

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ ABOUBAKR BELKAÏD TLEMCEEN
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Département d'Agronomie
Laboratoire des Produits Naturels «LAPRONA»

Mémoire en vue de l'obtention du

Diplôme de Master

en Sciences Alimentaires

Spécialité : Nutrition et Diététique

Thème :

Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne
des feuilles d'Echium horridum Batt.

Présenté par :

CHIKH Ahlem

BENNAT Fatima

Soutenu le 25/06/2024, devant le jury composé de :

Mme SOUALEM-MAMI Zoubida	MCA	Université de Tlemcen	Présidente
Mme BENAMAR-DIB Hanane	MCA	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mme BEKKARA –SELADJI Meryem	MCA	Université de Tlemcen	Encadrante

Année universitaire : 2023/2024

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier le Créateur de l'univers, qui nous a doté d'intelligence, et nous a maintenu en santé pour mener à bien cette année d'étude.

*Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadrante " **Mme SELADJI-BEKKARA Meryem**", de nous avoir proposé le sujet de notre mémoire, et pour ses conseils et ses précieuses orientations, pour nous avoir accordée sa confiance, ainsi que le temps qu'elle nous a consacré tout au long de notre travail*

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury:

***Mme SOUALEM-MAMI Zoubida** de nous avoir fait l'honneur de presider le jury de notre mémoire, de juger ce modeste travail et d'assister à la soutenance.*

***Mme DIB-BENAMAR Hanane** qui nous a fait le grand honneur en examinant ce mémoire.*

*Nous tenons aussi à remercier toute l'équipe du Laboratoire des Produits Naturels: « LAPRONA ». Sans oublier l'ingénieure du laboratoire **Mme AMICHE Fatima**, à qui nous adressons un grand merci.*

On profite de cette occasion pour remercier tous nos enseignants de la faculté SNV-STU de l'Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen, ainsi que les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à nos parents, nos sœurs et nos frères, pour leurs contributions et leurs soutiens inconditionnels.

Dédicace :

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers tous ceux qui ont apporté leur contribution à mon succès, que ce soit de près ou de loin :

À la lumière de mes yeux, à l'ombre de mes pas et au bonheur de ma vie, ma mère qui m'a soutenu tout au long de mes années d'études, pour tous les sacrifices qu'elle m'a faits, pour toute la confiance qu'elle m'accorde et tout l'amour dont elle m'entoure.

À mon très cher père, qui m'a enseigné le principe de la persévérance tout au long de mes études, qui est pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de douceur et l'exemple du dévouement qui n'a cessé de me donner des encouragements.

A ma grand-mère et mes chères tantes : Que dieu les gardes et les protèges.

*Mes chères sœurs : **wafaa , fatima , zohra , amina** Merci de m'avoir toujours soutenu et merci pour tous les bons moments passé ensemble. Je vous aime, Qu'Allah vous protège et vous exhausse tous Vos vœux.*

Ahlem

Dédicace :

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie de modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer :
mon amour sincère.*

*A l'homme, mon précieux offre du Bon Dieu Allah, qui doit ma vie, ma réussite
et tout mon respect : mon cher papa Mohammed.*

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir; qui n'a jamais dit non à mes
exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon
adorable maman Wahiba.*

*A mes adorables frères AbdelKader , Ilyes et ma sœur Kaouther qui n'ont pas
cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout le long des mes études. Que
Dieu Allah les protège et leurs offre la santé et le bonheur.*

*A mon compagnon mon fiancé Rabah qui ma toujours encouragé. Merci pour
tout ce que vous m'avez donné, que Dieu vous protège et vous accorde une
bonne santé.*

*A mes meilleures amies que je trouve toujours à mes côtés surtout dan les
périodes les plus difficiles (Salima, Riham) Je vous aime tellement.*

*Sans oublier mon binôme Ahlem, pour son soutien moral, sa patience et sa
compréhension tout le long de ce projet.*

Fatima

Résumé

Les plantes sont utilisées depuis l'antiquité par l'homme pour traiter diverses maladies. Dans le cadre de la découverte de nouvelles molécules actives à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à la plant *Echium horridum* Batt. , qui appartient à la famille des Boraginacées. Cette espèce végétale présente des caractéristiques biologiques grâce à sa concentration en métabolites secondaires.

Dans un premier temps, nous avons procédé à la préparation de l'extrait aqueux à chaud , puis le dosage des différentes familles des métabolites secondaires prédominants (phénols totaux , flavonoïdes et tanins). Par la suite nous avons testé le pouvoir antioxydant, antimicrobien par la méthode de diffusion sur disque et hémolytique .

Les résultats obtenus ont montré que les feuilles de la plante sont riche en eau. Les dosages des composées phénoliques ont été réalisés sur l'extrait aqueux des feuilles qui s'est révélé riche en polyphénols. L'évaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant par le test de piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait aqueux des feuilles d'*E. horridum* Batt. possède une capacité modérée à piéger les radicaux libres avec IC50 de 1,66 mg/ml. L'évaluation de la capacité à réduire le fer a montré que l'extrait aqueux des feuilles d'*E. horridum* possède un pouvoir réducteur (EC50 = 0,464 mg/ml).

Concernant le test d'hémolyse les résultat montrent que les concentrations de cytotoxicité sont dépendantes des concentrations de l'extrait . Pour l'activité antimicrobienne L'extrait aqueux des feuille d'*E. horridum* a été testé sur six souches bactériennes ainsi qu'une levure selon la méthode de diffusion sur disque. Les résultats varient, avec des diamètres d'inhibition allant de 7 à 15 mm. Puis par méthode de micro- dilution sur milieu liquide afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices CMI, Les résultats ont montré que l'extrait aqueux est plus actif contre les bactéries (*Bacillus subtilis*)et (*Staphylococcus aureus*).

À travers ces résultats on conclue qu'*Echium horridum* Batt. a un bon potentiel antioxydant et antimibactérien et peut être une alternative aux médicaments de synthèse.

Mot clés: *Echium horridum* Batt. , composées phénoliques, Activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité anti-hémolytique, métabolites secondaires.

Abstract

Plants have been used since antiquity by humans to treat various diseases. In the context of discovering new active molecules from natural sources, this research focused on the plant *Echium horridum* Batt, belonging to the Boraginaceae family. This plant species exhibits biological characteristics due to its concentration of secondary metabolites.

Initially, we prepared a hot water extract and determined the levels of major secondary metabolite groups (total phenols, flavonoids, and tannins). Subsequently, we assessed antioxidant power, antimicrobial activity using disc diffusion method, and anti-hemolytic activity.

The results showed that the plant leaves are rich in water. Phenolic compound assays were performed on the aqueous leaf extract, revealing richness in polyphenols. In vitro evaluation of antioxidant capacity using the DPPH radical scavenging test demonstrated that the aqueous extract of *E. horridum* Batt. leaves has a strong ability to trap free radicals with an IC₅₀ of 1.66 mg/ml. Evaluation of iron reducing power showed that the aqueous extract of *E. horridum* Batt leaves possesses reducing power (EC₅₀ = 0.464 mg/ml).

Regarding the hemolysis test, the results indicated that cytotoxic concentrations depend on the extract concentration.

For antimicrobial activity, the aqueous leaf extract was tested against six bacterial strains and one yeast using the disc diffusion method. Results varied, with inhibition zone diameters ranging from 7 to 15 mm. Additionally, the minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using micro-dilution method in liquid medium, showing higher activity of the aqueous extract against bacteria (*Bacillus subtilis*) and (*Staphylococcus aureus*).

Based on these findings, it is concluded that *Echium horridum* Batt. has good antioxidant and antibacterial potential and could serve as an alternative to synthetic medicines

Keywords: *Echium horridum* Batt, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity, anti-hemolytic activity, secondary metabolites

المخلص

النباتات تُستخدم منذ العصور القديمة من قبل الإنسان لعلاج مختلف الأمراض. في إطار اكتشاف جزيئات نشطة جديدة من ، الذي ينتمي إلى عائلة السلفيات. هذا *Echium horridum Batt.* المصادر الطبيعية، كنا مهتمين في هذا العمل بنبات النوع النباتي يتميز بخصائص بيولوجية بفضل تركيزه في الأيضيات الثانوية

في المرحلة الأولى، قمنا بتحضير مستخلص مائي ساخن، ومن ثم قمنا بتقدير محتويات مختلف أسر الأيضيات الثانوية السائدة (الفينولات الكلية، الفلافونويدات، والتانينات). بعد ذلك، قمنا بتقييم القدرة المضادة للأكسدة، والمضادة للميكروبات باستخدام طريقة انتشار القرص، والمضادة للهيموليز

أظهرت النتائج المحصلة أن أوراق النبات غنية بالماء. تم إجراء تقديرات للمركبات الفينولية على المستخلص المائي للأوراق، والذي أظهر غناه بالبوليفينولات. أظهر التقييم الفيترو للقدرة المضادة للأكسدة باستخدام اختبار استقرار الراديكال قدره $IC_{50} = 1.66$ أن المستخلص المائي لأوراق إشيوم هوريوم لديه القدرة على التقاط الراديكالات الحرة بـ DPPH $EC_{50} = 0.464$ مل/م. كما أظهر التقييم لقدرة تخفيض الحديد أن المستخلص المائي لأوراق إشيوم هوريوم لديه قدرة تخفضية (مل/م = 0.464).

بالنسبة لاختبار الهيموليز، أظهرت النتائج أن تراكيز السمية الخلوية تعتمد على تركيز المستخلص

لنشاط المضاد للميكروبات، تم اختبار المستخلص المائي للأوراق على ستة سلالات بكتيرية وخميرة وفقاً لطريقة انتشار القرص. أظهرت النتائج تبايناً، حيث كانت أقطار التثبيط تتراوح بين 7 و 15 ملم. ثم تم تقييم التخفيف عن طريق التخفيف ، أظهرت النتائج أن المستخلص المائي أكثر نشاطاً ضد البكتيريا MIC الدقيق في وسط سائل لتحديد التراكيز المثبطة الدنيا (*Staphylococcus aureus*) (باسيلوس سوبتيليس)

استناداً إلى هذه النتائج، نستنتج أن إشيوم هوريوم لديه القدرة الجيدة على مكافحة الأكسدة والمضادة للبكتيريا، ويمكن أن يكون بديلاً للأدوية المصنعة بشكل اصطناعي

، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد *Echium horridum Batt.* الكلمات الأساسية للميكروبات، النشاط المضاد للهيموليز، الأيضيات الثانوية

Tables des matières

Remerciement

Dédicace

Table des matières	I
Liste des abréviations.....	IV
Liste des figures	V
Liste des photos	VI
Liste des tableaux	VII
Introduction générale	01

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : plantes médicinales et activités biologiques.

1. Définition des plantes médicinales	05
2. Historique des plantes médicinales en Algérie.....	05
3. Les activités biologiques des extraits.....	06
3.1. L'activité antioxydante	06
3.2. L'activité antimicrobienne.....	06
3.3. L'activité anti inflammatoire.....	07
4. Généralités sur les boraginacées	07
5. Présentation de la plante étudiée : <i>Echium horridum</i> Batt.	07
6.Travaux antérieurs	10

Chapitre 2: Les métabolites secondaires

1. Définition et fonction des métabolites secondaires	11
2. Les composés phénoliques	11
2. 1 Les polyphénols	11
2.2 Les flavonoïdes	12
2.3 Les tanins	13

2.4 Les coumarines	13
2. 5 les saponines	14

Partie2:Partie expérimentale

Matériel et méthodes	16
Matériel végétal	16
1. Origine et préparation du matériel végétal	16
2. Détermination de la teneur en eau	17
3. Protocole d'extraction	18
4. Dosage des composés phénoliques	20
4.1. dosage des poly phénols	20
4.2. dosage des flavonoïdes	21
4.3. dosage des Tanins	21
5. Evaluation de l'activité antioxydante	22
5.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)...	22
5.2. Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxydant power).....	24
6 . Evaluation de l'activité antimicrobienne	25
6.1 Méthode de diffusion sur disque	26
6.2 . Concentration minimale inhibitrice CMI	31
7. Test d'hémolyse	31

Partie 3 : Résultats et discussion :

1. Détermination de la teneur en eau.....	34
2. Dosages des composés phénoliques	34
2.1. Dosage des poly phénols	35
2.2. Dosage des flavonoïdes	35
2.3. Dosage des Tanins	36
3.1. Evaluation de l'activité antioxydante	37
3.1.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)...	38
3.1.2 Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxydant power).....	39

3.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne	41
3.2.1.Méthode de diffusion sur disque	41
3.2.2. Concentration minimale inhibitrice CMI.....	44
4. Test d'hémolyse	45
<i>Conclusion</i>	48
<i>Références Bibliographiques</i>	49

Liste des abréviations

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium.

BHT : Butylhydroxytoluène

CMI: Concentrations minimales inhibitrices

DO: Densité optique

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl

FeCl₃ : Chlorure de fer.

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power Assay

HCL: Acide Chlorhydrique

IC₅₀ : concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH.

K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium.

MH : Mueller Hinton

Mg EAG/g : milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme

Mg EC/g .m .s : milligrammes d'équivalent de catéchine par gramme de matière sèche

MgCl₂ : chlorure de magnésium

Liste des figures

Figure 1 : Situation géographique de la plante <i>Echium horridum</i> Batt	10
Figure 2 : Structures chimiques des polyphénols.....	12
Figure 3 :Squelette moléculaire de base des flavonoïdes	12
Figure 4 : Squelette moléculaire de base des tanins condensés	13
Figure 5 : Structure de base des coumarines	14
Figure 6 : structure de base des saponines	14
Figure 7 : structure de la paroi bactérienne	26
Figure 8 : Détermination de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion des disques.....	30
Figure 9 : La teneur en eau des feuilles d' <i>Echium horridum</i> Batt	34
Figure 10 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.....	35
Figure 11 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes	36
Figure 12 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés.....	36
Figure 13 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de l'extrait aqueux des feuilles de la plante <i>Echium horridum</i> Batt.....	38
Figure 14 : Pouvoir réducteur du fer des extraits des feuilles de l'extrait aqueux de la plante <i>Echium horridum</i> Batt.....	40
Figure 16 : Teste de cytotoxicité de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Echium horridum</i> Batt.....	46

Liste des photos

Photo1 : L'aspect général d' <i>Echium horridum</i> Batt.....	09
Photo 2 : Les feuilles d' <i>Echium horridum</i> Batt.....	16
Photo 3 :Dessiccateur	18
Photo 4 :Extraction à chaud (reflux) et filtration de l'extrait.....	19
Photo 5 : Evaporation de l'extrait.....	19
Photo 6 : Dosage des poly-phenols et flavonoïdes.....	22
Photo 7 : mélange d'extrait, méthanol et solution de DPPH.....	24
Photo 8 : test de FRAP d'extrait d' <i>Echium horridum</i> Batt.....	25
Photo 9 : préparation des milieux.....	28
Photo 10 : l'activité antimicrobienne.....	29
Photo 11 : Méthode de micro-dilution (CMI).....	31
Photo 12 :Suspension érythrocytaire	32
Photo 13 : Résultats des CMI sur microplaque de l'extrait aqueux vis-à-vis des souches testées.....	44

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description des parties de la plante <i>Echium horridum</i> Batt.....	8
Tableau 2 : Classification taxonomique d' <i>Echium horridum</i> Batt.....	9
Tableau 3 : Les milieux de culture utilisés dans l'activité antimicrobienne	27
Tableau 4 : Les différentes souches microbiennes testées.....	28
Tableau 5 :Contenus en composés phénoliques d'extrait aqueux des feuilles de la plante.....	37
Tableau 6 : les valeurs d'IC50 pour les extraits aqueux des feuilles d' <i>Echium horridum</i> Batt. et <i>Echium vulgare</i>	39
Tableau 7 : la capacité à réduire le fer pour les extraits aqueux des feuilles de l' <i>Echium horridum</i> Batt et <i>Echium vulgare</i>	40
Tableau 8 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des d'extrait aqueux des feuilles d' <i>Echium horridum</i> Batt.vis-à-vis des bactéries à Gram positif et négatif et des champignons.....	42
Tableau 9 : Effet de l'extrait sur la croissance des différentes souches testées (Tlemcen, 2024).....	43
Tableau 10 : Valeur de la concentration minimal inhibitrice (CMI) de l'extrait aqueux	45

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

Depuis toujours, les plantes ont été présentes dans la vie quotidienne de l'homme. Au fil des âges, l'homme a pu faire appel à la nature pour répondre à ses besoins essentiels tels que la nourriture, les abris et les vêtements (**Gurib-Fakim, 2006**).

Le monde des végétaux regorge de ressources et de vertus, offrant ainsi à l'homme non seulement sa nourriture, mais également des substances actives qui ont souvent un effet bénéfique sur son organisme, parfois touché par des troubles insidieux (**Baba –Aissa ,2000**). Le recours aux propriétés thérapeutiques exceptionnelles des plantes pour le traitement de toutes les affections humaines est très ancien et évolue au fil de l'histoire de l'humanité (**Gurib-Fakim, 2006**).

Les plantes médicinales demeurent le principal lieu de stockage de nouveaux médicaments, car elles sont perçues comme une source de matière première cruciale pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la création de futurs médicaments (**Maurice, 1997**).

Cette substance végétale renferme de nombreuses molécules qui présentent de nombreux avantages dans le domaine de l'alimentation, de la cosmétologie et de la pharmacie. Les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes font partie de ces composés (**Bahorun et al., 1996**).

Au cours des dernières années, la recherche de nouveaux antimicrobiens a suscité un vif intérêt en raison d'une augmentation inquiétante du nombre d'infections par les microorganismes résistants aux antibiotiques.

Le criblage systématique des micro-organismes ou des plantes, qui sont des sources de nombreux agents thérapeutiques, est une méthode fréquente pour la recherche de substances biologiquement actives. (**Sagdic et al.,2002**).

L'analyse des caractéristiques phytopharmaceutiques, antioxydantes et antimicrobiennes reste une tâche extrêmement captivante et bénéfique, surtout pour les plantes utilisées de manière rare ou moins fréquente ou non connues dans la médecine traditionnelle. Ces plantes constituent une source inédite de substances actives (**Teixeira da Silva ,2004**).

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les activités biologiques d'une plante médicinale appartenant à la famille des Borragynacées : *Echium Horridum*Batt.. . Ainsi, nous avons établi les objectifs suivants :

Introduction générale

- Évaluer le dosage des métabolites secondaires : les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins de l'extrait aqueux *d'Echium horridum* Batt .
- Tester les propriétés biologiques *d'Echium horridum* Batt. par l'évaluation des activités antioxydante , antimicrobienne ainsi que l'évaluation de la cytotoxicité.

PARTIE 1 : SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : plantes médicinales et activités biologiques

1. Définition des plantes médicinales :

Les plantes médicinales, par leur composition chimique synergique, offrent des propriétés thérapeutiques sans effets nocifs à doses recommandées. Elles sont identifiées scientifiquement selon un système binominal précis, et l'approche scientifique appliquée à leur étude permet de comprendre leur composition, d'évaluer leurs effets thérapeutiques et de déterminer leurs doses appropriées. Contrairement aux médicaments chimiques qui ciblent spécifiquement des récepteurs avec des molécules synthétiques, l'action curative des plantes médicinales résulte de l'interaction complexe de leurs éléments constitutifs, ce qui rend la phytothérapie dépendante de leur composition. Ces plantes offrent à la fois des effets curatifs et préventifs (**Simon, 2001**), grâce à la présence de métabolites primaires et spécialisés produits lors de la photosynthèse, qui possèdent des vertus thérapeutiques (**Bruneton, 1999**).

2. Historique des plantes médicinales en Algérie :

Les plantes médicinales sont utilisées depuis plus d'un millier d'années. Les premières mentions des plantes médicinales en Algérie et au Maghreb remontent au 9^e siècle, lorsque Ishâ-Ben-Amran a laissé de nombreux traités sur la médecine et les drogues usuelles (**Baba, Aissa, 2000**).

La diversité biologique de l'Algérie, située dans le bassin méditerranéen, est très importante en raison de son paysage contrasté (**Yahi et al., 2012**). La zone tellienne qui couvre plus de 4 % de la superficie du territoire national regroupe à elle seule deux tiers de la faune et de la flore algériennes. Le Tell littoral est perçu comme une zone d'intérêt majeur en raison de sa richesse biologique et de son endémisme élevé (**Quezel, 1964 ; Véla et Benhouhou, 2007**).

Sous le colonialisme français de 1830 à 1962, un grand nombre d'espèces médicinales ont été recensées par des botanistes dans un ouvrage publié en 1942 par Fourment et Roques. Les 200 espèces décrites et étudiées ont été mentionnées, la majorité d'entre elles se trouvant dans le Nord de l'Algérie et seulement 6 espèces au Sahara.

De nos jours, en Algérie, la phytothérapie est largement utilisée pour soigner diverses affections comme le diabète, le rhumatisme, la perte de poids et même les maladies incurables. (**Belkhodja, 2016**)

3. Les activités biologiques des extraits :

Les extraits sont largement utilisés pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, et insecticides (Silva et al., 2003).

Des études sur les différents composants des extraits ont montré d'importants modes d'action Biologique pour d'éventuelles applications dans le domaine de la santé. Certains d'entre eux constituent des alternatives efficaces à des composés synthétiques de l'industrie chimique, sans qu'il y ait apparition d'effets secondaires (Bakkalia et al., 2007).

3.1. L'activité antioxydante :

De nombreux tests sont employés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits. La plupart de ces tests reposent sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Parmi les méthodes les plus couramment utilisées, on trouve le DPPH, le FRAP, l'ABTS (Saidi, 2019). On trouve aussi le test de Blanchissement de la β -carotène. On peut évaluer le potentiel antioxydant d'un extrait végétal en mesurant sa capacité à inhiber l'oxydation du β -carotène. En ce test, l'oxydation de l'acide est observée. L'acide linoléique génère des radicaux peroxydes qui attaquent les onze liaisons doubles du β -carotène, ce qui entraîne une décoloration de celui-ci mesurée à 470 nm par spectrophotométrie.

Toutefois, l'ajout d'un antioxydant pourrait supprimer les radicaux libres provenant de l'acide linoléique, ce qui permettrait de prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène (Kubola et Siriamornpun, 2008)

3.2. L'activité antimicrobienne :

On connaît depuis l'antiquité les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales. Cependant, les scientifiques ne commenceront à s'y intéresser qu'au début du 20ème siècle (Haddouche, 2008).

Plus précisément, l'action antimicrobienne des huiles et des extraits de plantes a été utilisée dans de nombreuses applications, telles que la pharmacie, la médecine, la thérapie naturelle et la préservation des plantes (Sagdic et al., 2002).

3.3. L'activité anti inflammatoire :

L'inflammation joue un rôle crucial dans la protection de l'organisme contre les agressions physiques, chimiques, biologiques ou infectieuses, qui sont essentielles à son intégrité (Cheritiet *al.*, 2016)

De nombreux travaux ont montré que les polyphénols, notamment les flavonoïdes, possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils peuvent influencer le fonctionnement du système immunitaire en inhibant l'activité des enzymes qui peuvent provoquer des inflammations. Ils ont également la capacité d'influencer l'adhérence des monocytes lors d'une inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (Liu *et al.*, 2020).

4 . Généralités sur les borraginacées :

Les borraginacées comprennent 2000 espèces, appartenant aux régions chaudes et tempérées. Ce sont un exemple de famille très homogène dont les représentants sont très facilement reconnaissables (Guignard, 1998).

En effet, ce sont des plantes herbacées, à feuilles alternes, typiques d'aspect, rêches, rugueuses au toucher, du fait de la présence de poils rudes, dont la base contient fréquemment des concrétions de CaCO₃ (cystolithes) ; d'où le nom d'Asperifoliées que les anciens botanistes avaient donné à cette famille.

5 . Présentation de la plante étudiée *Echium horridum* Batt. :

Echium horridum Batt est une plante herbacée annuelle dressée, pouvant atteindre 50 cm, Couverte de soies bulbeuses étalées (glabres entre les soies) et plusieurs tiges fleuries. De grandes fleurs irrégulières en cymes terminales, simples ou ramifiées, forment la plante. Avec plusieurs racines latérales courtes et effilées, elle a une longueur de 16 à 20 cm et un diamètre de 0,3 à 0,5(tableau1) , photo 1) (Mahmoud *et al.*, 1999).

Tableau 1 : Description des parties de la plante *Echium horridum* Batt.

	<i>Echium horridum</i> Batt.
Les racines	Longueur : 16_20cm Largeur : 0,3_ 0 ,5cm
Les feuilles	Elliptique à lancéolé et mesure 5_15cm en longueur et 0,3_ 0,7 cm en largeur
Les fleurs	
A_ La bractée	Étroitement lancéolé mesure 2,23cm et 0,3cm de largeur.
B_ Le calice	
C_ La corolle	Segments linéaires lancéolés en soie blanche et mesurant 11,5 à 12mm de longueur et 1,5 à 1,9mm de largeur.
D_ l'androcée	
E_ le gynécée	De couleur violette à bleue et mesure 18 à 20mm de longueur. Les étamines sont au nombre de 4 à 5 et les anthères mesurent 1mm de longueur. L'ovaire mesure 0,9 à 1,6mm de diamètre.



Photo 1: L'aspect général d'*Echium horridum* Batt. (Tlemcen Tounane Souahlia, 2024)

Le tableau suivant illustre la classification botanique d' *Echium horridum* Batt.

Tableaux 2 : Classification taxonomique d'*Echium horridum* Batt.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Boraginales
Famille	Boraginaceae
Genre	<i>Echium</i> L.
Espèce	<i>Echium horridum</i> Batt.

a. Localisation de la plante *Echium horridum* Batt. :

La **figure 01** montre la présence de la plante *Echium horridum* Batt. sur la carte du continent Africain ;

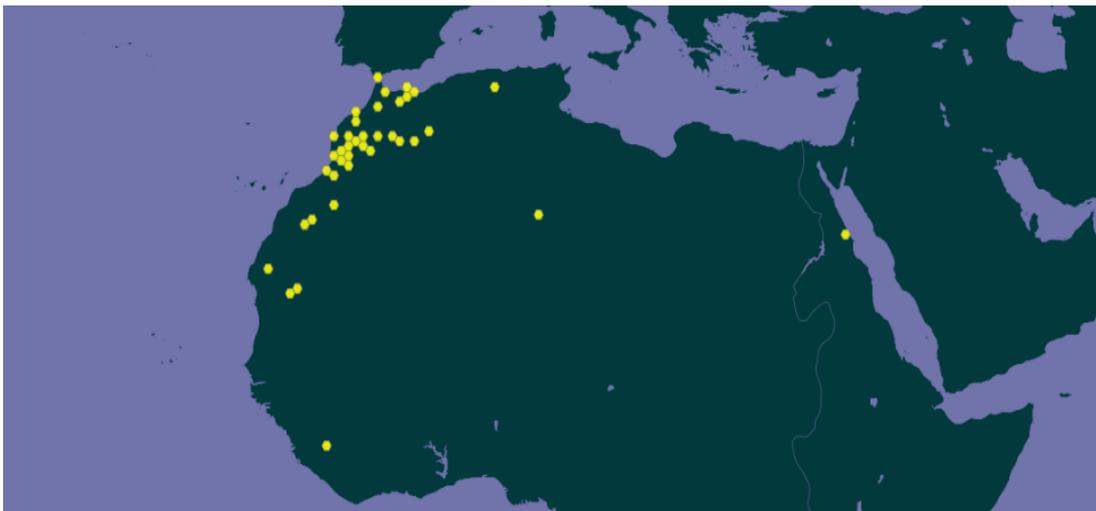


Figure 1 : Situation géographique de la plante *Echium horridum* Batt.(GBIF | Global Biodiversity Information Facility,consulté le 10 /05/2024)

b. Travaux antérieurs :

Echium horridum Batt. est une plante fascinante avec une histoire riche en contributions à la biodiversité et à la recherche scientifique : Sur le plan phytochimique, une étude a identifié la richesse d'*Echium horridum* Batt. et d'*Echium rauwolfii* Del. en alcaloïdes (**Mahmoud et al., 1999**).

D'après l'article (d'**Assem El-Shazly et al., 1999**), qui ont fait des recherches sur la pyrrolizidine, un alcaloïde d'*Echium rauwolfii* Del. et d'*Echium horridum* Batt. (*Boraginaceae*), le profil alcaloïde d'*E. rauwolfii* Del. semble être très similaire à celui d'*E. horridum* Batt., à l'exception de l'absence du lycopsamine et de certaines variations quantitatives.

Chapitre 2 : Les métabolites secondaires

1. Définition et fonction des métabolites secondaires :

Une caractéristique remarquable des plantes réside dans leur capacité à générer une vaste gamme de substances naturelles. Contrairement aux métabolites primaires tels que les protéines, les glucides et les lipides, ces métabolites secondaires sont produits en quantités minuscules. Plus de 200 000 molécules de métabolites secondaires ont été identifiées et classées en fonction de leur composition chimique, comprenant des composés phénoliques, des alcaloïdes et des terpénoïdes (Saidi, 2019).

2. Les composés phénoliques :

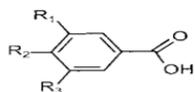
2.1. Les polyphénols :

Les polyphénols, en tant que métabolites secondaires, ne participent pas directement aux fonctions vitales des plantes, telles que la croissance ou la production (Labioud, 2016). Cependant, ils représentent une ressource importante de molécules exploitables par l'homme dans divers domaines (Saidi, 2019). Ces composés sont produits par les plantes, se trouvent dans les vacuoles des tissus végétaux et contribuent à la qualité organoleptique et nutritionnelle des aliments qui en renferment (figure 2) (Zemmouri, 2015).

Comme la plupart des métabolites secondaires, les polyphénols sont synthétisés par les plantes pour remplir diverses fonctions. Ils jouent généralement un rôle dans :

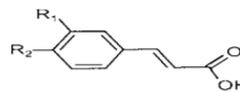
- La protection contre les rayonnements ultraviolets.
- La défense contre les agressions par les pathogènes et les parasites et les prédateurs.
- La formation d'arômes et de parfums, ainsi que leur contribution à la pigmentation.
- La protection des cultures contre les ravageurs et la germination des graines avant la récolte (Bravo, 1998 ; Dai et Mumper, 2010).

Hydroxybenzoic acids



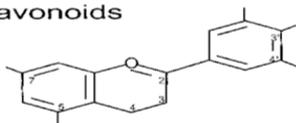
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: Protocatechuic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids

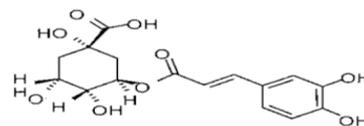


$R_1 = OH$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = OH$: Caffeic acid
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ferulic acid

Flavonoïdes

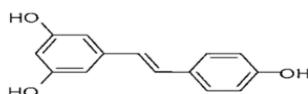


See Figure 2



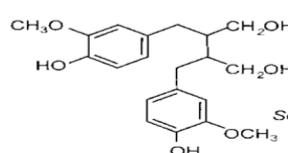
Chlorogenic acid

Stilbenes



Resveratrol

Lignans



Secoisolariciresinol

Figure 2 : Structures chimiques des polyphénols (Manach, 2004).

2.2. Les flavonoïdes :

Le terme "flavonoïde", dérivé du latin "flavus" signifiant jaune, englobe une vaste variété de composés naturels faisant partie de la famille des polyphénols (figure 3) (Seyoum et al., 2006).

Les flavonoïdes sont situés dans différentes parties de la plante : les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs (Medi –Saric et al., 2004). Ils se caractérisent par le degré d'oxydation du noyau Central (qui peut s'ouvrir ou se fermer), le nombre, la position et la nature des substituants (Groupes hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et du cycle central C (Harborne, 1988).

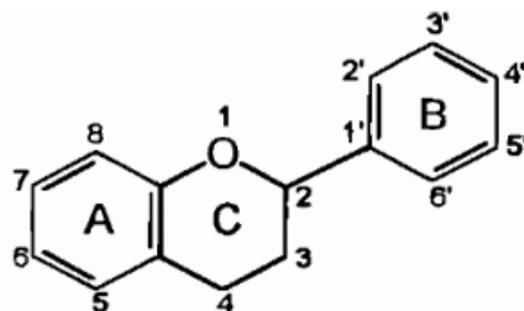


Figure 3 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes (Medi–Saric et al., 2004)

2.3. Les tanins :

Les tanins, produits métaboliques dépourvus d'azote, sont répandus dans de nombreux végétaux à des concentrations variables. Ils confèrent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles, les rendant peu attrayantes pour les insectes ou le bétail, et se distinguent par leur saveur astringente (**figure 4**) (Laouini, 2014).

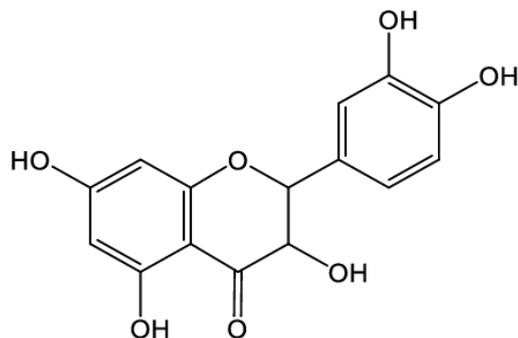


Figure 4 : Squelette moléculaire de base des tanins condensés

2.4. Les coumarines :

Les coumarines (**figure 5**) constituent une classe importante de produits naturels et donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché (Kholkhal, 2014).

Les propriétés physiologiques, biologiques et antimicrobiennes des coumarines incluent la capacité de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Aidoud et Sammoudi, 2016).

Ces composés peuvent agir sur le système cardiovasculaire, être anti-oedémateuses et immunostimulantes, et il est probable qu'ils aient une activité cytotoxique (Richard, 2012).

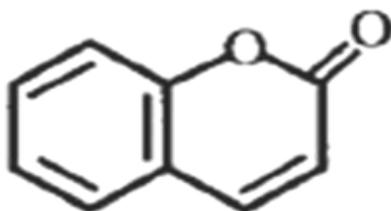


Figure 5 : Structure de base des coumarines (Cowan, 1999)

2.5. Les saponines :

Le terme saponine provient du terme latin «**sapo**», qui signifie savon, car ces composés émettent une mousse lorsqu'ils sont agités avec de l'eau (Vincken et al., 2007). Les saponosides, également connues sous le nom de saponines, sont une catégorie particulière de métabolites secondaires (figure 6) (Sparg et al., 2004).

Ces substances font partie intégrante de nombreuses plantes médicinales. On a observé la présence de saponines dans plus de 100 familles de plantes et dans quelques sources marines. Elles peuvent se trouver dans diverses parties des plantes (Missaoui, 2018).

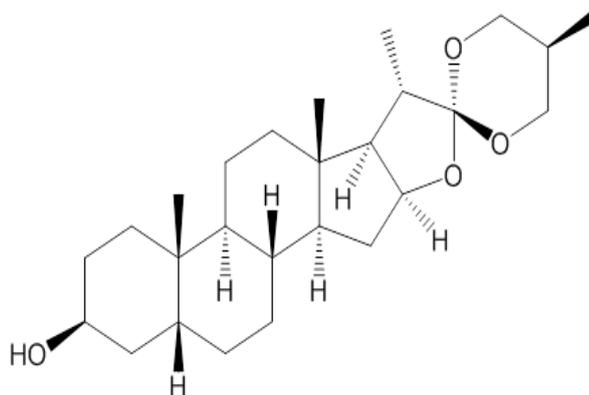


Figure 6 : Structure de base des saponines (Sparg et al., 2004).

Partie 2 :
Partie expérimentale

Dans le cadre de l'étude de l'activité antioxydante des plantes de l'Ouest Algérien, nous nous sommes intéressés à la famille des Boraginacées en particulier à l'espèce *Echium horridum* Batt. Le travail a été effectué au sein du laboratoire de recherche « Produits naturels LA PRONA » de l'université Abou Bekr BELKAID- Tlemcen.

1. Origine et préparation du matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est la partie feuilles d'*Echium horridum* Batt. . Il a été récolté dans la commune de Souahlia Tounane, Daira de Ghazaouet ; Wilaya de Tlemcen, dans la région Ouest de l'Algérie, durant le mois de Mars 2024.

Après la récolte, les feuilles de la plante sont séchées à l'air libre et à température ambiante pendant 10 jours, puis broyées. La poudre est ensuite conservée dans des flacons, en verre hermétiquement fermés à basse température -18°C en vue de procéder aux différentes manipulations.



Photo 2 : Les feuilles d'*Echium horridum* Batt. (Tlemcen Tounane Souahlia 2024)

2. Détermination de la teneur en eau :

➤ Principe :

Pour la détermination du pourcentage d'humidité, on procède à une dessiccation de l'échantillon frais à analyser dans une étuve à la température de 100°C à 105°C est sous la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient d'opérer dans vases de tare, placés dans un dessiccateur(photo 3)(Audigié et al., 1980).

➤ Mode opératoire

- Les vases de tare ont été séchés à l'étuve pendant 30 min à 103°C avec les couvercles inclinés
- Après refroidissement dans un dessiccateur durant 30 min les vases de tare a été pesés avec les couvercles (P1).
- Dans chaque vase, on été introduire 2g des feuilles de la plante, l'ensemble a été pesé avec les couvercles fermés (P2)
- Après un étuvage de 3h à 105°C avec couvercles inclinés puis refroidissement dans un dessiccateur pendant 15 min, les vases de tare sont pesés, ensuite ils sont remis avec couvercles inclinés dans l'étuve durant 1h à105°C.
- Après refroidissement comme précédemment, les vases de tare sont pesé (P3)
- La différence entre deux pesées doit être inférieure à 2mg si non l'opération est renouvelée jusqu'à poids constant.

➤ Expression des résultats

La teneur en eau % d'un matériel végétal est déterminée par la relation suivante :

$$\text{La teneur en eau}\% = [(P2-P3) / (P2-P1)] 100$$

Avec :**P1** : poids en gramme de vase de tare vide.

P2 : poids en gramme de la prise d'essai avant séchage.

P3 : poids en gramme de la prise d'essai après séchage.

A partir de la teneur en eau, on peut déterminer le taux de matière sèche qui est donné par la formule suivante :

$$\text{Taux de matière sèche}(\%)= 100 - \text{teneur en eau } \%$$



Photo 3 : Dessiccateur (Tlemcen, 2024)

3. Protocole d'extraction :

Afin d'obtenir l'extrait aqueux des feuilles, un procédé d'extraction des échantillons a été effectué comme suit : (Majhenic *et al.* 2007).

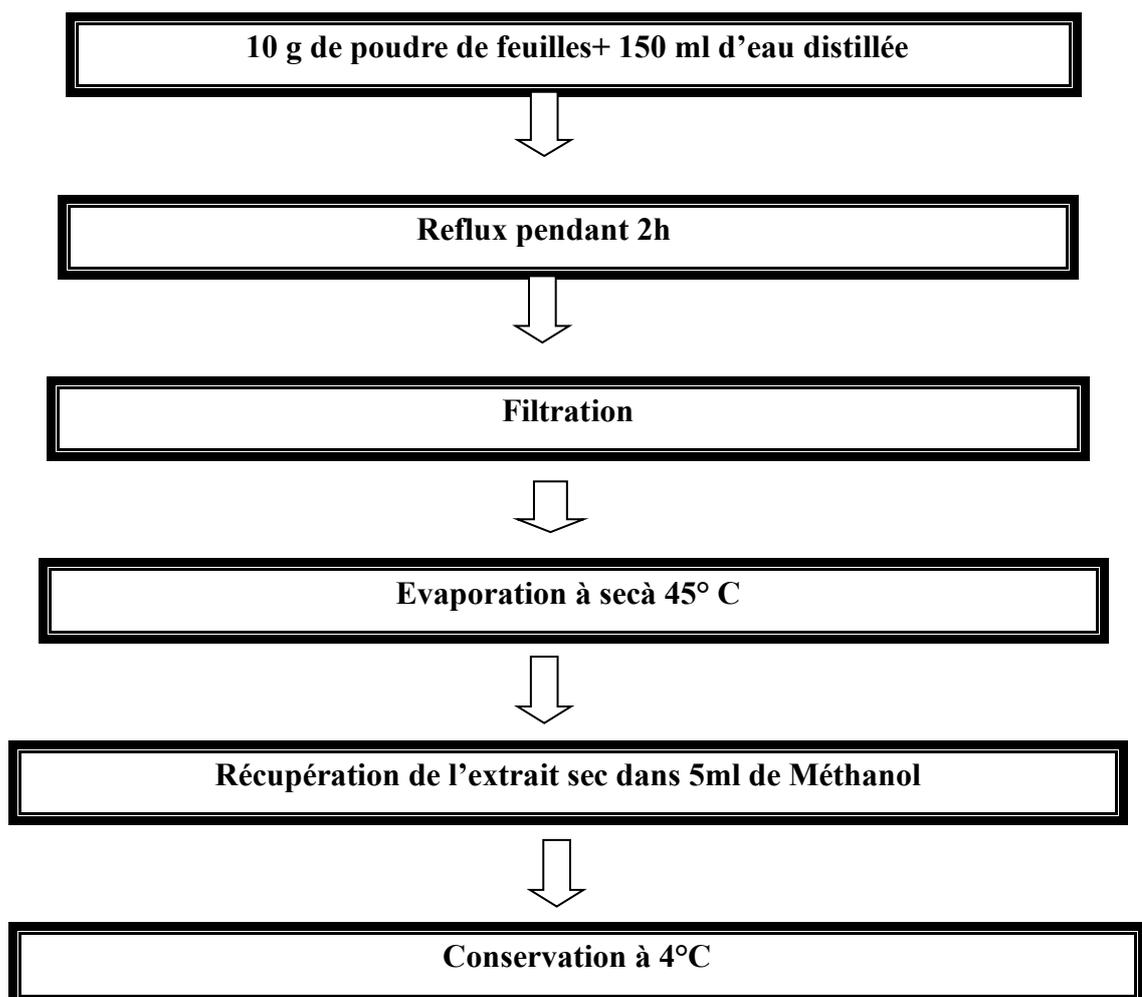




Photo 4 : Extraction à chaud (reflux) et filtration de l'extrait (Tlemcen, 2024)



Photo 5 : Evaporation de l'extrait (Tlemcen, 2024)

4. Dosage des composés phénoliques :

4.1. Dosage des polyphénols : (photo 6)

➤ Principe :

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la spectrophotométrie selon la méthode de la réaction de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est composé d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxyde bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite est proportionnelle à la quantité des phénols présente dans l'extrait végétal (Singleton et Rossi, 1965).

➤ **Mode opératoire**

La teneur en phénols totaux de l'extrait sec obtenu a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Une quantité de 200 μ l de l'extrait est mélangée avec 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7,5% (Na_2CO_3). L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 760 nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par g de matière végétale sèche (Singleton et Rossi, 1965).

On a réalisé une courbe d'étalonnage ($y = a \cdot x + b$) en parallèle dans les mêmes conditions à partir d'acide gallique à différentes concentrations.

➤ **Expression des résultats :**

La teneur en polyphénols de l'extrait aqueux des feuilles d'*E. horridum* Batt. est exprimée en milligramme équivalente d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG / MS).

4.2. Dosage des Flavonoïdes :

➤ **Principe :**

Le dosage des flavonoïdes présents dans l'extrait aqueux des feuilles d'*E. horridum* Batt. a été déterminé à l'aide de la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium, qui forme un complexe de coloration jaune (Zhishen et al., 1999).

➤ **Mode opératoire**

- Mélanger 250 μ l de l'extrait avec 1000 μ l d'eau distillée et 75 μ l du réactif $NaNO_2$ à 15% ;
- Incubation pendant 6 min à température ambiante, ajouter 75 μ l du réactif chlorure d'aluminium $AlCl_3$ à 10%.

- Après 6 min, ajouter 100µl d'hydroxyde de sodium NaOH (4%), ajouter 100 µl d'eau distillée.
- Incubation du mélange à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min
- Mesurer l'absorbance contre un blanc à 510 nm.

Une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) a été réalisé en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme standard à différentes concentrations.

➤ **Expression des résultats :**

La teneur en flavonoïdes de l'extrait aqueux d'*E. horridum* Batt. est exprimée en milligramme équivalente catéchine par gramme de matière sèche (mg EC /GMS).

4.3. Dosages des tanins condensés

➤ **Principe :**

La détermination des tanins est mesurée en utilisant la méthode de vanilline dans un milieu (JulKunen-Titto, 1985).

➤ **Modes opératoire :**

- 50µl de l'extrait phénolique est ajouté à 1500µl de la solution Vanilline/méthanol (4%, m/v)
- Agiter le mélange à l'aide d'un vortex,
- 750µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCL) est additionné et laisser réagir à température ambiante pendant 20 min,
- L'absorbance est mesurée contre un blanc à 550 nm.

On a réalisé une courbe d'étalonnage en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme standard à différentes concentrations.

➤ **Expression des résultats :**

La concentration des tanins condensés de l'extrait est estimée en milligramme équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC /MS).

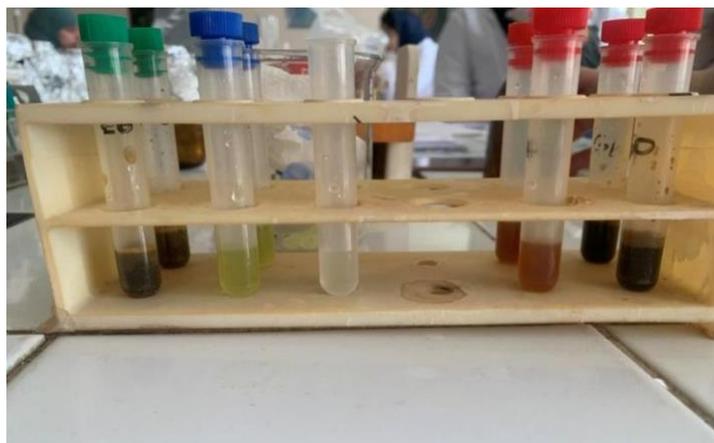


Photo 6 : Dosage des polyphenols et flavonoïdes(Tlemcen , 2024)

5. Évaluation de l'activité antioxydante :

Dans notre étude, l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait aqueux de la plante *Echium horridum* Batt., a été réalisée par deux techniques colorimétriques :

- ✓ **Piégeage du radical libre DPPH.**
- ✓ **Test de la réduction du fer (FRAP).**

5.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH :

La méthode de teste au DPPH repose sur la capacité des antioxydants à réduire le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle. Ce processus peut se faire soit en libérant un atome d'hydrogène du groupement hydroxyle, soit en libérant un électron. Le radical a une absorption maximale mesurable par spectrophotométrie à 515 nm, et l'action d'un antioxydant pour neutraliser ce radical peut être aisément suivie par spectrophotométrie UV/visible (**Saidi, 2019**).

➤ **Principe :**

Nous avons évalué l'activité antioxydante en utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl), conformément au protocole établi par (**Sanchez-Moreno et al.,1998**). Ce radical libre, DPPH, est réputé pour sa stabilité et sa couleur violette caractéristique. En présence d'un donneur d'hydrogène, il se transforme en une forme non radicalaire de couleur jaune. Une forte capacité à piéger les radicaux libres est généralement associée à une activité antioxydante élevée.

➤ **Mode opératoire :**

- Nous avons ajouté 50 µl de l'extrait aqueux à différentes concentrations à 1950 µl de solution méthanolique de DPPH (à une concentration de 0,0025 g/100ml). Un blanc a été préparé pour chaque solution, contenant 50 µl d'extrait et 1950 µl de méthanol (**photo 7**).
- Un contrôle négatif a été réalisé en mélangeant 50 µl de méthanol avec 1950 µl de la solution de DPPH.
- Les tubes ont été incubés pendant 30 minutes dans l'obscurité, à température ambiante.
- La lecture a été effectuée à une longueur d'onde de 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Sanchez-Moreno et al., 1998**).

Les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{DO Contrôle}(0) - \text{DO Echantillon}(t)) / \text{DO Contrôle}(0)] \times 100$$

% d'inhibition du DPPH représente le pourcentage de réduction ou d'inhibition du DPPH.

DO Contrôle(0) désigne la densité optique du contrôle à t = 0 min.

DO Echantillon(t) représente la densité optique de l'antioxydant à t = 30 min.

En analysant la variation du pourcentage de réduction du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait, nous avons pu déterminer graphiquement l'IC50. Cette valeur correspond à la concentration de l'antioxydant (l'extrait ou le composé) nécessaire pour réduire ou inhiber 50% du DPPH.

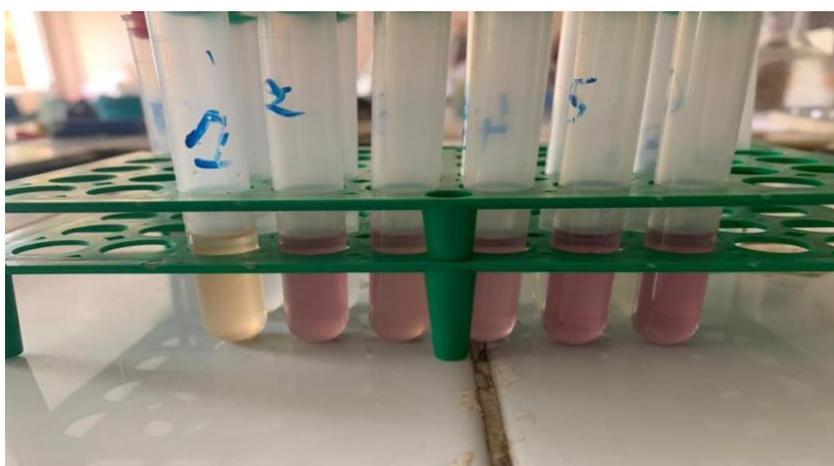


Photo7 : Mélange d'extrait, méthanol et solution de **DPPH** (Tlemcen , 2024)

5.2.Méthode de la réduction du fer FRAP :

5.2.1. Test de la réduction du fer (FRAP) :

La capacité de réduction ferrique est évaluée en utilisant une méthode de dosage FRAP, introduite en 1996. Cette méthode, développée par **(Benzie et Strain 1996)**, est considérée comme un test direct et rapide pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques **(Laouini, 2014 ; Bounihi, 2015)**

➤ Principe :

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu, (1986), basée sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} .

➤ Mode opératoire :

- 0,5ml de l'extrait à diverses concentrations sont mélangés avec 1,25 ml d'une solution tampon phosphate 0,2M (pH 6,6) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%.
- L'ensemble est ensuite placé dans un bain-marie à 50°C pendant 20 minutes.
- Pour stopper la réaction, 1,25 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% sont ajoutés.
- Les tubes sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 minutes.
- 1,25 ml du surnageant sont combinés avec 1,25 ml d'eau distillée et 0,25 ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparée à 0,1%.
- La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm par rapport à un blanc préparé de manière similaire, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée **(photo 8)**.
- Le contrôle positif consiste en une solution d'un antioxydant standard, dont l'absorbance est mesurée dans des conditions identiques à celles de l'échantillon. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé **(Hubert, 2006)**.



Photo8 : Test de FRAP de l'extrait aqueux d'*Echium horridum* Batt. (Tlemcen ,2024)

6. Évaluation de l'activité antimicrobienne :

Dans un premier temps, nous avons effectué des tests sur notre extrait vis-à-vis des souches microbiennes par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) Ensuite, nous avons mesuré la concentration minimale inhibitrice (CMI) en utilisant la méthode de micro dilution en milieu liquide.

Les bactéries sont ubiquitaires et se trouvent dans tous les milieux : sol, air, eau, sur les plantes et les animaux... etc. Toutefois, ces diverses espèces bactériennes sont pathogènes et sont à l'origine de maladies infectieuses telles que le choléra, la syphilis et la tuberculose. Les bactéries sont classées en deux types :

Les bactéries de Gram positif : Les bactéries à Gram positif sont visibles mauve sur le microscope.

Les bactéries à gram négatif : se distinguent par leur couleur rose sous leur forme microscope (figure 7).

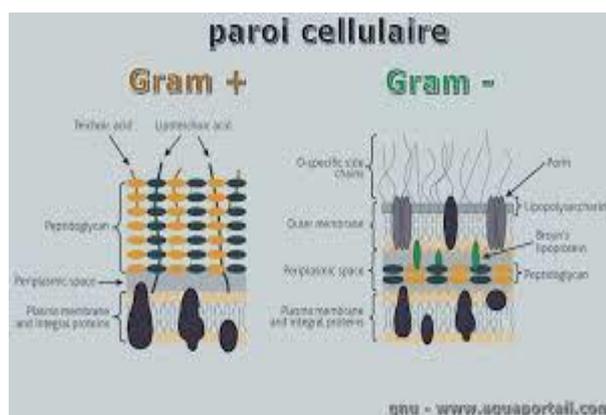


Figure 7 : structure de la paroi bactérienne

A. Méthode de diffusion sur disque :

Pour évaluer l'efficacité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'*E. horridum* Batt., nous avons employé la technique de l'aromatogramme (diffusion à partir de disques remplis). Afin de réaliser le test, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre sont placés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de Pétri, avec 10 µl d'extraits solubilisés dans le DMSO (Joffin et Leyral, 2001).

Mode opératoire :

6.1. Stérilisation du matériel :

Les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes ont été stérilisés en premier à sec dans un four pasteur, les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) et la gélose nutritive ont été stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

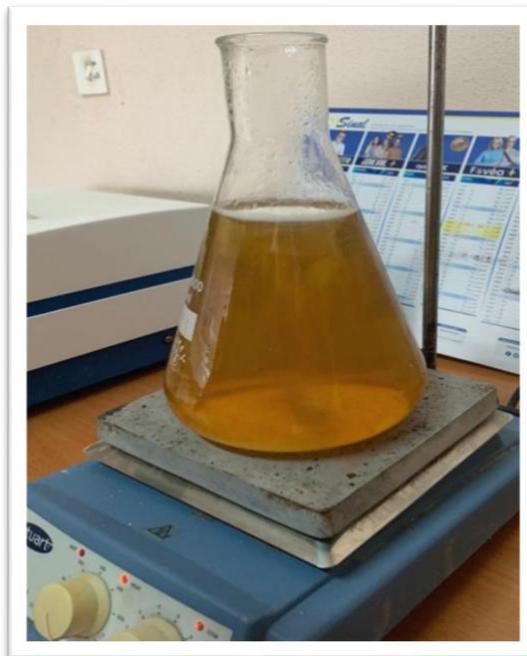
6.2. Préparation des milieux de culture :

Le milieu de culture approprié à cette étude est celui de Muller-Hinton. Il est essentiel de procéder à une stérilisation à l'autoclave avant d'être utilisé. Finalement, déverser le milieu dans les boîtes de pétri et laisser refroidir, la gélose Mueller-Hinton est utilisée comme milieu de culture pour les bactéries et le milieu Sabouraud pour la levure (photo 9).

Les milieux de culture sont essentiels pour favoriser la prolifération des bactéries, ce qui facilite l'analyse de leur activité antimicrobienne. Les milieux utilisés lors de cette étude sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Les milieux de culture utilisés dans l'activité antimicrobienne

Milieu de culture	PH	Utilisation
Gélose nutritive	6.0	pour la conservation des souches
Bouillon Mueller Hinton	7.4	pour le repiquage des bactéries
Gélose Mueller-Hinton	7.4	Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne
Bouillon Sabouraud	5.6	Pour le repiquage des levures
Gélose Sabouraud	5.6	Pour l'évaluation d'activité Antifongique (levure)

**Photo 9** : Préparation des milieux (Tlemcen 2024)

6.3. Les Souches bactériennes et fongiques testées :

Dans le but de tester l'effet antimicrobien *in vitro* de l'extrait aqueux d'*E. horiddum* Batt. , nous avons utilisé les micro-organismes suivants :

Tableau 4 : Les différentes souches microbiennes testées

	Micro-organismes	Gram	Code
Bactéries	Staphylococcus aureus	Positif	ATCC 29213
	Bacillus subtilus		ATCC 6633
	Enterococcus faecalis		ATCC 29212
	Pseudomonas aeruginosa	Négatif	ATCC 27853
	Escherichia coli		ATCC 25922
	Klebsiella pneumoniae		ATCC 700603
Levures	Candida Albicans	-	ATCC 10231

6.4. Mise en culture des souches :

Les souches, conservées sur gélose nutritive inclinée à 4 °C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37±1 °C pour les bactéries et 30±1°C pour la levure pendant 24 h à 48 h, puis ensemencées sur boîtes contenant des milieux sélectifs pour vérifier leur pureté(**photo 10**)(Pfaller et al., 1998 ; Pessini et al., 2003).

Après 24 h d'incubation à 37±1 °C pour les bactéries et 30±1 °C pour la levure, les souches sont ensemencées sur bouillon nutritif puis incubées à 37±1 °C pour les bactéries et 30±1 °C pour la levure pendant 18 h. De cette dernière culture, on prélève quelques gouttes et on les met dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension microbienne est bien homogénéisée. La turbidité est ensuite ajustée au standard McFarland 0,5 avec un spectrophotomètre, ce qui correspond à 1-2 × 10⁸ UFC/ml pour les bactéries (DO = 0,08 à 0,1/λ = 625 nm) et 1-5 × 10⁶ UFC/ml pour les levures (DO = 0,12 à 0,15 /λ = 530 nm) (Pfaller et al., 1998 ; Pessini et al., 2003).

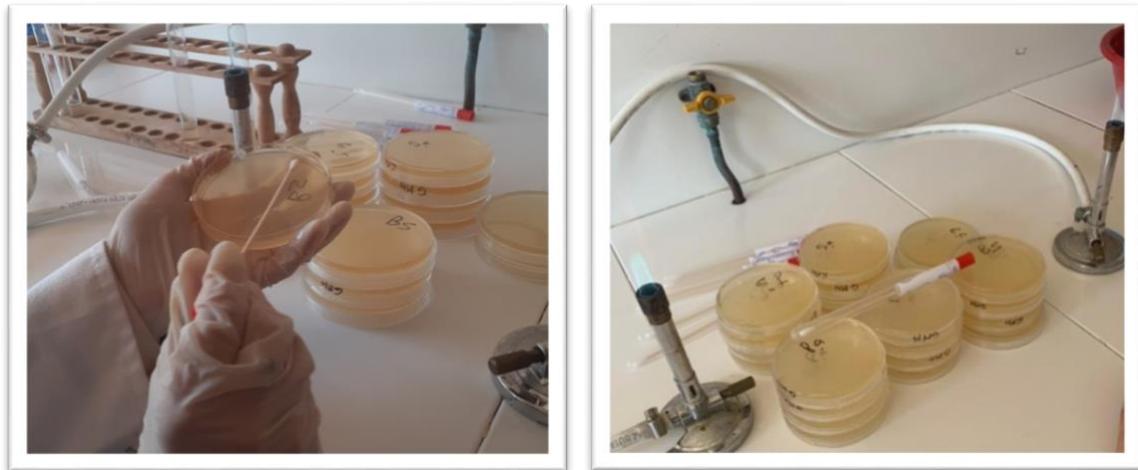


Photo 10 : l'activité antimicrobienne. (Tlemcen, 2024)

6.5. Lecture :

Les boîtes sont laissées 1 h à température ambiante puis retournées et incubées à 37 ± 1 °C pendant 18-24 h pour les bactéries, à 30 ± 1 °C pendant 24-48 h pour les levures. La présence d'une zone d'inhibition circulaire autour des disques, où il n'y a pas de croissance de microorganismes, émoigne de la sensibilité de ces derniers à cet extrait. À mesure que la zone d'inhibition augmente, le germe devient plus sensible (**figure 8**)(Yakhlef et al., 2011).

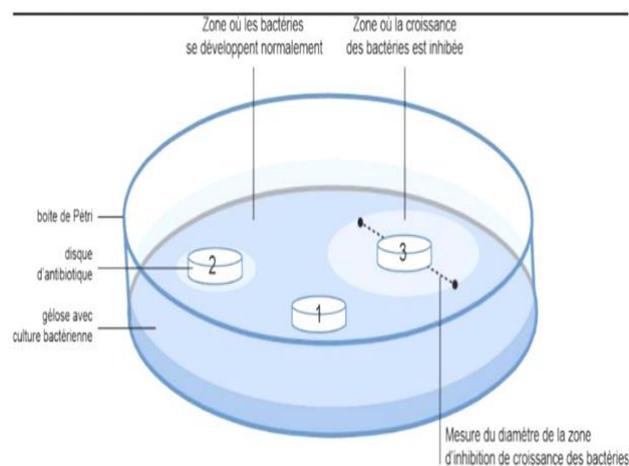


Figure 8 : Détermination de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion des disques (Zaiki, 1988)

B .Méthode de micro-dilution en milieu liquide :

Ce test en milieu liquide a pour objectif de déterminer les valeurs des paramètres antimicrobiens dont la concentration minimale inhibitrice (CMI). La méthode décrite par **Okusa et al. (2007)**, avec une légère modification a été employée.

6.6.Préparation des dilutions :

100 µl de bouillon Mueller Hinton sont déposées dans les 96 puits d'une microplaque stérile, 100 µl d'extrait sont déposées dans le deuxième puits de chaque colonne, des dilutions au 1/2 sont réalisées par le transfert de 100 µl d'un puits à l'autre à partir du deuxième. Puis 100µl de l'inoculum sont ajoutées dans chaque puits. Puis Incubation à $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h (**Figure11**).

6 .2. La concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Correspond à la concentration minimale de l'extrait pour laquelle il n'y a aucune croissance visible des germes à l'œil nu après une incubation de 18 à 24 heures. Elle a été déterminée en observant le trouble causé par la croissance des germes étudiés dans chaque tube. La CMI a été la concentration la plus faible pour laquelle aucun trouble n'a été observé à l'œil nu (**Toty et al., 2013**).



Photo 11 : Méthode de micro-dilution (CMI) (Tlemcen, 2024)

7. Test d'hémolyse :

Le principe de ce test est de mettre en contact des hématies avec l'extrait aqueux d'*E. horridum* Batt. à différentes concentrations, dans une solution isotonique et de suivre le taux d'hémoglobine libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de ces extraits, vis-à-vis des GRh.

➤ Mode opératoire :

Pour préparer la suspension érythrocytaire : une prise de sang a été effectuée sur un sujet jeune et sain, échantillon prélevé a été récupéré dans des tubes EDTA (**photo 12**). L'échantillon de sang est ensuite centrifugé à une vitesse de 3000 tours/minute pendant une durée de 10 minutes. Une fois que le surnageant a été retiré, le culot est lavé trois fois avec un volume équitable de solution iso-saline. Après cette étape, le volume est mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10 % (v/v) (GRh), avec une solution iso-saline et utilisé immédiatement (**Chaouche, 2014**).

Le protocole suivi est celui de (**Bulmus et al.,2003**) , où un volume de 1.6 ml de l'extrait aqueux d'*E. horridum* Batt., est mélangé avec un volume de 0,4 ml de la suspension de GRh (10%). Le mélange réactionnel est incubé à 37°C, pendant 30 min, ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min et l'absorbance de l'hémoglobine libérée est mesurée à 560 nm. En parallèle, deux contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait avec de l'eau physiologique (contrôle négatif) ou avec de l'eau distillée (contrôle positif correspondant à 100% d'hémolyse).

Expression des résultats : Le pourcentage d'hémolyse est calculé à partir de la formule suivante(**Lee, 2002**) :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (At/Ac * 100)$$

Où : Ac = Absorbance du contrôle positif ; At = Absorbance du test.



Photo 12 : Suspension érythrocytaire (Tlemcen, 2024)

PARTIE 3 : RESULTATS
ET DISCUSSION

L'Ouest algérien renferme une flore très riche et peu valorisée. Parmi cette végétation qui se raréfie, on trouve les plantes médicinales traditionnellement utilisées par nos ancêtres à des fins thérapeutiques. Notre travail est une contribution à l'étude des activités biologiques d'*Echium horridum* Batt. appartenant à la familles des Borraginacées et connue pour ces vertus thérapeutiques.

1. Détermination de la teneur en eau :

La détermination de la teneur en eau a été effectuée selon la méthode (d'Audigié et al., 1980), l'analyse de la teneur en eau des feuilles d'*Echium horridum* Batt., a révélé un taux respectif de 76,5% et à partir de cette valeur on a déterminé le pourcentage de la matière sèche (MS) qui a été estimé à 23,5% pour les feuilles d'*Echium horridum* Batt. .

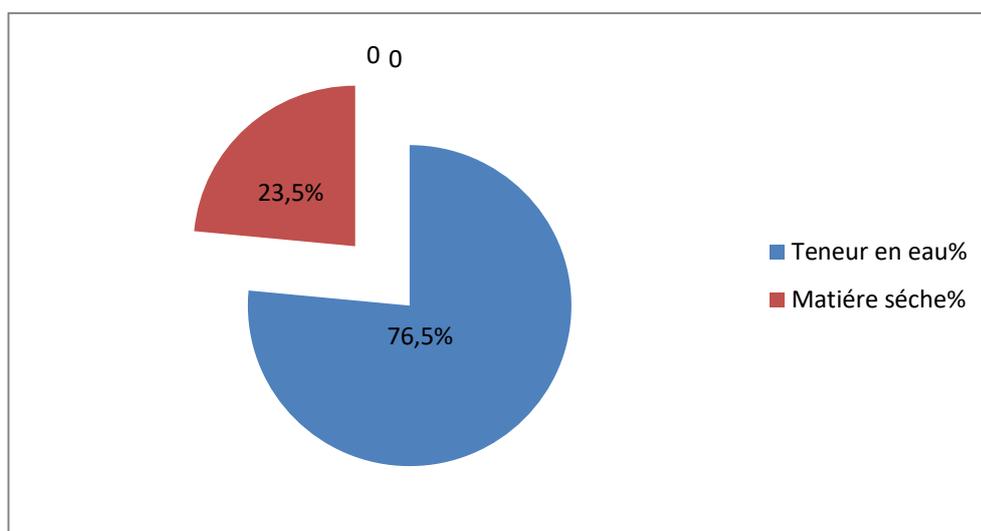


Figure 9 : La teneur en eau des feuilles d'*Echium horridum* Batt.

On peut dire que les feuilles de la plante *Echium horridum* Batt. fraîche contient une valeur supérieure a la moitié de poids de feuille (**figure 9**).

2. Teneurs en composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des substances bioactives extrêmement prisées en raison de leurs propriétés biologiques remarquables (antioxydantes, antimicrobiennes, etc...). Pour ces raisons, on a réalisé des dosages spectrophotométriques des polyphénols totaux (PT), des

flavonoïdes (Flv) et des tanins condensés (Tn) pour l'extrait aqueux préparé, en utilisant les équations des régressions linéaires des courbes d'étalonnage.

2.1. Dosage des polyphénols :

Le dosage des polyphénols totaux (PT), a été réalisé selon la méthode du réactif de Folin, Ciocalteu. On a établi cette courbe par l'utilisation de la formule de la régression linéaire de cette courbe est de $y = 0,002x$ avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,9918 (**figure 10**).

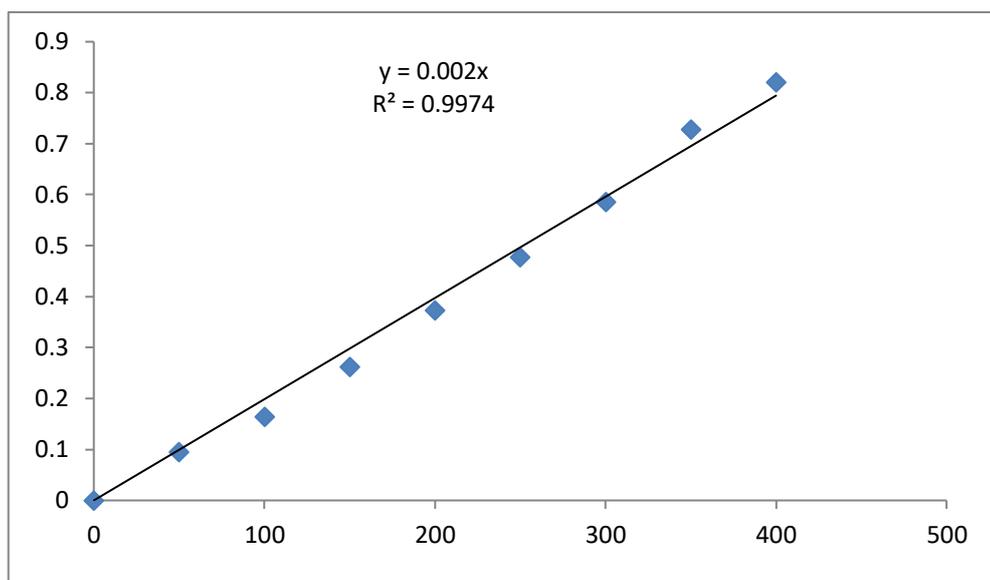


Figure 10 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

Nous avons constaté que la teneur en polyphénols dans les feuilles d'*E. horridum* Batt. est élevée avec une concentration de **300,3 mg EAG /g MS**. Ces résultats sont comparables à ceux de **Chaouche., 2009**, qui ont travaillé sur une espèce du même genre (*Echium pycnanthum* Pomel), les feuilles d'*Echium pycnanthum* Pomel ont présenté une teneur en polyphénols inférieure à celle d'*Echium horridum* Batt. (262,98mgEAG/g).

2.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes des feuilles d'*Echium horridum* Batt. a été déterminée selon la méthode du trichlorure d'aluminium $AlCl_3$, et les résultats sont résumés dans le tableau 6.

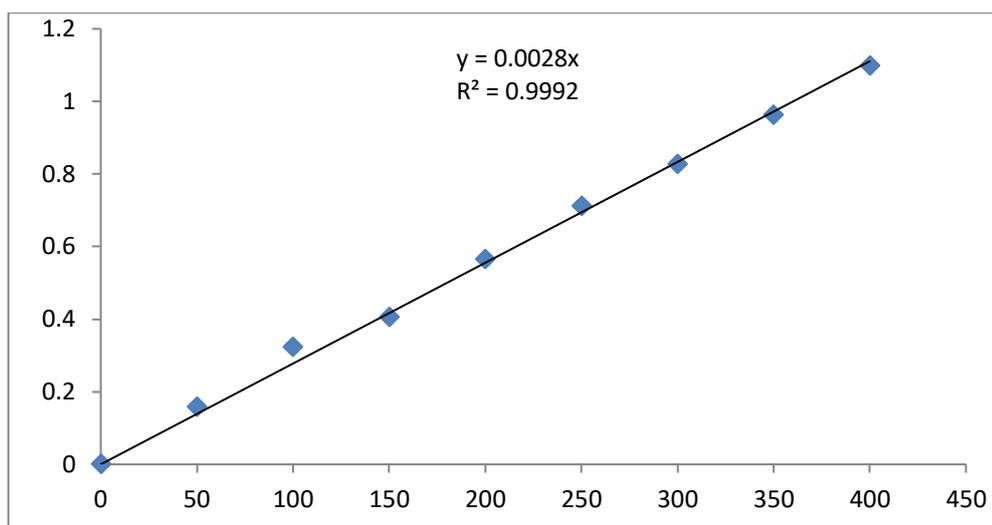


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la Catéchine pour le dosage des flavonoïdes

Après utilisation de l'équation de la courbe d'étalonnage (figure 11). Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux des feuilles d'*E. horridum* Batt a une faible teneur en flavonoïdes avec une valeur de l'ordre de 26,25 Mg E Catéchine /g MS

1.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés d'extrait des feuilles de la plante étudiée a été réalisé selon la méthode de vanilline en milieu acide. Les calculs des teneurs a été fait à l'aide de la courbe d'étalonnage de la Catéchine (figure 12).

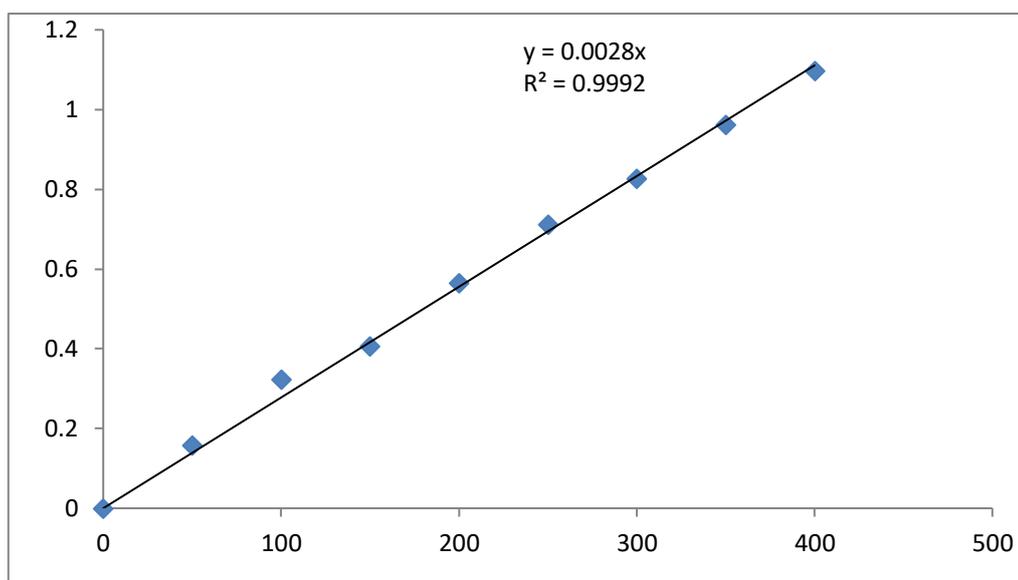


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la Catéchine pour le dosage des tanins condensés

Les résultats du dosage des tanins condensés de l'extrait aqueux des feuilles d'*Echium horridum* Batt. montrent que cette plante a une teneur modérée en tanins condensés : 94,99 Mg E catéchine /g MS. Les faibles teneurs en tanins dans *E. horridum* Batt., comparées avec celles des polyphénols totaux et des flavonoïdes, sont probablement dues au fait que le l'eau n'est pas le solvant approprié à l'extraction de ces composés. Plusieurs travaux ont montré que les tanins condensés sont mieux extraits par un mélange acétone/eau (70/30) (Macheix et al., 2005).

Les résultats des dosages sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Contenus en composés phénoliques d'extrait aqueux des feuilles de la plante *Echium horridum* Batt.

espèce	Partie étudiée	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins condensés
<i>E. Horridum</i> Batt.	Feuilles	300,3mgEAG /g MS	26,25mgEC/gMS	94,99mgEC/gMS

Peu de travaux concernant les teneurs en composés phénoliques de l'espèce étudiée ont été réalisés. Cependant, il est à noter que la variabilité des teneurs en composés phénoliques est généralement corrélée avec l'importance des activités biologiques. D'ailleurs, et d'une manière générale, le pouvoir antioxydant est fortement corrélé à la concentration en composés phénoliques (Hanson et al., 2004). La raison pour laquelle, nous nous intéressons par la suite à l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de ce même extrait.

2. Evaluation de pouvoir antioxydant :

Deux techniques colorimétriques différentes ont été utilisées *in vitro* pour démontrer le pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux d'*E. horridum* Batt. : Le piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et le pouvoir de réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxydant power).

2.1. Le piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :

On utilise fréquemment le dosage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes (Pekal et Pyrzynska, 2015).

Les données sur les densités optiques DO obtenues ont été utilisées pour calculer les taux d'inhibition et élaborer des courbes (taux d'inhibition en fonction des différentes concentrations) (figure 13).

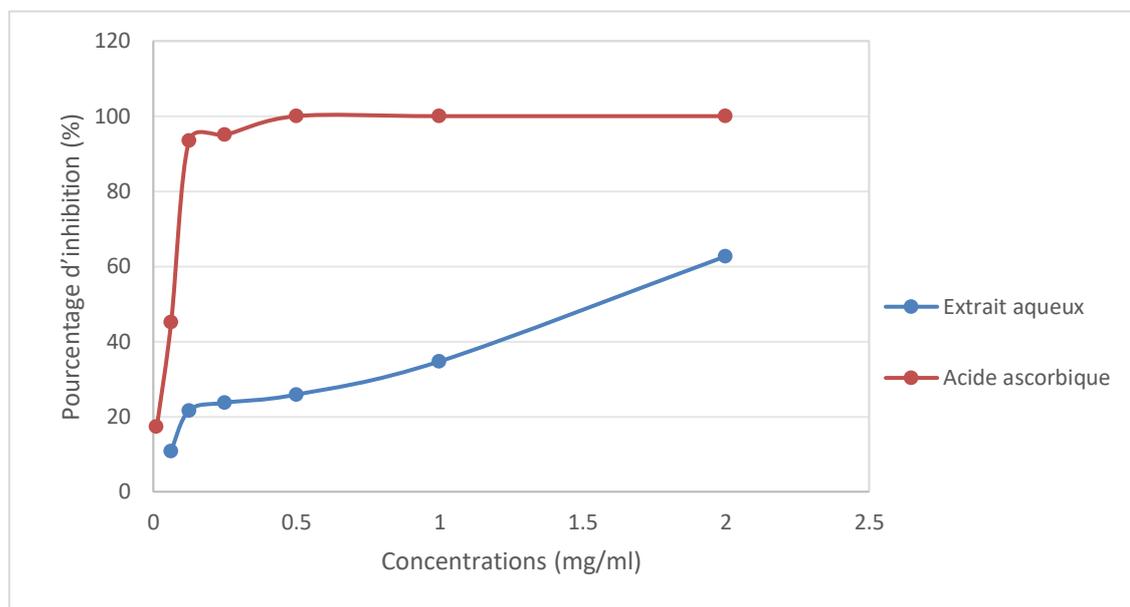


Figure 13 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Echium horridum* Batt.

Le test DPPH est un moyen rapide et sensible de surveiller l'activité antioxydante d'un composé spécifique ou d'extraits de plantes (Khadhr et al., 2017).

En comparant les pourcentages d'inhibition à une concentration de 0,5 mg/ml, nous remarquons que notre extrait aqueux des feuilles d'*E. horridum* Batt. possède une activité modérée avec 25,87% contre 100% pour l'acide ascorbique qui est l'antioxydant de référence (Figure 13).

Les valeurs des IC₅₀ corroborent l'étude de (Bentabet, 2014). qui ont trouvé une IC 50 de l'ordre de 1,54 mg/ml pour l'espèce *Echium vulgare*(tableau 6).

Tableau 6 : les valeurs d'IC50 pour les extraits aqueux des feuilles de *Echium horridum* Batt et *Echium vulgare*

Espèce végétale	Extrait	IC50
<i>Echium horridum</i> Batt. (nos travaux)	Aqueux	1,66
<i>Echium vulgare</i> (Bentabet, 2014)	Aqueux	1,54

2.2 . La réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxydant power) :

En présence d'antioxydants, la technique FRAP est perçue comme une méthode directe et rapide permettant de mesurer la transformation du Fe³⁺ (fer ferrique) en Fe²⁺ (fer ferreux).

Tous les réducteurs présentant des potentiels de réduction de demi-réaction supérieurs à celui du couple Fe³⁺/Fe²⁺ présentent une réduction rapide (Olszowy et Widowicz, 2016).

Pour évaluer la capacité de réduction du fer, une variété de concentrations d'extrait des feuilles d'*Echium horridum* Batt. a été utilisée. Les valeurs des D.O obtenues indiquent que le pouvoir réducteur augmente proportionnellement en fonction des concentrations. ces résultats ont permis de tracer une courbe linéaire avec un $R^2 = 0,92$

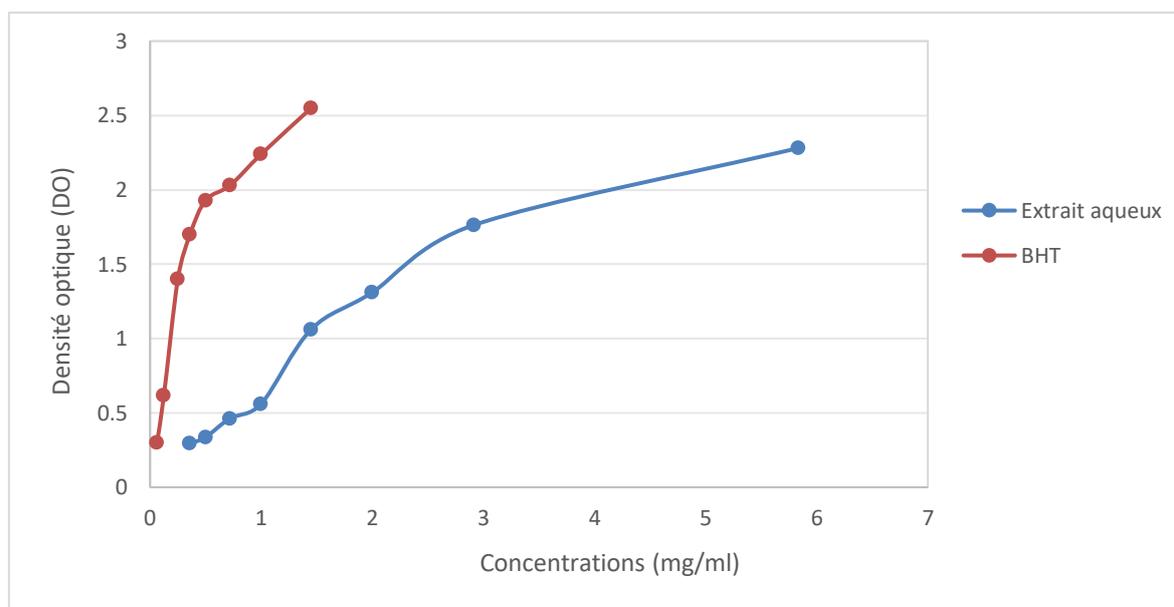


Figure 14 : Pouvoir réducteur du fer de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Echium horridum* Batt.

En comparant les densités optiques (DO) à une concentration de 1 mg/ml, nous remarquons que notre extrait aqueux des feuilles d'*E. horridum* Batt possède une activité modérée avec 0.561 DO contre 2,25 DO pour BHT qui est l'antioxydant de référence (Figure 14).

Tableau 7 : la capacité à réduire le fer pour les extraits aqueux des feuilles de *Echium horridum* Batt et *Echium vulgare*

Espèce végétale	Extrait	EC50
<i>Echium horridum</i> Batt	Aqueux	0.464
<i>Echium vulgare</i>	Aqueux	0.39

Nous avons mesuré la capacité à réduire le fer de l'extrait des feuilles d'*Echium horridum* Batt. Les résultats ont montré une capacité de réduction du fer de EC₅₀ égale 0.464 mg/ml. Ce résultat est comparable au travail de (Bentabet, 2014), qui ont travaillé sur une espèce du même genre *Echium*, à savoir *Echium vulgare* et qui a montré une capacité à réduire le fer avec EC₅₀ égale à 0.39mg/ml. Ces deux résultats restent inférieurs à celui de l'antioxydant de référence (BHT).

Quelques études ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Jeong et al., 2004).

Les résultats obtenus corroborent avec le fait que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons (Liu et al., 2009).

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux :

3.1 . Méthode de diffusion des disques sur milieu solide :

L'étude de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu solide (Mueller Hinton), qui est une technique qualitative basée sur la mesure de diamètre de la zone d'inhibition, en millimètre (mm), qui apparaît autour du disque imprégné d'extrait de plante.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions de l'extrait aqueux vis-à-vis des bactéries, de levures et des moisissures sont illustrés dans le (tableau 8).

Tableau 8 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de l'extrait aqueux des feuilles d'*Echium horridum* Batt vis-à-vis des bactéries à Gram positif et négatif et de champignon

D<8mm(**Résistante**), 9mm≥D≤14mm(**sensible**), 15mm≥D≤19mm(**Très sensible**) D>20m(**Très sensible**)

	Feuilles	DMSO	Antibiotique : Gentamicine	Antifongique : Nystatine
Bactérie Gram +				
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	6	17	-
<i>Bacillus subtilis</i>	9	6	23	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	6	23	-
Bactérie Gram –				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	6	20	-
<i>Escherichia coli</i>	7	6	17	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	21	-
<i>Candida Albicans</i>	6	6	-	15

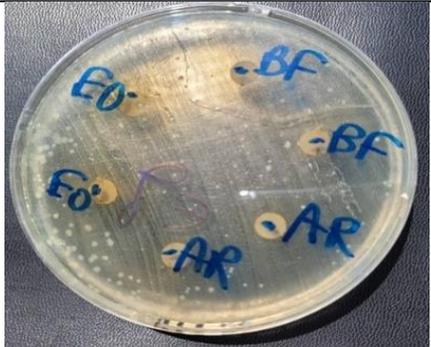
L'aromatogramme est une méthode qualitative, simple, appliquée en routine à tout microorganisme considéré comme pathogène. Cette méthode permet d'explorer un grand nombre d'extraits vis-à-vis de chaque souche

Il a été rapporté, qu'un extrait est considéré comme actif lors qu'il induit une zone d'inhibition supérieure à 10 mm (Tekwu et al., 2012).

D'après les résultats illustrés dans le tableau 8, nous remarquons que l'extrait aqueux des feuilles d'*Echium horridum* Batt.s'est avéré efficace sur deux bactéries à Gram positif, à savoir : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* avec des zones d'inhibition de 15mm et 9mm respectivement (Tableau 9). En revanche, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont révélées résistantes. Une étude a montré que les souches bactériennes: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont montrées sensibles à l'extrait polyphénolique et aux flavonoïdes d'*Echium vulgare*, avec des diamètres d'inhibition variant de 10mm (*Staphylococcus aureus*) à 23mm (*Bacillus subtilis*) (Laoufi et al., 2019).

Enfin, la levure (*Candida Albicans*) présente une résistance à l'extrait aqueux (Tableau 8 et 9). Contrairement aux résultats de (Laoufi et al., 2019), qui ont montré une forte sensibilité de *C.albicans* à l'extrait polyphénolique des feuilles de l'espèce du même genre : *Echium vulgare* avec un diamètre d'inhibition de 41mm.

Tableau 9 : Effet de l'extrait sur la croissance des différentes souches testées (Tlemcen, 2024)

	
<p><i>Bacillus subtilis</i></p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>
	
<p><i>Escherichia coli</i></p>	<p><i>Enterococcus faecalis</i></p>
	
<p><i>Klebsiella pneumoniae</i></p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>
	
<p><i>Candida Albicans</i></p>	

1.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide :(détermination des CMI)

D'après les résultats obtenus dans la photo, nous avons remarqué que cette méthode confirme les résultats obtenus avec la méthode de diffusion sur disque. Nous avons constaté également que l'extrait aqueux des feuilles d'*Echium horridum* Batt. est plus actif contre les 2 bactéries de Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et (*Bacillus subtilus*).

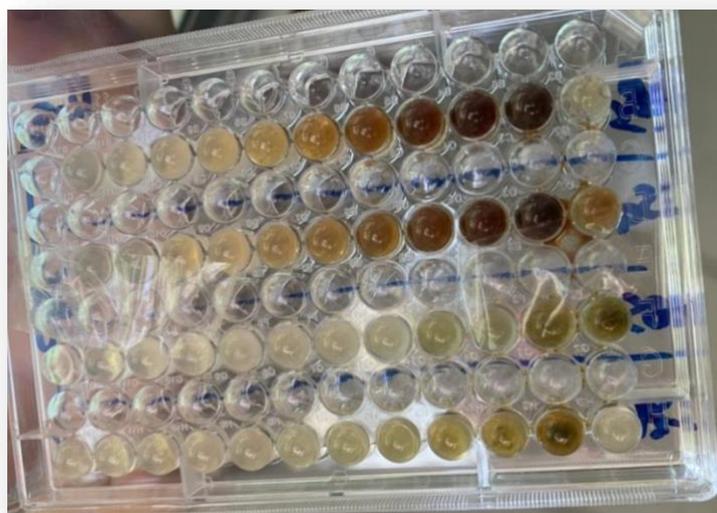


Photo 13 : Résultats des CMI sur microplaque de l'extrait aqueux vis-à-vis des souches testées (Tlemcen, 2024).

Tableau 10 : Valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait aqueux

Plante étudiée	Extrait (mg/ml)	Concentration minimale inhibitrice CMI (MI/ml)	
		Gram (+)	
		<i>Bacillus subtilus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Echium horridum</i> <i>Batt</i>			
<i>Les feuilles d'E horridum Batt</i>	Aqueux	46,68mg/ml	22,34mg/ml

D'après les résultats obtenus dans le tableau, nous avons remarqué que cette méthode confirme les résultats obtenus avec la méthode de diffusion sur disque. Nous avons constaté également que l'extrait aqueux est plus actif contre les bactéries (*Bacillus subtilus*) et (*Pseudomonas aeruginosa*) testées avec CMI variant entre 46,68mg/ml et 22,34mg/ml.

Par ailleurs, nous avons enregistré une étude faite par (Aye et al., 2004), qui a démontré l'activité antimicrobienne des extraits bruts d'*Echium vulgare* contre quelques microorganismes testés (*E. Coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*) avec des CMI > 1 mg/ml, ces résultats sont en accord avec les nôtres.

2. Tests d'hémolyse in vitro :

On a réalisé ce test car, même si une plante a un pouvoir antioxydant puissant et une activité antimicrobienne intéressante, elle ne pourra pas être utilisée en médecine traditionnelle et dans les préparations pharmacologiques en raison de son effet hémolytique, qui est un indicateur de cytotoxicité (Arbos et al., 2008; Çimen, 2008)

Le test de cytotoxicité est réalisé en utilisant des globules rouges d'un donneur sain et en bonne santé pour évaluer le taux d'hémolyse des globules rouges. Chaque concentration est évaluée en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée des globules rouges par hémolyse, les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 15**.

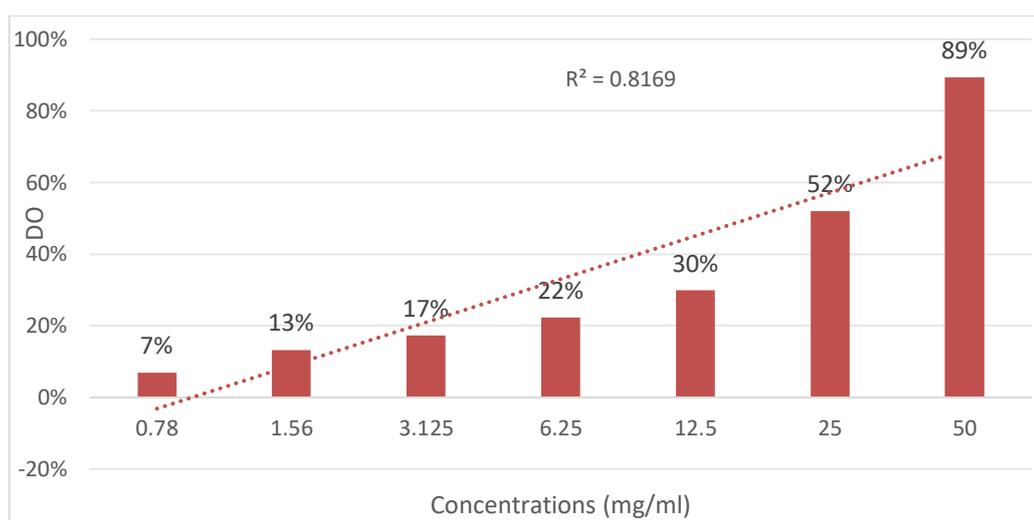


Figure 15 : Teste de cytotoxicité de l'extrait aqueux des feuilles d'*Echium horridum* Batt.

Selon nos résultats, il est démontré que l'extrait aqueux des feuilles d'*Echium horridum* Batt. contient un taux élevé d'hémolyse des globules rouges. Cet effet évolue et augmente de manière significative de la concentration la plus basse vers les plus élevées (0,069 mg/ml-0,894mg/ml) d'une manière dose dépendante.

Les composés phénoliques présents dans les feuilles d'*Echium horridum* Batt. ont un impact minimum sur l'hémolyse à une concentration faible de 0,069 mg/ml, mais leur effet hémolytique est significatif à une concentration de 0,894 mg/ml.

*Conclusion et
perspectif*

Aujourd'hui, de nombreuses plantes aromatiques et médicinales ont des propriétés biologiques très significatives qui sont utilisées dans différents domaines, notamment en médecine et en cosmétologie. Cet intérêt provient d'une part.

En raison de la disponibilité inépuisable des substances bioactives dans les plantes médicinales, les effets secondaires causés par les médicaments préoccupent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour leur organisme.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressées à l'étude des activités biologiques de la plante *Echium horridum* Batt..

Les résultats démontrent que les feuilles de la plante sont très riches en eau, et pour les dosages des composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et tanins) de l'extrait aqueux d'*E. horridum* Batt. La teneur des phénols totaux, et des flavonoïdes est variable

En ce qui concerne l'activité antioxydante, l'extrait aqueux des feuilles d'*Echium horridum* Batt. a montré un pouvoir antiradicalaire modérée ($IC_{50} = 1,66 \text{ mg/ml}$) comparée à l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0,09 \text{ mg/ml}$). Pour l'activité à réduire le fer (FRAP) l'extrait d'*Echium horridum* Batt. a montré une bonne capacité antioxydante.

Le test d'hémolyse a montré que les concentrations de cytotoxicité sont dépendantes des concentrations de l'extrait.

D'une autre part, l'activité antimicrobienne a été testée sur six souches bactériennes ainsi qu'une levure. Selon la méthode de diffusion sur disque. Les résultats ont montré une sensibilité de deux souches bactériennes pathogènes à savoir *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* avec des diamètres d'inhibition de 15 et 9 mm respectivement. Puis par méthode de microdilution sur milieu liquide dans déterminer les concentrations minimales inhibitrices CMI

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait aqueux d'*E. horridum* Batt. afin de mieux connaître, de valoriser et d'utiliser ces ressources dans le domaine thérapeutique. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives sont envisagées :

Varier les solvants afin d'extraire un maximum de composés phénoliques.

Tester plus d'activités biologiques

Élargir le panel des tests des activités *in vitro*, évaluer et tester les différents extraits et molécules isolées *in vivo* afin d'y trouver une application pharmaceutique de ces molécules actives, ou alors en conservation des produits destinés à la consommation.

Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives sont envisagées :

Variation des solvants afin d'extraire un maximum de composés phénoliques.

Tester plus d'activités biologiques.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

AIDOUD. A, SAMMOUDI. R., 2016. Plantes médicinales anti rhumatismales du Sahara Algérien. Mémoire de Master en Sciences Biologiques, Option Immunologie approfondie. Université 8 Mai 1945 - Guelma. p 9A

Arbos KA, Claro LM, Borges L, Santos CAM, Weffort-Santos AM, 2008. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*, 28(7): 457-463

Assem El-Shazly, Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium rauwolfii* and *Echium horridum* (Boraginaceae), *Zeitschrift fur Naturforschung*, 2014, V54, P (295-300).

B

Baba aissa, F.,(2000). Encyclopédie des plantes utiles. p2-3

BABA-AISSA F.,(2000)- Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Ed. EDAS, Alger. Algérie. 368 p.

BAHORUN T., GRESSIER B., TROTIN F., BRUNET C., DINE T., LUYCKX M., VASSEUR J., CAZIN M., CAZIN J. C., PINKAS M., 1996- Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn freshplant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*. Vol. (46):1086-1089

Bakkalia. F, Averbeck. S, Averbeck. D, Idaomar.M. Biological effects of essential oils A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46, (2008)

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

Belkhodja H., (2016). Effet des biomolécules extraites à partir de différentes plantes de la région de Mascara : Evaluation biochimique des marqueurs d'ostéo articulation et de l'activité biologique. Thèse de Doctorat LMD 3ème Cycle en sciences biologiques. Université de Mustapha Stambouli, Mascara

Bentabet –Iasgaa Nesrine 2015 étude phytochimique et évaluation des activités biologique de deux plante fredolia aritoides et *Echium Vulgar* de l'ouest Algerien thèse de doctorat en biologie cellulaire biochimie Universite Abou Bakr Belkaid Tlemcen , Algerie

Références bibliographiques

Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*, (9), 14 – 19.

BRAVO. L., 1998. Polyphénols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Journal of nutrition*, 56 (11), 317-333.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie- Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales, 1120.

Bulmus, V. (2003). A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of Controlled Release*, 93(2), 105–120.

C

Chaouche Tank Mohammed, 2009. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques (antioxydants et antibactériennes) des extraits de la plante d '*Echium pycnanthum* Pomel (Hemimch), Thèse de Magister. Université Abou-Bakr-Belkaïd Tlemcen, Alegria

Chaouche Tank Mohammed, 2014. contribution a l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales, Doctorat en biologie, Université Abou-Bakr-Belkaïd Tlemcen, Alegria.

Cheriti, A., Rahmani, S. & Belboukhari, N. (2016). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *Limoniastrum feei* (Plumbaginaceae).

Algerian Journal of Arid Environment "AJAE", 6(1), 80-86.

Çimen MYB, 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 390(1-2): 1-11.

Cowan MM, 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582.

D

DAI. J et MUMPER. R.J., 2010. Plant phenolic: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Journal of molecules*, 15, 7313-7352, ISSN: 1420-3049

Références bibliographiques

G

G. Yakhlef, Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle, Springer-Verlag France, 2011, V9(4), P (209-218).

GBIF | Global Biodiversity Information Facility,

https://www.gbif.org/img/full_logo_white.svghttps://www.gbif.org/ar/occurrence/map?taxon_key=4058830https://www.gbif.org/ar/occurrence/map?taxon_key=4058830, le 10 /05/2024.

GUIGNARD J. L 1998.botanique 10^{ème} Edition Masson.

GURIB-FAKIM A.,(2006)- Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine. Vol. (27): 1-93

H

Harborne JB, 1998. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis.Third Edition.

Hahn, M. W., Lunsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Hofle, M. G., Boenigk, J. et Stadler, P., (2003). Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. Appl. Environ. Microbiol. 69(3): 1442-1451.

Hanson P.M., Yang R., Wu J., Chen J., Ledesma D., Tsou S.C.S., Lee T.C. ; (2004). Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **129** : 704–711.

J

Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., Lee S.C. ; (2004). Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of griculture and Food Chemistry*, **52** : 3389-3393.

Joffin J.N., Leyral G, Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques. 3^{ème} Ed. Biologie Technique, 2001, Bordeaux.France.

Julkunen.R-Titto, 1985,"Phenolic constituents in the leaves of northem wiliows methods for the analysis of certain phenolics" *Journal of Agricultural and Food chemistry*, , Vol.(33), page : 213.

Références bibliographiques

K

Khadhr M., Bousta D., El Hajaji H., Lachkar M., Barkai H., Ibsouda-Koraichi S., Boukhchina S., (2017). Phytochemical screening, total phenolics and biological activities of Tunisian Peganum harmala seed extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 9 (2): 32-39.

Khali Mustapha, 2008, Effets de traitements simples et combinés sur la biologie et la biochimie de la datte en cours de la conservation, thèse de Doctorat d'état en sciences agronomiques, Institut National Agronomique_EL_ Harrach, Alger.

Kholkhal, F. (2014). Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*. *Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen*.

Kubola J, Siriamornpun S. (2008). Phenolic contents and antioxydant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food chemistry*, 110(4):881-8

L

LAOUINI. S., 2014. Etude phytochimique et activité biologique d'extraits des feuilles de *Phoenix dactylifera* dans la région du sud d'Algérie (la région d'Oued Souf). Thèse de doctorat en Chimie Industrielle, Option Génie chimique. Université Mohamed Khider - Biskra, pp 39-92

LABIOD. R., 2016. Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha* petals: activité antibactérienne, antioxydante et activité fongicide. Thèse de doctorat en Biochimie, Option Biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar - Annaba,

Liu L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H., Zeng X. ; (2009). Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kudingcha made from *Ilex Kudingcha* C.J. *Tesng. Food Chemistry*, 112 : 5-40

M

Références bibliographiques

Macheix J.J., Fleuriet A., Jay–Allemand C., (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed presses polytechnologiques et universitaires Romandes.

Mahmoud-Abdel-Aal, COMPARATIVE MACRO- AND MICROMORPHOLOGICAL STUDY OF ECHINUM HORRIDUM BATT. AND ECHINUM RAUWOLFII DEL.(BORAGINACEAE), Journal of Pharmaceutical Science, **1999**, V8, P 28-46.

MAURICE N., (1997)- L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. Ed. Tec et Doc, Paris. France. Pp 12-14.

Medi –Saric, M., Jasprica, I., Smolic-Bubalo, A., Mornar, A. (2004). Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. Original Scientific Paper, 77, (1–2), PP.361-366.

MISSAOUI. R., 2018. Extraction verte et caractérisation des molécules bioactives dans les coproduits de la production d'asperge (*Asparagus officinalis* L.). Mémoire du grade de Maitre de Science en Sciences et Technologie des aliments. Université Laval du Québec - Canada. p 25.

O

Olszowy M., Dawidowicz A.L. (2016). Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods. Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly. 147(12): 2083–2091.

P

Pękal A., Pyrzyńska K. (2015). Effect of pH and metal ions on DPPH radical scavenging activity of tea. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 66(1) : 58-62.

Q

Quezel, P. (1964). L'endémisme dans la flore de l'Algérie. Comptes rendus des séances de la Société de Biogéographie, 361, 137- 14

Références bibliographiques

R

RICHARD. A., 2012. Synthèse bibliographique de la phytothérapie et de l'aromathérapie appliquées à la dermatologie. Thèse du grade de Docteur Vétérinaire. Université Claude-Bernard, Lyon I - France. pp 22-31

S

SAIDI. I., 2019. Caractérisation et valorisation d'une plante de la famille des Fabaceae: *Gleditsia triacanthos* de la région de Sidi Bel Abbès: extraction des substances bioactives. Thèse de doctorat en Science biologique, Option Enzyme, Microorganismes et Bio-industries. Université Djillali Liabès – Sid Bel Abbès.

Sagdic, O.,Kuscu, A., Özcan, M., Özcelik, S. (2002) Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 19: 473-480

Simou Y., (2001). Mills, Evidence for the clinician a pragmatic framework for phytotherapy, *The European Phytojournal - ESCOP*, Issue 2

SEYOUM. A; ASRES. K; EL-FIKY. F.K., 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of nutrition*, 67, 2058-2070

SPARG. S.G; LIGHT. M.E; STADEN. V., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243

Singleton, V. and Rossi, J. (1965) Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

T

Teixeira da Silva 2004 Ribeiro, M. S., Da Silva, D. D. F. T., De Araújo, C. E. N., De Oliveira, S. F., Pelegrini, C. M. R., Zorn, T. M. T., & Zezell, D. M. (2004). Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. *Journal of clinical laser medicine & surgery*,

Tekwu EM, Pieme AC, Beng VP.; (2012). Investigations Of Antimicrobial Activity Of Some Cameroonian Medicinal Plant Extracts Against Bacteria And Yeast With Gastrointestinal Relevance. *Journal Of Ethnopharmacology*, **142** , 265-273.

Références bibliographiques

TOTY A A. 1, Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi- résistantes, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 2013, V 82, P 21.

V

VASSEUR J., CAZIN M., CAZIN J. C., PINKAS M., 1996- Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung.* Vol. (46): 1086-1089.

Véla, E. & Benhouhou, S. (2007). Evaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le bassin méditerranéen (Afrique du Nord). *Comptes Rendus Biologies*, 330, 589-605

VINCKEN. J.P; HENG. L; GROOT. A; GRUPPEN. H., 2007.Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Journal of phytochemistry*, 68, 275-297

Z

Zaika, L.L. Spices and Herbs: Their Antimicrobial Activity and Its Determination, *Journal of Food Safety*, 1988, V 9, P 97-118

ZEMMOURI. H., 2015. Etude des activités biologiques et effets comparatifs de *Borago Officinalis* et *Urtica dioica* sur l'inflammation bronchique dans un modèle d'asthme expérimental chez les rats de la souche wistar. Thèse de doctorat en Biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar – Annaba .

ANNEXES

Annexes

Annexe : préparation des milieux de culture

Mueller Hinton (MH) :

Dissoudre 38g de gélose mueller Hinton dans un 1 l d'eau distillé, faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, ensuite on mesure le ph jusqu'à 7,3. La solution obtenue est stérilisée pendant 20 min

Gélose Sabouraud :

Dissoudre 65 g de gélose Sabouraud dans un 1 l d'eau distillé, faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, ensuite on mesure le ph jusqu'à 5,6 .la solution obtenue est stérilisée pendant 20 min.

Bouillon nutritif (BN) :

Dissoudre 15 g de bouillon dans 1 l d'eau distillé, faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète. Ensuite on mesure le ph jusqu'à 7,5. La solution obtenue est stérilisée pendant 20 min.

Résumé

Les plantes sont utilisées depuis l'antiquité par l'homme pour traiter diverses maladies. Dans le cadre de la découverte de nouvelles molécules actives à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à la plante *Echium horridum* Batt. , qui appartient à la famille des Boraginacées. Cette espèce végétale présente des caractéristiques biologiques grâce à sa concentration en métabolites secondaires.

Dans un premier temps, nous avons procédé à la préparation de l'extrait aqueux à chaud , puis le dosage des différentes familles des métabolites secondaires prédominants (phénols totaux , flavonoïdes et tanins). Par la suite nous avons testé le pouvoir antioxydant, antimicrobien par la méthode de diffusion sur disque et hémolytique .

Les résultats obtenus ont montré que les feuilles de la plante sont riche en eau. Les dosages des composés phénoliques ont été réalisés sur l'extrait aqueux des feuilles qui s'est révélé riche en polyphénols. L'évaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant par le test de piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait aqueux des feuilles d'*E. horridum* Batt. possède une capacité modérée à piéger les radicaux libres avec IC50 de 1,66 mg/ml. L'évaluation de la capacité à réduire le fer a montré que l'extrait aqueux des feuilles d'*E. horridum* possède un pouvoir réducteur (EC50 = 0,464 mg/ml).

Concernant le test d'hémolyse les résultats montrent que les concentrations de cytotoxicité sont dépendantes des concentrations de l'extrait . Pour l'activité antimicrobienne L'extrait aqueux des feuille d'*E. horridum* a été testé sur six souches bactériennes ainsi qu'une levure selon la méthode de diffusion sur disque. Les résultats varient, avec des diamètres d'inhibition allant de 7 à 15 mm. Puis par méthode de micro- dilution sur milieu liquide afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices CMI, Les résultats ont montré que l'extrait aqueux est plus actif contre les bactéries (*Bacillus subtilis*) et (*Staphylococcus aureus*).

À travers ces résultats on conclue qu'*Echium horridum* Batt a un bon potentiel antioxydant et antimicrobien et peut être une alternative aux médicaments de synthèse.

Mot clés: *Echium horridum* Batt. , composés phénoliques, Activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité anti-hémolytique, métabolites secondaires.

Abstract

Plants have been used since antiquity by humans to treat various diseases. In the context of discovering new active molecules from natural sources, this research focused on the plant *Echium horridum* Batt, belonging to the Boraginaceae family. This plant species exhibits biological characteristics due to its concentration of secondary metabolites. Initially, we prepared a hot water extract and determined the levels of major secondary metabolite groups (total phenols, flavonoids, and tannins). Subsequently, we assessed antioxidant power, antimicrobial activity using disc diffusion method, and anti-hemolytic activity. The results showed that the plant leaves are rich in water. Phenolic compound assays were performed on the aqueous leaf extract, revealing richness in polyphenols. In vitro evaluation of antioxidant capacity using the DPPH radical scavenging test demonstrated that the aqueous extract of *E. horridum* Batt leaves has a strong ability to trap free radicals with an IC50 of 1.66 mg/ml. Evaluation of iron reducing power showed that the aqueous extract of *E. horridum* Batt. leaves possesses reducing power (EC50 = 0.464 mg/ml). Regarding the hemolysis test, the results indicated that cytotoxic concentrations depend on the extract concentration.

For antimicrobial activity, the aqueous leaf extract was tested against six bacterial strains and one yeast using the disc diffusion method. Results varied, with inhibition zone diameters ranging from 7 to 15 mm. Additionally, the minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using micro-dilution method in liquid medium, showing higher activity of the aqueous extract against bacteria (*Bacillus subtilis*) and (*Staphylococcus aureus*). Based on these findings, it is concluded that *Echium horridum* Batt has good antioxidant and antibacterial potential and could serve as an alternative to synthetic medicines

Keywords: *Echium horridum* Batt, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity, anti-hemolytic activity, secondary metabolites

المخلص

النباتات تُستخدم منذ العصور القديمة من قبل الإنسان لعلاج مختلف الأمراض. في إطار اكتشاف جزيئات نشطة جديدة من المصادر الطبيعية، كنا مهتمين في هذا العمل بنبات إشيوم هورديوم، الذي ينتمي إلى عائلة السلفيات. هذا النوع النباتي يتميز بخصائص بيولوجية بفضل تركيزه في الأيضيات الثانوية.

في المرحلة الأولى، قمنا بتحضير مستخلص مائي ساخن، ومن ثم قمنا بتقدير محتويات مختلف أسر الأيضيات الثانوية السائدة (الفينولات الكلية، الفلافونويدات، والتانينات). بعد ذلك، قمنا بتقييم القدرة المضادة للأكسدة، والمضادة للميكروبات باستخدام طريقة انتشار القرص، والمضادة للهيموليز.

أظهرت النتائج المحصلة أن أوراق النبات غنية بالماء. تم إجراء تقديرات للمركبات الفينولية على المستخلص المائي للأوراق، والذي أظهر غناه بالبوليفينولات. أظهر التقييم الفيترو للقدرة المضادة قدره 1.66 ملغ/مل. كما أظهر التقييم لقدرة IC50 أن المستخلص المائي لأوراق إشيوم هورديوم لديه القدرة على التقاط الراديكالات الحرة بـ DPPH للأكسدة باستخدام اختبار استقرار الراديكال (ملغ/مل = 0.464). تخفيض الحديد أن المستخلص المائي لأوراق إشيوم هورديوم لديه قدرة تخفضية.

بالنسبة لاختبار الهيموليز، أظهرت النتائج أن تراكيز السمية الخلوية تعتمد على تركيز المستخلص.

لنشاط المضاد للميكروبات، تم اختبار المستخلص المائي للأوراق على ستة سلالات بكتيرية وخميرة وفقاً لطريقة انتشار القرص. أظهرت النتائج تبايناً، حيث كانت أقطار التثبيط تتراوح بين 7 و 15 ، أظهرت النتائج أن المستخلص المائي أكثر نشاطاً ضد البكتيريا (باسيلوس سوبتيليس) MIC ملم. ثم تم تقييم التخفيف عن طريق التخفيف الدقيق في وسط سائل لتحديد التراكيز المثبطة الدنيا (*Staphylococcus aureus*).

استناداً إلى هذه النتائج، نستنتج أن إشيوم هورديوم لديه القدرة الجيدة على مكافحة الأكسدة والمضادة للبكتيريا، ويمكن أن يكون بديلاً للأدوية المصنعة بشكل اصطناعي.

الكلمات الأساسية:

، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للهيموليز، الأيضيات الثانوية *Echium horridum* Batt

