Conclusion

L'objectif général de ce travail porte à l'évaluation de l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne d'une formulation polyherbale largement utilisée en Algérie comme remède curative et préventive du COVID-19, elle est constituée du fruit du citron, des clous de girofle, et du gingembre frais. Chaque espèce a été également testée séparément.

Les extraits préparés ont montré une teneur considérable en composés phénoliques notamment en polyphénols et en flavonoïdes dans l'extrait des clous de girofle et dans la formulation. Ces composés sont probablement les molécules responsables du pouvoir anti radicalaire et réducteur du fer observé dans les clous de girofle et de la formulation par rapport à l'extrait du citron et du gingembre. De même, ces extraits ont présenté un pouvoir antibactérien prometteur *Bacillus cereus*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Cette étude préliminaire, nécessite des études antérieures approfondis qui s'intéressent à :

- ✓ Choisir d'autres tests pour l'évaluation de l'activité antioxydante comme le test de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Activity), ABTS (Sel d'ammonium de l'acides 2,2 azinobis-3- ethybenzothiazoline-6-sulfonique), CUPRAC (réduction de cuivre) et le teste de blanchissement de β -carotène ;
- ✓ Tester *in vivo* l'effet de ces plantes sur les paramètres du stress oxydatif en mesurant l'activité des enzymes antioxydantes le superoxyde dismutase et la catalase ;
- ✓ Tester l'activité antibactérienne par la méthode de dilution pour déterminer la CMI ;
- ✓ Chercher d'autres activités biologiques comme l'activité antidiabétique, anti inflammatoire, antifongique, anticancéreuse

Références bibliographiques

1. **Ababsa Nahla et Boukaous Hamamet Ellah khadidja, (2018).** Etude phytochimique et activités biologiques de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba*, diplôme de master en Biochimie de la nutrition.
2. **Achille R., (1980).** Botanique médicale, 4ème Ed. Paris: l'imprimerie de Rignoux, 321.
3. **Aidaoui R., Kamouche A., Menani I., (2021).** Evaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de quelques épices (*Cuminum cyminum, Curcuma longa et Syzygium aromaticum*). Mémoire de master en biologie moléculaire et cellulaire, Université 8 mai 1945 Guelma.
4. **Algeciras-schimmich A., Cook W. J., Milz T. C., Saenger A. K., & Karon B. S., (2007).** Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-stick samples collected for determination of neonatal bilirubin. *Clinical biochemistry*, 40, 1311 – 1316.
5. **Auzis, (2007).** Madagascar. Eds Petit ; page : 694.
6. **Badiaga M., (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia smith*, une plante médicinale africaine récoltée au mali (doctoral dissertation, université blaise pascal-clermont-ferrand ii).
7. **Balasundram N., Sundram K., & Samman S., (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
8. **Barouki Assma, Mouchahana Samia et Bouid Cherifa, (2022).** Étude de l'effet antidiabétique d'une formulation polyherbale sur le rat Wistar, Université Adrar.
9. **Bayir, (2005).** Unexpected increased mortality after implementation of a commercially sold computerized physician order entry system.
10. **Belbache H., (2003).** Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea parvifloradesf*, mémoire de magister en chimie organique, université Mentouri Constantine. p 16-20.
11. **Benariba N., Djaziri R., Bellakhdar W., Belkacem N., Kadiata M., Malaisse W. J., & Sener A., (2013).** Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(1), 35.
12. **Beretz A, Cazenave JP (1991).** Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. *Planta Med.* 57 (7) : S68 – 72.
13. **Bharadvaja N., Gautam S., & Singh H., (2023).** Natural polyphenols: a promising bioactive compounds for skin care and cosmetics. *Molecular Biology Reports*, 50(2), 1817-1828.
14. **Bors W., Michel C., Stettmaier K., (1998).** Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*. 6 : 399 – 402.

15. **Bouhadjra K., (2011)**, étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, thèse pour l'obtention du diplôme de magister, université mouloud mammeri, tizi-ouzou.
16. **Bourkhiss M. B., Hnach M., Paolini J., Costa J., Farah A., & Satrani B., (2010)**. Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des 50 Références bibliographiques différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. Bulletin de la société royale des sciences de liège.
17. **Bruneton J., (1993)**. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. La Voisier TEC et DOC, Paris. 2ème édition, pp. 268-277.
18. **Bruneton J., (1999)**. Pharmacognosie, Phytochimie : Plantes médicinales, 4ème édition, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, pp : 259-547.
19. **C. Valgas, S.M. De Souza, E.F.A. Smânia et al., (2007)**. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, Braz. J. Microbiol. 369–380.
20. **Calsamiglia S., Busquet M., Cardozop W., Castillejos L., Ferret A., (2007)**. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of dairy science. Vol. (90): 2580–2595.
21. **Carr A., FREI B., (1999)**. Does vitamin c act as a pro-oxidant under physiological conditions. The faseb journal 13, (9), 1007–1024.
22. **Cecchini T., (2003)**. Avec collaboration de Ticli B. Encyclopédie des plantes médicinales (savoir, reconnaître les plantes et les utiliser préparations médicinales spécifique dictionnaire des maladies et des remèdes). Éditions de Vecchi. p-29 centaurea AFricanai.
23. **Chaabi M., (2008)**. Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines, diplôme de doctorat en Pharmacognosie. p168, 169.
24. **Chaouche T. M., (2014)**. Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen (UABT), 35.
25. **Chira K., JH Suh, C. Saucier, PL. Teissèdre (2008)**. Le raisin possède une spécificité par les composés phénoliques antioxydants qu'il renferme (flavonoïdes et nonflavonoïdes), Phytothérapie 6: 75–82.
26. **Clinical and laboratory standards institute (clsi) (2015)**. Document m45. Methods for antimicrobial dilution And disk susceptibility of infrequently isolated or fastidious bacteria; third edition. Approved guideline. Clsi, 940 West valley road, suite 1400, wayne, pennsylvania 1087-1898, usa.

27. **Collin S. and Crouzet J., (2011).** Polyphénols et procédés. En France par EMP. S.S.A., Paris, p5.
28. **Cronquist A. (1982).** An integrated system of classification of flowering plants. *Brittonia*. 34(2): 268-270.
29. **Delattre J., Beaudoux J. L. & Bonnefont-ROUSSELOT, (2005).** Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques. Edition Lavoisier tec & doc éditions médicales internationales, Paris, p 14, 93, 94.
30. **Dewanto V., Wu X., Adom KK., Liu RH., (2002).** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(10): 3010-3014.
31. **Di Meo et Venditti, (2020).** Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants.
32. **Erlund I., (2004).** Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res*. 2004 ; 24 : 851 –74.
33. **Espirade E., (2002).** Introduction à la transformation industrielle des fruits ed tec a doc fao, 2016 :Fao stat 2016. Citrus fruit fresh and processed statistical bulletin 2016. (www.fao.org/faostat).
34. **Faivre Cl., Lejeune L., Staub H., Goetz P., (2006).** Zingiber officinale Roscoe, *Phytothérapie*, 2 : 99-102 p.
35. **Favier A., (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr . Mémoire des Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus alaternus L.* p 64: 390-396.
36. **Ficker C. E., Smith M. L., Susiarti S., Leaman D. J., Irawati C., & Arnason J. T., (2003).** Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberaceae used by the Kenyah (Indonesian Borneo). *Journal of ethnopharmacology*, 85(2-3), 289-293.
37. **Flora SJS.** Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxi Med Cel Long*. 2009 ; 2 : (4) 191 – 206.
38. **G.-J., Chavanne M., Flamand E., Jullien A.,(1986).** Protocoles d'extractions, TP Chimie organique expérimentale. Belin ; page : 02.
39. **Ghasemzadeh A., JAAFAR H.Z.E., RAHMAT A., (2010) .**Elevated Carbon Dioxide Increases Contents of Flavonoids and Phenolic Compounds, and Antioxidant Activities in Malaysian Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) Varieties, *Molecules*, 15: 7907-7922 p.

40. Ghedira K., Goetz P. and Le Jeune R., (2010). *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytothérapie*. 8, 37-43.
41. Gheffour K., Boucherit K., & Boucherit-Otmani Z., (2015). Étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Echinops spinosus*. *Phytothérapie*, 13(5), 288-294.
42. Gigon F., (2012). Le gingembre, une épice contre la nausée. *Phytothérapie*, 10(2), 87- 91.
43. Goetz P., (2014). *Citrus limon* (L.) Burm. f. (Rutacées) Citronnier, Springer-Verlag France, vol 12:116-121p.
44. Gonzalez-molina, E., Dominguez-perles R., Moreno D.A. et Garcia-viguera., (2010). Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51: 327-345.
45. Hadj Salem J., (2009). Extraction, Identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de Doctorat : Université de LORRAINE.
46. Haioun A., Hamoudi F. Z., (2015). Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne *Anethium graveolens* et leur effet cardioprotectrice contre la toxicité, Diplôme de Master en Toxicologie et Santé. p 16.
47. Haksar A., Sharma A., Chawla R., Kumar R., Arora R., Singh S., Prasad J., Gupta M., Tripathi R.P., Arora M.P., Islam F., Sharma R.K., (2006). *Zingiber officinale* exhibits behavioral radioprotection against radiation- induced CTA in a gender-specific manner. *Pharmacol Biochem Behav*; 84(2) : 179-88.
48. Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C. & CHAPELLE J. P., (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62, 628 –638.
49. Halliwell B., J. M. C. Gutteridge, (2008). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition. Oxford University Press. Citer dans la Thèse de Doctorat (2015): Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète : *Revue bibliographique*, 44-61 p.
50. Halmi S., (2015). Etude botanique et phytochimique approche biologique et pharmacologique d'*Opuntia ficus*, diplôme de doctorat, biotechnologie végétale, p17.
51. Hamdan D., Ashour M.L., Mulyaningsih S., El-Shazly A., Wink M., (2013). Chemical Composition of the essential oils of variegated pink-fleshed lemon (*Citrus limon*, Burm. F.) and their anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Zeitschrift für Naturforsch.-sect. C j. Biosci.* , 68c, 275–284.

52. **Hamidi F. et Limam F., (2018).** Etude phytochimique et pouvoir antioxydant de l'écorce d'orange et citron université abdelhamid ibn badis-mostaganem faculté des sciences de la nature et de la vie.
53. **Heller W., Forkmann G., (1993).** The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 399-425.
54. **Hopkins W. G., (2003).** Physiologie végétale. De Boeck Supérieur, p 280. Inactivation of Escherichia coli O157: H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. Int. J. Food Microbiol. , 159, 9–16.
55. **Ippoushi K., Azuma K., Ito H., Horie H., & Higashio H., (2003).** [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774. 1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. Life sciences, 73(26), 3427- 3437.
56. **Iserin P., Masoon M., Restellini J.-P., Ybert E., De Laage de Meux, A., Françoise M., Zha E., De La Roque R., De La Roque O., Vican P., DelesalleFéat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloch J., & Botrel A., (2001).** Larousse des plantes médicinales : Identification, préparation, soins (2e éd.). Hong Kong.
57. **Jacob L., (2007).** L'insuffisance rénale aiguë. Edition Springer, p 88.
58. **Jarrige R. & Ruckebusch Y., (1995).** Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion. Editions Quae, p 60.
59. **Jean B., (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier 40.
60. **Kambouche N., Merah B., Bellahouel S., Bouayed J., Dicko A., Derdour A., Younos C., Soulimani R., (2008).** Chemical composition and antioxidant potential of rutamontanal. Essential oil from algeria. Journal of medicinal food, 11(3) : 593-595.
61. **Karagozler A., Erdag B., Calmaz- Emek Y., (2008).** Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, Food Chemistry, (111): 400-407.
62. **Leinmüller E., Steingass H. and Menke K.H., (1991).** Tannins in Ruminant feed stuff.
63. **Luthar, Z. (1992)** Polyphenol Classification and Tannin Content of Buckwheat Seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Fagopyrum*, 12, 36-42.
64. **Mansour A., (2009).** Investigation photochimique de l'extrait n- butanol de l'espèce.
65. **Meghezzi S. et Dali M., (2018).** Etude in vitro de l'activité antioxydante de *gingembre* «*zingiber officinale* » université des frères mentouri constantine faculté des sciences de la nature et de la vie.
66. **Mueller-harvey I., (2001).** Analysis of hydrolysable tannins. Anim. Feed Sci. Technol.

-
67. **Nicholls P., (2012).** Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 95–101.
68. **Oboh A., Ade M., Osun O., (2012).** Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus plants: 729–736.
69. **P. Goetz, (2014).** *Citrus limon (L.)* Burm. F. (Rutacées) Citronnier, Springer-Verlag France, vol 12:116-121p.
70. **Padrini P. Lucheroni M.T., (1996).** Le grand livre des huiles essentielles –guide pratique pour retrouver vitalité, bien être et beauté les essences. Ed : DE Vecchi, Paris.
71. **Pandey K.B. et Rizvi S.I., (2009).** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2 (5) : 270 –278.
72. **Parhiz H., Roohbakhsh A., Soltani F., Rezaee R., & Iranshahi M., (2015).** Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy Research*, 29(3), 323-331.
73. **Parhiz H., Roohbakhsh A., Soltani F., Rezaee R., & Iranshahi M., (2015).** Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and Hesperetin: An updated review of their molecular mechanisms and experimental Models. *Phytotherapy research*, 29(3), 323-331.
74. **Pénicaud C., (2009).** Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation. Thèse de Doctorat : Université de MONTPELLIER II.
75. **Péry A. & Garric J., (2017).** Les effets écotoxicologiques : De la molécule à la population. Grande Bretagne, UK : ISTE.
76. **Popovici C., Saykova I. et Tylkowski B., (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques. Roginsky V. et Lissi E.A., (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92: 235-254. oulique par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*. 4: 25-39.
77. **Rahmani Z., (2020).** Contribution à l'étude phytochimique, électrochimique et biologique des extraits de *Cupressus sempervirens* (L). (Doctoral dissertation, Université Kasdi Merbah-Ouargla).
78. **Ravan, Evert, Eichhorn, (2014).** Biologie végétale. 2^{ème} édition. P-27, 28, 30.
79. **Roginsky V., Lissi E.A., (2005).** Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem*, 92, 235-254.

-
80. **S.H. Lee, K.S. Chang, M.S. Su, Y.S. Huang, H.D. Jang, (2007).** Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food Cont.*, 18, 1547–1554.
 81. **Sabulal B., Dan M., Kurup R., Pradeep N. S., Valsamma R. K., & George V., (2006).** Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry*, 67(22), 2469- 2473.
 82. **Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F., (2009).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and agriculture*, 76, 270-276.
 83. **Sanogo Idrissa et Sissoko Amara, (2020).** Contribution à l'étude phytochimique et l'activité antioxydante des extraits de *Moringa oleifera* de la région de Bamako au Mali. Université de Tlemcen.
 84. **Sarma C. J., (2011).** Naturally occurring polyphenols and their utility. *Chemistry of phenolic compounds: state of the art*, 19-30.
 85. **Sies H., (1993).** Strategies of antioxidant defence. *Eur. J. Biochem.* 1993 ; 215 : 213 –219.
 86. **Silva E. A. P., Carvalho J. S., Guimarães A. G., Barreto R. D. S., Santos M. R., Barreto A. S. & Quintans-Júnior L. J., (2019).** The use of terpenes and derivatives as a new perspective for cardiovascular disease treatment: A patent review (2008–2018). *Expert opinion on therapeutic patents*, 29(1), 43-53.
 87. **Singh N. A., Kumar P., & Kumar N., (2021).** Spices and herbs: Potential antiviral preventives and immunity boosters during COVID-19. *Phytotherapy Research*, 35(5), 2745-2757.
 88. **Singh P.K., Kaur I.P., (2012).** Synbiotic (probiotic and ginger extract) loaded floating beads: a novel therapeutic option in an experimental paradigm of gastric ulcer. *J Pharm Pharmacol*; 64(2): 207-17.
 89. **Sophie B., (2015).** Le Giroflier: Historique, Description et Utilisations de la plante et de son Huile essentielle. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie. Université de Lorraine. P-22, 24. Max W et Robert A. (2003). *Plantes thérapeutiques* p-119, 120.
 90. **Souci S.W., Fachmann W. & Kraut H., (2008).** La composition des aliments. Tableaux des valeurs nutritives, 7e édition, Med Pharm Scientific Publishers. Taylor & Francis.
 91. **Sun B., Richardo-da-Silvia J.M., Spranger I., (1998).** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(10): 4267-4274.

-
92. **Tigrine N., (2016).** Activité antioxydante des extraits d'écorce et de pulpe de *Citrus limon* et *Citrus sinensis* Université Abderrahmane Mira de Bejaïa Faculté des Science de la Nature et de la Vie Département de biologie physico-chimique.
93. **Tsao R., (2010).** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
94. **URQUIAGA I. N. E. S. and LEIGHTON F. E. D. E., (2000).** Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.*; 33: 55-64.
95. **Valko M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur, (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1): 1-40 p.
96. **Vermerris W. and Nicholson R., (2006).** Phenolic Compounds and Their Effects on Human Health. In: *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer, Dordrecht, 235-255.
97. **Wichtl M. and Anton R., (2009).** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition Lavoisier, Paris : p 38, 41.
98. **Xavier S.M., Barbosa C.O., Barros D.O., Silva R.F., Oliveira A.A., Freitas R.M., (2019).** Vitamin C antioxydante_ects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. *Neurosci. Lett.* , 420, 76–79.
99. **Zahir et al., (2020).**
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960077920303258>.
100. **Zerrouk Salim, (2017).** Support des travaux pratiques de Biologie végétale; les plantes à fleurs.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مضادات الأكسدة في المختبر ، باستخدام اختبار الجذر الحر DPPH و اختبار ارجاع الحديد FRAP ، فضلا عن تقييم النشاط المضاد للبكتيريا الذي تم اختياره من خلال طريقة الانتشار على الوسط الصلب باستخدام طريقة الأقراص والآبار الخاصة بالمستخلصات المائية لثمرة الليمون والقرنفل والزنجبيل الطازج الى جانب المستخلص المائي للتركيبات متعددة الأعشاب المتكونة من نفس النباتات السابقة الذكر ، المعدة تحت الارتجاع لمدة 30 دقيقة. تحديد مستوى المركبات الفينولية في المستخلصات المائية للنباتات المعدة بشكل منفصل و في التركيبة متعددة الأعشاب بين مستويات معتدلة من البوليفينول (87,15 ميكروغرام مكافئ حمض غاليك /مليغرام من المستخلص) والفلافونويد (40,80 ميكروغرام مكافئ حمض كاتشين /مليغرام من المستخلص) والتانين المكثف (2,38 ميكروغرام مكافئ حمض كاتشين /مليغرام من المستخلص) في المستخلص المائي من القرنفل. هذا هو أعلى معدل مقارنة مع المستخلصات الأخرى. أظهرت جميع المستخلصات نشاطا مضادا للأكسدة على الجذر الحر DPPH ، وخاصة مستخلص القرنفل ، التي تحتوي على $IC_{50} = 2,12$ ميكروغرام/ملييلتر تليها مستخلص الصيغة $IC_{50} = 2,85$ ميكروغرام/ملييلتر ثم المستخلص المائي للزنجبيل والليمون مع 50IC من 5,31 ميكروغرام/ملييلتر و 5,78 ميكروغرام/ملييلتر ، على التوالي. في اختبار ارجاع الحديد ، يحتوي المستخلص المائي للقرنفل على أفضل قيمة $EC_{50} = 32,37$ ميكروغرام/ملييلتر مقارنة بالمقتطفات الأخرى ، في حين أن تأثير التركيبة كان منخفضا للغاية.

في النشاط المضاد للبكتيريا ، فإن المستخلص المائي من القرنفل له دائما أفضل تأثير متبوعا باستخراج التركيبة المتعددة الأعشاب على *Bacillus cereus* ، *Enterococcus faecalis* ، *Staphylococcus aureus* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، في حين أن المستخلص المائي من الزنجبيل ليس له تأثير مضاد للبكتيريا ملحوظ.

في ضوء النتائج ، وجدنا أن القرنفل له تأثير مضاد للجذر الحر ، وله القدرة على ارجاع الحديد ومضاد للجراثيم ولديه القدرة على السيطرة على هذا التأثير عندما يتم خلطه مع الزنجبيل وفاكهة الليمون خاصة في اختبار DPPH والنشاط المضاد للبكتيريا. بينما في اختبار FRAP يتم تثبيط تأثير القرنفل ، لأن مستخلص التركيبة ليس له تأثير مثير للاهتمام على ارجاع الحديد.

الكلمات المفتاحية: الليمون، القرنفل، الزنجبيل، صياغة متعددة الأعشاب، البوليفينول مضادات الأكسدة، مضاد حيوي

Abstract

The aim of this study was to evaluate antioxidant activity in vitro, using the using the DPPH and FRAP assays, as well as the evaluation of antibacterial activity tested by solid-state diffusion using the disc and well method of a polyherbal formulation consisting of lemon fruit, cloves and fresh ginger, prepared ginger, and of each plant prepared separately, prepared as a decoction under reflux for 30 min.

Determination of phenolic compound levels in the aqueous extract of the polyherbal formulation and in the extract of each plant species prepared separately revealed moderate levels of polyphenols (87,15 µg EGA/mg E), flavonoids (40,80 µg EC/mg E) and condensed tannins (2,38 µg EC/mg E) in the aqueous extract of cloves. This is the highest of the other extracts.

All the extracts showed strong antiradical activity on DPPH, particularly the clove extract. In particular clove extract, which recorded an $IC_{50} = 2,12$ µg/ml, followed by the formulation extract formulation extract (IC_{50} of 2,85 µg/ml), followed by aqueous ginger and lemon extracts with IC_{50} values of 5,31 µg/ml and 5,78 µg/ml, respectively. With regard to the iron-reducing capacity, the aqueous extract of nail presented the best EC_{50} value of 32,37 µg/ml, compared with the other extracts, while the effect of the formulation was very slight.

In terms of antibacterial activity, the aqueous clove extract still had the best effect, followed by the polyherbal formulation extract on *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, while the aqueous ginger extract has no remarkable antibacterial antibacterial effect.

In the light of the results, we found that cloves, which have an antiradical anti-free radical, iron-reducing and antibacterial effect, has the ability to dominate this effect effect when mixed with ginger and lemon fruit, particularly in the DPPH test. DPPH and antibacterial activity. Whereas in the FRAP test, the effect of cloves is inhibited is inhibited, as the formulation extract shows no interesting effect on iron reduction. reduction.

Key words: Lemon, cloves, ginger, polyherbal formulation, polyphenol antioxidant, antibacterial

Résumé

L'objectif de cette étude porte à l'évaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante, en utilisant le test du DPPH et du FRAP, ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne testée par la méthode de diffusion sur milieu solide en utilisant la méthode des disques et de puits de la formulation polyherbale constituée du fruit de citron, des clous de girofle et du gingembre frais ainsi des extraits aqueux de chaque espèce végétale préparé séparément par décoction sous reflux pendant 30 min.

La détermination du taux des composés phénolique dans l'extrait aqueux de la formulation polyherbale et dans l'extrait de chaque espèce végétale préparé séparément a révélé un taux modéré en polyphénols (87,15 µg EAG/mg E), en flavonoïdes (40,80 µg EC/mg E) et en tanins condensés (2,38 µg EC/mg E) dans l'extrait aqueux des clous de girofle. Ce taux est le plus élevé par rapport aux autres extraits.

L'ensemble des extraits ont révélé une forte activité anti-radicalaire sur le DPPH en particulier l'extrait aqueux des clous de girofle qui a enregistré une $IC_{50} = 2,12$ µg /ml, suivie par l'extrait aqueux de la formulation (IC_{50} de 2,85 µg/ml) puis l'extrait aqueux de gingembre et de citron avec des valeurs de IC_{50} de 5,31 µg/ml et 5,78 µg/ml, respectivement. En ce qui concerne le test du pouvoir réducteur du fer, l'extrait aqueux des clous de girofle présente la meilleure valeur de EC_{50} (32,37 µg /ml) par rapport aux autres extraits, alors que l'effet de la formulation était très faible.

Dans l'activité antibactérienne, l'extrait aqueux des clous de girofle présente toujours le meilleur effet , suivie par l'extrait de la formulation polyherbale sur *Bacillus cereus*, *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa*, tandis que l'extrait aqueux du gingembre n'a aucun effet antibactérien remarquable.

A la lumière de ces résultats, nous avons constaté que les clous de girofle qui présente un effet anti-radicalaire, réducteur du fer et antibactérien prometteur a la capacité de dominer ces effets quand il est mélangé avec le gingembre et le fruit de citron en particulier dans le test de DPPH et l'activité antibactérienne. Tandis que dans le test du FRAP, l'effet des clous de girofle est inhiber, car l'extrait de la formulation polyherbale ne présente aucun effet intéressant sur la réduction du fer.

Mots clés : Citron, clous de girofle, gingembre, formulation polyherbale, polyphénols, antioxydant, antibactérien.