



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels  
LAPRONA

*MEMOIRE*

Présenté pour l'obtention du Diplôme de

*Magister en Biologie*

Option

*Substances naturelles, activités biologiques et synthèse*

par

M<sup>elle</sup> BOUGANDOURA Nabila

Thème

Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits  
d'espèces végétales *Satureja calamintha* (nabta)  
et *Ajugaiva* L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie.

Soutenu le /0/2011 devant le jury composé de :

M<sup>me</sup> ATIK-BEKKARA F. Professeur Présidente

M<sup>r</sup> ABDELOUAHID D.E. Professeur Examineur

M<sup>me</sup> BELARBI M. Professeur Examineur

M<sup>me</sup> BENDIMERADN. Maître de Conférences Encadreur

Année Universitaire : 2010-2011

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail, tout d'abord à mes parents qui m'ont soutenu  
tout au long de mes études par leur dévouement et abnégation.*

*À ma sœur et mes frères.*

*À ma nièce et mon neveu.*

# *Remerciements*

Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) de l'Université Abou Bakr BELKAID-TLEMCEN, sous la direction de madame BENDIMERAD Nassima

Je tiens particulièrement à remercier mon encadreur Madame BENDIMERAD N., Maître de Conférences au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, pour ses conseils, ses commentaires et sa bienveillance. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude pour m'avoir guidée et aidée tout au long de la réalisation de ce mémoire. Son dynamisme pour la recherche des produits naturels a été pour moi une source de motivation.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à madame ATIK-BEKKARA Fawzia, Professeur au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, et Chef de l'équipe «Etude des composés volatils (huiles essentielles) et des composés phénoliques (flavonoïdes) », au Laboratoire des Produits Naturels de l'Université de Tlemcen Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

J'exprime mes vifs remerciements à madame BELARBI Meriem, Professeur au département de Biologie et Vice Doyenne de la Post Graduation à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail malgré ses multiples occupations.

Que monsieur ABDELOUAHID Djamel Eddine, Professeur au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen trouve ici l'expression de ma gratitude pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Que madame BEKHECHI Chahrazed, Maître de Conférences et chef d'équipe au Laboratoire des Produits Naturels, trouve ici le témoignage de notre reconnaissance et notre obligeance pour toute l'aide fournie à la réalisation des analyses microbiologiques. Nous la remercions pour sa disponibilité, et l'importance qu'elle a accordée à notre recherche. Cela m'a évidemment marquée.

Je remercie vivement monsieur Benabadji Noury, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir identifié les espèces végétales étudiées.

Je tiens également à remercier les personnels de laboratoire de chimie inorganique en particulier : Hayat, Fouad, Djalila, Fatéma pour leur aide précieuse.

Je remercie M<sup>elle</sup> Malek Rachida, Mohammed, Belaid pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance, sans oublier tous ceux dont l'aide et les conseils m'ont été si utiles.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à tous mes collègues d'études et à tous les membres du Laboratoire des Produits Naturels LAPRONA.

## Liste des abréviations

Ac	: Acide
AcOEt	: Acétate d'éthyle
ATB	: Antibiotique
cc	: Concentré
CCM	: Chromatographie sur couche mince
cm	: Centimètre
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DO	: Densité optique
MeOH	: Méthanol
mg	: Milligramme
min	: Minutes
ml	: Millilitre
mm	: Milimètre
n-BuOH	: n- butanol
nm	: Nanomètre
OPC	: Oligomères ProCyanidoliques
PDA	: Potatose Dextrose Agar
Rf	: Rapport frontal
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
rpm	: Rotation par minute
UFC	: Unité formant colonie
UV	: Ultra-violet
[C]	: Concentration
µg	: Microgramme

# Résumés

## Résumé

L'étude des espèces *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* appartenant à la famille des Lamiaceae, a porté sur un screening phytochimique visant à caractériser les différentes familles de composés chimiques contenus dans les feuilles, puis l'extraction sélective des classes dont le test est positif. Deux extraits bruts secs ont été préparés à partir de ces deux espèces l'un organique méthanolique, l'autre aqueux. Les rendements sont de l'ordre de 8,58% et 22,19% respectivement pour *Satureja calamintha* et d'environ 6,43% et 25% respectivement pour *Ajuga iva*.

Le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes effectués sur ces extraits bruts ont été déterminés à partir des courbes d'étalonnage d'acide gallique et catéchine respectivement. Le rendement en tanins est supérieur à celui des saponosides dans les feuilles des deux espèces.

L'analyse par CCM des fractions de flavonoïdes et des tanins a permis de révéler la présence de la rutine, la catéchine et l'hydroquinone dans les feuilles de *Satureja calamintha*, et la quercétine, la catéchine le résorcinol et le pyrogallol dans les feuilles de *Ajuga iva*.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) et celle du piégeage de radical libre DPPH des extraits méthanolique et aqueux et des fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol a montré que l'ensemble de nos extraits possèdent un pouvoir antioxydant modéré en particulier les extraits méthanolique et la fraction d'acétate d'éthyle. Par ailleurs l'extrait aqueux de *Satureja calamintha* a présenté une remarquable activité vis-à-vis du radical libre DPPH.

L'effet antifongique des extraits méthanoliques des deux plantes est plus important que celui de l'extrait aqueux. Par ailleurs, nous avons constaté que les extraits méthanoliques et aqueux sont faiblement actifs sur les souches bactériennes.

**Mots clés :** *Satureja calamintha*, *Ajuga iva*, étude phytochimique, composés phénoliques, flavonoïdes, pouvoir antioxydant, pouvoir antimicrobien.

## الملخص

يندرج هذا البحث ضمن دراسة بعض ال نباتات من عائلة الشفوية (Lamiacées) فقد تم استخلاص المركبات الكيميائية الموجودة في أوراق النابطة (Satureja calamintha) والشندغورة (Ajuga iva). وتم تحضير المستخلصات العضوية الميثانولية و المائية حيث سجل مردود 8,58% و 22,19% على التوالي لكل من Satureja calamintha و حوالي 25% et 6,43% بالنسبة لنبات Ajuga iva. كما أمكن إجراء تحاليل كمية لالفينولات و الفلافونيدات بواسطة المنحنيات البيانية لحمض الغاليك و الكاتشين على التوالي. وتحديد مردود الدباغ كان مرتفعا مقارنة بالصابونوزيدات في أوراق كل من النباتات.

أظهر التحليل الكرماتوغرافي لمستخلصات الفلافونيدات والدباغ على الطبقة الرقيقة، وجود الروتين، الكاتشين و الهيدروكينون في أوراق النابطة. و بين التحليل أيضا وجود الكاتشين، الكارتسين، البيروغالول و الريزورسينول.

أثبتت دراسة النشاط المضاد للأكسدة المستعملة على كل من المستخلصات العضوية و المائية للنباتات من خلال طريقة إرجاع الحديد و تثبيط الجذر الحر DPPH نتائج ملموسة خاصة مستخلص الكحول الميثيلي و مستخلص خلات الإثيل. كما بينت النتائج أيضا أن المستخلص المائي للنابطة أظهر نشاطا معتبرا فيما يخص تثبيط الجذر الحر DPPH.

وبالنسبة للتجارب المضادة للفطريات، فقد بينت أن المستخلصات الميثانوليك للنباتين لها فعالية على مقاومة أغلب الفطريات المجهرية المستخدمة لهذا الغرض مقارنة مع المستخلصات المائية، و من جهة أخرى، تعد المستخلصات الميثانولية و المائية غير فعالة على مقاومة نمو البكتيريا.

**الكلمات المفتاحية:** Satureja calamintha، Ajuga iva، دراسة فيطوكيميائية، مكونات الفينولين،

الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة، مضادات مكروية

## Abstract

The study on species *Satureja calamintha* and *Ajuga iva*, belong to the Lamiaceae family on a phytochemical screening to characterizing the different families of chemical compounds in the leaves, in addition to the selective extraction of classes when the test is positive. Two dry methanolic and aqueous extracts were prepared from these two species. Yields are respectively 8,58% and 22,19% for *Satureja calamintha*, and 6,43% and 25% respectively for *Ajuga iva*.

Total phenols and flavonoids content of the dry extracts were determined by graphic display of gallic acid and catechin respectively. The yield of tannins was higher than that of saponins in the leaves of the two species.

Analysis of flavonoids and tannins extracts by thin layer chromatography allowed us to reveal the presence of rutin, catechol and hydroquinone in the leaves of *Satureja calamintha*. Within the leaves of *Ajuga iva* quercetin, catechol, resorcinol, and pyrogallol were identified.

The antioxidant activity of organic and aqueous extracts, ethyl acetate fraction and butanolic fraction were evaluated using two different methods, namely ferric reducing power (FRAP) and free radical scavenging activity (DPPH). The results showed that the various extracts have moderate activity, particularly, methanolic and ethyl acetate extracts. Besides the aqueous extracts of *Satureja calamintha* presented an average potent to DPPH radical-scavenging.

The antifungal activity of the methanolic extracts of the two species is more important than aqueous extract. Moreover, the methanolic and aqueous have lower activity towards bacterial species

**Key words:** *Satureja calamintha*, *Ajuga iva*, phytochemical study, phenolic components, flavonoids, antioxidant power, antimicrobial power.

# Table des matières

	Page
Remerciements .....	iii
Liste des abréviations .....	v
Résumés.....	vi
Table des matières .....	x
Liste des figures.....	xiv
Liste des tableaux .....	xvi
<b>Introduction générale</b> .....	<b>01</b>
<b>Chapitre I: Synthèse bibliographique</b>	
I. Présentation des plantes étudiées .....	06
I.1. Présentation de la famille des lamiaceae.....	06
I.1.1. Introduction .....	06
I.1.2. Systématique de lamiacées.....	06
I.2. La plante: <i>Satureja calamintha</i> subsp <i>nepeta</i> .....	07
I.3 La plante: <i>Ajuga iva</i> .....	10
II. Principales substances actives végétales.....	14
II .1.Les composés phénoliques.....	14
II.1.1. Définition .....	14
II.1.2. Les principales classes des composés phénoliques.....	14
II.1.3. Propriétés biologiques.....	17
II.1.4. Les flavonoïdes.....	19
II.1.5. Les tanins.....	24
II .2. Les composés terpéniques.....	25
II. 3. Les alcaloïdes.....	25
III. Les antioxydants .....	26
III.1. Généralités .....	26
III.2. Les antioxydants endogènes .....	27
III.3. Les antioxydants exogènes .....	27

## Chapitre II: Partie expérimentale

I. Matériel végétal.....	31
I.1. Origine géographique et période de récolte des plantes.....	31
I.2. Identification botanique.....	31
I.3. Préparation des échantillons.....	31
II. Tests phytochimiques .....	33
II.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud.....	33
II.1.1. Amidon .....	33
II.1.2. Saponosides .....	33
II.1.3. Les tanins .....	34
II.1.4. Les anthraquinones .....	34
II.2. Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol.....	34
II.2.1. Les flavonoïdes .....	34
II.2.2. Les alcaloïdes sels.....	34
II.2.3. Les tanins .....	35
II.2.4. Les anthracénosides, les coumarines et les anthocyanosides.....	35
II.2.5. Les stérols et Stéroïdes.....	36
II.2.6. Les composés réducteurs .....	36
II.3. Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique .....	37
II.3.1. Les huiles volatiles.....	37
II.3.2. Les acides gras .....	37
II.3.3. Les alcaloïdes bases .....	37
II.4. Réactifs et réactions de caractérisation .....	38
III. Extractions sélectives et dosage .....	38
III.1. Extraction des composés phénoliques .....	38
III.1.1. Préparation des extraits bruts secs .....	38
III.1.2. Calcul du rendement.....	39

III.1.3. Dosage des phénols totaux .....	39
III.1.4. Dosage des flavonoïdes .....	40
II.1.5. Extraction des fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes .....	40
III.1.6. Analyse de la composition chimique des extraits bruts secs et des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes par CCM .....	41
III.1.7. Extraction des tanins.....	41
III.2. Extraction des saponosides.....	43
III.2.1. Protocole d'extraction.....	43
III.2.2. Calcul du rendement.....	43
IV. Pouvoir antioxydant .....	43
IV.1. Méthode de la réduction du fer FRAP.....	43
IV.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH .....	44
V. Pouvoir antimicrobien .....	45
V.1. Provenance des germes étudiés .....	46
V.2. Antibiotique et antifongique utilisés.....	46
V.3. Pouvoir antimicrobien des extraits aqueux et méthanolique des feuilles de Satureja calamintha et Ajuga iva .....	43
V.3.1. Méthode d'étude du pouvoir antibactérien des extraits.....	47
V.3.2. Méthodes d'études du pouvoir antifongique des extraits .....	48
V.4. Préparation des inoculums.....	49
V.4.1. Bactéries .....	49
V.4.2. Moisissures .....	49
V.5. Milieux de culture utilisés .....	49
<b>Chapitre III: Résultats et discussion</b>	
I. Tests phytochimiques.....	51
II. Extraction et dosage des composés phénoliques .....	53
II.1. Rendement en extraits bruts secs .....	53
II. 2. Teneur des extraits bruts en phénols totaux .....	54

II.3. Teneur des extraits bruts méthanolique et aqueux en flavonoïdes .....	55
II.4. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par CCM .....	57
III. Extraction des tanins.....	62
III. 1. Rendement en tanins.....	62
III.2. Résultats de la chromatographie sur couche mince.....	63
IV. Extraction des saponosides.....	65
V. Pouvoir antioxydant des extraits de <i>Satureja calamintha</i> et <i>Ajuga iva</i> .....	58
V.1. Méthode de la réduction de fer (FRAP) .....	66
V.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) .....	69
VI. Pouvoir antimicrobien .....	75
VI.1. Pouvoir antimicrobien de l'antibiotique.....	75
VI.2. Pouvoir antimicrobien de l'antifongique .....	76
VI.3. Pouvoir antimicrobien des extraits .....	77
VI.3.1. Pouvoir antibactérien des extraits.....	77
VI.3.2. Pouvoir antifongique des extraits .....	78
<b>Conclusion générale</b> .....	81
<b>Références bibliographiques</b> .....	85
<b>Annexes</b>	

## Liste des figures

Figure 1 : Photo de <i>Satureja calamintha</i> subsp. <i>nepeta</i> (L.) Briq .....	7
Figure 2 : Photo de <i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb.....	11
Figure 3 : Structures de quelques composés diterpénoïdes et phytoecdystéroïdes .....	13
Figure 4 : Classification des polyphénols.....	15
Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes .....	19
Figure 6 : Les principales classes de flavonoïdes.....	20
Figure 7 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes .....	22
Figure 8 : Situation géographique des stations d'étude.....	32
Figure 9: Rendements (%) en extraits bruts étudiées .....	53
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	54
Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la catéchine .....	56
Figure 12: Photo de chromatogramme résultant de l'analyse des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes par le système solvant 1 .....	58
Figure 13 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes par le système solvant 2 .....	58
Figure 14 : Rendement en (%) des tanins des espèces étudiées .....	63
Figure 15 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse des extraits tanniques des deux espèces par chromatographie sur gel de silice.....	64
Figure 16 : Rendement (%) en saponosides des espèces étudiées.....	66
Figure 17 : Pouvoir réducteur des quatre extraits de l'espèce <i>Satureja calamintha</i> .....	67
Figure 18 : Pouvoir réducteur des quatre extraits de l'espèce <i>Ajuga iva</i> .....	67
Figure 19 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	69
Figure 20 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique .....	69
Figure 21: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique et aqueux de <i>Satureja calamintha</i> .....	71
Figure 22: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations de la phase d'acétate d'éthyle et n-butanol de <i>Satureja</i> <i>calamintha</i> .....	71

Figure 23: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique et aqueux de Ajuga iva.....	72
Figure 24: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations de la phase d'acétate d'éthyle et n-butanol de Ajuga iva .....	72
Figure 25 : Diamètre des zones d'inhibition de ciprofloxacine relatif aux différentes souches bactériennes.....	76
Figure 26: Pourcentage d'inhibition de la Nystatine relatif aux souches fongiques .....	76
Figure 27 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des extraits aqueux et méthanoliques relatives aux différentes souches bactériennes.....	77
Figure 28 : Pourcentage d'inhibition des extraits de Satureja calamintha et Ajuga iva relatif aux différentes souches fongiques.....	78

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques.....	16
Tableau2 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques .....	18
Tableau 3 : Liste des principaux radicaux libres .....	26
Tableau 4 : Exemples d'antioxydants retrouvés dans les aliments .....	29
Tableau 5 : Situation géographique des stations de récolte.....	31
Tableau 6: Provenance des germes étudiés .....	46
Tableau 7: Caractéristiques de l'antibiotique et de l'antifongique utilisés .....	47
Tableau 8: Résultats des tests phytochimiques sur les feuilles de Satureja Calamintha Ajuga iva .....	52
Tableau 9 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits méthanoliques et aqueux des espèces étudiées.....	55
Tableau 10: Teneurs en flavonoïdes dans les extraits méthanoliques et aqueux des espèces étudiées.....	56
Tableau 11 : Tableau comparatif des teneurs en flavonoïdes.....	57
Tableau 12: Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïques des feuilles de Satureja calamintha et Ajuga iva.....	59
Tableau 13: Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïques des feuilles de Satureja calamintha et Ajuga iva.....	60
Tableau 14 : Les Résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques.....	61
Tableau 15 : Les Résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques par le système solvant 1 .....	61
Tableau 16 : Les composés mis en évidence dans le système 1.....	62
Tableau 17: Rendement (%) en tanins des différentes espèces de lamiacées .....	63
Tableau 18 : Rf des différents étalons utilisés.....	64
Tableau 19 : les composés mis en évidence dans les deux espèces étudiées .....	65
Tableau 20 : Valeurs des IC <sub>50</sub> et le pouvoir antiradicalaire (ARP) des différents extraits des deux plantes .....	73
Tableau 21: Comparaison des valeurs de IC <sub>50</sub> des différentes espèces de la famille de Lamiacées .....	74

Tableau 22 : Les valeurs de diamètre des zones d'inhibition (mm) des extraits Acétatique et butanolique de <i>Satureja montana</i> relatives aux souches bactériennes testées.....	78
--	----

# Introduction générale

L'Algérie recèle d'un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes : on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines : industrie alimentaire, conserverie, pharmaceutique, et phytothérapie (**Duraffourd et al., 1997**).

A l'instar des autres régions d'Algérie, Tlemcen possède un patrimoine très riche en plantes vertueuses, 275 espèces de plantes médicinales appartenant à différentes familles ont été recensées et identifiées dont les plus utilisées et vendues par les herboristes sont : le thym, l'armoise, et la verveine (**Loukkas, 2006**).

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine de nos grands parents, malgré l'important développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies souvent mortelles. Environ 80% de la population mondiale profite des apports de la médecine traditionnelle à base des plantes reconnaissant ainsi les savoirs empiriques de nos ancêtres (**EL Rhaffari et Zaid, 2004**).

En effet, les plantes possèdent des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines,...) et peuvent, selon des techniques chimiques (extraction, distillation,...), permettre l'isolation du principe actif pour l'utiliser en pharmacie. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (**Duraffourd et al., 1997**),

De multiples études, certes dispersées, portent sur la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les huiles essentielles qui ont des intérêts multiples mis en faveur de l'industrie agroalimentaire (additifs, colorants, arômes, agents de conservation) et pharmaceutique, malheureusement l'exploitation et la valorisation de ces ressources naturelles reste très limitée et très artisanale.

Toutefois, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydantes et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connues dans la médecine.

Pour cela notre laboratoire et principalement notre équipe de recherche s'intéresse de très près à la chimie et aux activités antimicrobiennes et antioxydantes dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des produits naturels (**Bendimerad et al., 2005 ; Bekhechi et al., 2007 ; Bendimerad et al., 2007 ; Benhammou et al., 2007 ; Atik Bekkara et al., 2008 ; Benhammou et al., 2008 ; Belarbi-Benmehdi et al., 2009 ; Bendimerad et al., 2009 ; Bekhechi et al., 2010 ; Benabadji et al., 2010 ; Mazari et al., 2010**).

Le présent travail rentre dans le vaste cadre de la recherche de nouvelles substances naturelles extraites du règne végétal, et l'étude de leurs activités biologiques, antioxydantes et antimicrobiennes.

C'est dans cette optique que notre étude a été scindée en trois parties :

- La première partie, est une synthèse bibliographique qui résume les principales caractéristiques des deux espèces sélectionnées appartenant à la famille de lamiacées, *Satureja calamintha* et *Ajuga iva*, des effets thérapeutiques de chacune d'elles, et des substances actives végétales.
- La deuxième partie du travail est expérimentale, elle est consacrée à :
  - La détermination des différentes classes chimiques par criblage phytochimique.
  - Extraction sélective des familles prépondérantes notamment les composés phénoliques, les tanins et les saponosides.
  - Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes
  - Préparation et détermination des rendements des extraits bruts secs aqueux et méthanolique.
  - Extraction des fractions flavonoïdiques : fraction d'acétate d'éthyle et n-butanol
  - Analyse de la composition chimique des extraits bruts sec méthanolique, aqueux et des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes ainsi que les tanins par chromatographe sur couche mince.

- L'évaluation in vitro de l'effet antioxydant des extraits méthanolique, aqueux, acétatique et butanolique correspondantes aux deux plantes selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH et celle de la réduction de fer.
- L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits organiques et aqueux vis-à-vis de quatre souches bactériennes et trois souches fongiques.
- Dans la troisième partie, nous discutons les résultats obtenus lors de cette étude et notre travail est achevé par une conclusion et des perspectives.

# CHAPITRE I

## Synthèse bibliographique

## **I. Présentation des plantes étudiées**

### **I.1. Présentation de la famille des lamiaceae**

#### **I.1.1. Introduction**

La famille des Lamiacées (Lamiaceae) ou Labiées (Labiatae) est une importante famille de plantes dicotylédones, qui comprend environ 4000 espèces et près de 210 genres (Naghibi et al., 2005), dont deux sont étudiés dans ce présent travail : Satureja et Ajuga. Cette famille comporte de nombreuses plantes exploitées pour les essences ou cultivées pour l'ornementation et la plupart de ces espèces sont aussi bien utilisées dans la médecine traditionnelle que dans la médecine moderne (Judd et al., 2002).

La famille des lamiacées contient une très large gamme de composés comme les terpénoïdes, les iridoïdes, les composés phénoliques, et les flavonoïdes. Les huiles essentielles et plus précisément les courtes chaînes des terpénoïdes sont responsables de l'odeur et la saveur caractéristique des plantes (Naghibi et al., 2005).

#### **I.1.2. Systématique de lamiacées**

C'est une famille très importante dans la flore d'Algérie, ces espèces sont souvent des plantes herbacées, ou sous-arbrisseaux à poils glanduleux, en général aromatiques. Leur tige est carrée, certaines espèces sont dressées, d'autres couchées portent des feuilles opposées ou verticillées. Les fleurs bisexuées, irrégulières, groupées à l'aisselle des feuilles en inflorescences plus ou moins allongées ou en inflorescences terminales plus ou moins denses, à calice tubuleux ou en cloche persistant, à corolle à tube très développé, ordinairement caduque et à 2 lèvres (rarement 1). Le fruit sec se séparant en quatre articles contenant chacun une graine (Guignard, 1998).

La classification des lamiacées selon Quezel et Santa, (1963) :

Règne : Végétal

Embranchement : Phanérogames

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicotylédones

Sous classe : Gamopétales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

## **I.2. La plante : Satureja calamintha**

Le nom « Satureja » vient du mot latin "saturare" = nourrir ou "satura" = pot à fleur (ornemental). Il existe plusieurs espèces, tous sont remarquables par leur odeur forte et aromatique, qui rappelle celle de la menthe (**Vârban et al., 2009**).

### **I.2.1. Nomenclature de la plante**

Nom commun : Sarriette, baume sauvage, pouliot de montagne.

Nom botanique : Satureja calamintha subsp. nepeta (L.) Briq.

Synonyme: Calamintha nepeta

Nom vernaculaire : Nabta, ketéya, menta.

### **I.2.2. Description botanique**

C'est une petite plante vivace qui ne dépasse pas 40 cm de haut au parfum mentholé. Les tiges sont molles et velues, elles portent des feuilles opposées, à pétiole moyen, légèrement dentées. Les fleurs, visibles de juillet à octobre, d'un joli rose ou pourpres, sont groupées sur un pédoncule commun par deux ou trois (**figure 1**). Le fruit est formé de quatre akènes ovales et lisses (**Baba Aissa, 2000**)

**Genre :** Satureja

**Espèce :** calamintha



**Figure 1 : Photo de Satureja calamintha subsp. nepeta (L.) Briq.**

### **I.2.3. Distribution géographique et habitat**

Le pouliot de montagne pousse à l'état sauvage en Asie, en Europe, et notamment dans le bassin méditerranéen (**Grualbo et al., 1993**).

On le rencontre dans les sous-bois mais aussi sur les terrains incultes, le bord des routes et dans le tell, surtout en montagne, jusqu'à 1500 mètres d'altitude (**Quezel et Santa, 1963**).

### **I.2.4. Effets et usages thérapeutiques**

*Satureja calamintha* est une excellente plante médicinale utilisée par la population locale sous forme de décoction pour traiter la flatulence, l'indigestion et les infections respiratoires bénignes. Cette espèce constitue un bon remède contre la toux et le rhume, souvent mélangée à d'autres plantes, comme le thym (*Thymus vulgaris*), elle favorise la sudation et fait baisser la fièvre.

*Satureja calamintha* est une espèce végétale connue par ses propriétés carminatives, toniques, antispasmodiques, sudorifiques et stomachiques (**Baba Aissa, 2000 ; Lamendin, 2007**).

### **I.2.5. Travaux antérieurs**

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur le genre *Satureja* qu'est caractérisé par la présence des huiles essentielles, des flavonoïdes, des tanins, des acides phénols (acide rosmarinique, acide caféïques) et des saponines (**Vârban et al., 2009**)

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* récolté au Maroc a permis de déterminer la teneur la plus élevée en huile essentielle 1,60% pour *Satureja calamintha* et 1,24 % pour *Satureja alpina*. Les huiles essentielles de *Satureja calamintha* sont caractérisées par la présence du p-cymène (20,9 %), du  $\gamma$ -terpinène (18,7 %) et du thymol (34,9 %) comme principaux constituants chimiques, alors que les huiles essentielles de *Satureja alpina* sont formées en majorité par le limonène (11,9 %), l'isomenthone (7,3 %), le néomenthol (6,5 %), la pulégone (25,1 %), la carvone (18 %) et l'acétate de thymol (15,3 %) (**Satrani et al., 2001**).

**Fransisco et al., (1988)** ont isolé des flavones lipophiles, 5,6,4'-trihydroxy-7,8,3'-triméthoxyflavone (thymonine), et 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone de tissus superficiels des feuilles de 24 genres appartenant à la famille des lamiaceae y compris le *Satureja*.

L'étude de quelques espèces du genre *Satureja* rapporte que *Satureja Salzmannii* renferme le 5,6-dihydroxy-7,3',4'-triméthoxyflavone, le 5,6, 4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone et la naringénine dans l'espèce *Satureja thymbra*. Alors que, l'espèce *Satureja hortensis* quant à elle contient une quantité importante d'acide rosmarinique (34 mg g<sup>-1</sup>), d'acide caféique, des flavonoïdes glycosides et ainsi que des aglycones libres comme la lutéoline (30 mg g<sup>-1</sup>) (**Ildiko et al., 2009**).

**Gohari et al., (2010)** ont isolé quatre flavonoïdes à partir de la partie aérienne de d'une autre espèce *Satureja Atropatana* Bonge: le 5,6',3'trihydroxy-7,8,4'-triméthoxyflavone ; le 5,6-dihydroxy-7,8,3',4' tetraméthoxyflavone ou le 5-desméthoxynobiletine ; le 5,6,4'-trihydroxy-7,8,3'-triméthoxyflavone ou thymonine et lutéoline.

Des études biologiques ont montré que les huiles essentielles de *Satureja calamintha*, *Satureja hortensis*, *Satureja thymbra*, possèdent une activité antimicrobienne due principalement à la présence du thymol, du carvacrol et de l'alpha-terpinéol (**Satrani et al., 2001 ; Gören et al., 2004 ; Mihajilov-Krstev et al., 2009**).

D'autre part, **Michaelakis et al. (2007)** ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja spinosa* L., *Satureja parnassica* subsp. *parnassica* Boiss., *Satureja thymbra* et *Satureja montana* récolté en Grèce, ainsi que leur activité insecticide vis-à-vis de *Culex pipiens*.

En outre, **Hernandez et al. (2000)** rapportent que l'extrait des flavonoïdes de *Satureja parvifolia* poussant à l'état spontané en Argentine, a présenté une activité inhibitrice sur la croissance des microorganismes à Gram positif et à Gram négatif.

**Ćetković et al., (2007)** ont montré que l'extrait à l'éther de pétrole de l'espèce *Satureja montana* L. subsp. *Kitaibelii* présente une bonne activité antimicrobienne et aucune activité antioxydante.

**Mchedlishvili et al., (2005)** ont montré que les flavonoïdes isolés à partir de *Satureja hortensis* ont des propriétés hypolipidémiques.

### **I.3. La plante : *Ajuga iva***

Le nom *Ajuga* vient du mot latin "Jugum": joug. Avec le suffixe "a": sans joug, du fait que la corolle est dépourvue de lèvre supérieure. *Iva*, est un ancien nom féminin latin qui est utilisé pour la première fois pour cette plante (**Ghedira et al., 1991**). Le genre *Ajuga* comprend environ 40-50 espèces herbacées annuelles et vivaces (**El Hilaly et al., 2004**).

#### **I.3.1. Nomenclature de la plante**

Nom commun : Bugle Ivette, Ivette-musquée

Nom botanique : *Ajuga iva* (L.) Schreb.

Synonyme : *Ajuga iva* subsp. *iva*, *Ajuga humilis*, *Ajuga moschata*, *Teucrium iva* L.

Nom vernaculaire : Chendgoura.

Nom anglais : Musky Bugle

Nom maltais : Xantkura

#### **I.3.2. Description botanique**

C'est une petite plante vivace de 6-20cm de hauteur, ligneuse à la base, velue-blanchâtre, à odeur de musc ; tiges étalées-diffuses, rameuses, très feuillues ; feuilles sessiles, linéaires-lancéolées, enroulées aux bords, entières ou un peu dentées au sommet ; fleurs purpurines de 15mm, 2-4 par verticille à l'aisselle des feuilles (**figure 2**) ; calice velu-laineux, à dents triangulaires, lancéolées, plus courtes que le tube (**Girre, 2001**).

**Genre :** Ajuga

**Espèce :** iva



**Figure 2 : Photo de Ajuga iva (L.) Schreb.**

### **I.3.3. Distribution géographique et habitat**

L'ivette musquée pousse à une altitude de 0 à 1600 mètres, dans les régions arides où elle croît dans les champs. Elle est commune dans la région méditerranéenne, très répandue dans les pelouses et les forêts du Tell algérien. La floraison de la plante est d'avril à octobre (**Baba Aissa, 2000**).

### **I.3.4. Effets et usages thérapeutiques**

Ajuga iva est une plante utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne contre le diabète, elle est connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antirhumatismales, hypoglycémiantes, antispasmodiques, antifongiques (**Bondm et al., 2000**). C'est une plante astringente, qui assèche les écoulements et qui facilite la cicatrisation. Elle est recommandée aussi pour guérir les ulcères, les plaies et les blessures (**Baba Aissa, 2000**).

Elle est utilisée sous forme d'infusion pour les troubles gastro-intestinales (faire infuser 5 grammes de la plante séchée dans une tasse à thé d'eau bouillante pendant 15 minutes, et filtrer ; prendre 3 tasses de tisane par jour).

### I.3.5. Travaux antérieurs

Une activité inhibitrice sur la croissance des larves *Spodoptera frugiperda* et *Spodoptera littoralis* dans l'extrait éthanolique de *Ajuga iva* issue de la région de Ain Mila (Algérie) a été prouvée. Cette activité peut être attribuée à la présence de deux épimères diterpénoides ivain IV et 14,15-dihydroajugapitin (**figure 3**) (**Bondm et al., 2000**).

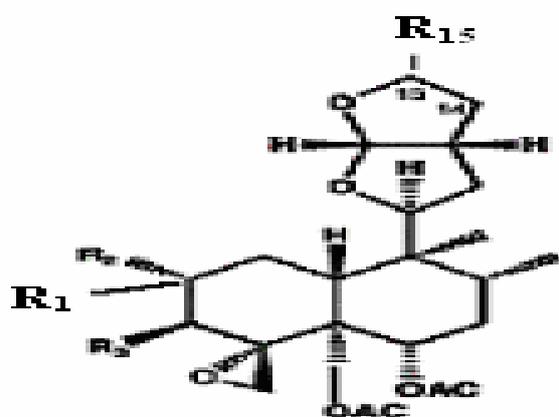
**Bennaghmouch et al. (2001)**, ont isolé à partir de l'espèce *Ajuga iva* sept aglycones flavoniques (quercétine, lutéoline, chrysoériol, 5,5'-dihydroxy 7,4'-diméthoxyflavone, 5,7-dihydroxy 4',5'-diméthoxyflavone, apigénine, naringénine).

**En 2007, Coll** a isolé à partir des feuilles *Ajuga iva* deux nouveaux composés : 24-Hydroxycyastérone et ajugastérone B et il a identifié par l'analyse spectrale RMN les structures des composés phytochimiques suivants : cyastérone, 20-hydroxyecdysone, makistéron A et le 24, 25 didehydroprécycastérone (**figure 3**).

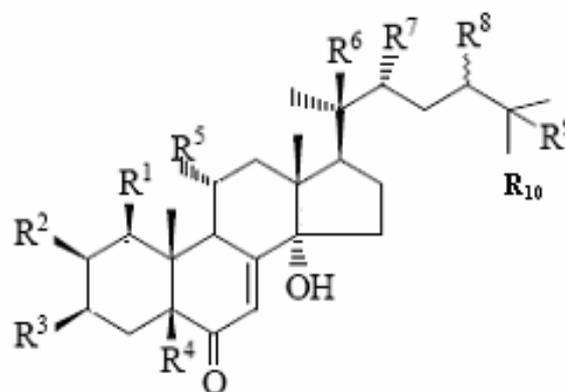
Le screening pharmacologique réalisé *in vivo* et *in vitro* démontre que *Ajuga iva* est douée d'un large spectre d'activités pharmacologiques; elle est antihypertensive; vasodilatatrice (**El-Hilaly et al., 2004**) diurétique et hypoglycémique (**Taleb-Senouci, 2008**).

**Hamden et al. (2008)** ont montré aussi que l'extrait aqueux de *Ajuga iva* possède un effet hypolipidémiant et antioxydant, il exerce une action contre la peroxydation lipidique des tissus chez les rats diabétiques.

D'autre part, **Bouderbala et al. (2008)** ont testé l'effet des iridoïdes extraites de l'extrait aqueux de *Ajuga iva* sur la composition des lipoprotéines et sur l'activité de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) chez les rats rendus hypercholestérolémiques. Ces molécules agissent efficacement sur l'efflux du cholestérol des tissus périphériques vers le foie en augmentant l'activité de la LCAT et atténuent l'hypercholestérolémie causée par le régime enrichi en cholestérol alimentaire.



Diterpénoïdes



Phytoecdystéroïdes

Diterpénoïdes	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_{15}$	$C_{14}-C_{15}$
Ivain IV	H	OH	EtCH(Me)COO	H	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2$
14,15-dihydroajugapitin	H	OH	EtCH(Me)COO	H	$\text{CH}_2-\text{CH}_2$

Phytoecdystéroïdes	$R_8$	$R_9$	$R_{10}$	$R_1=R_4=R_5$	$R_2=R_3=R_6=R_7$
Ajugastérone B	$\text{CH}_2\text{CH}_3$	$\text{CH}_2$ OH	$\text{C}=\text{CH}_2$	H	OH
Makistéron A	$\text{CH}_3$ ( $\alpha$ )	OH	$\text{CH}_3$	OH	OH

Figure 3 : Structures de quelques composés diterpénoïdes et phytoecdystéroïdes

## II. Principales substances actives végétales

Chaque espèce végétale contient un certain nombre de substances, lesquelles procèdent de métabolisme et s'élaborent comme produit secondaire.

Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, on recense plusieurs milliers de métabolites (au moins 30000 structures caractérisées) et sont classées selon leur appartenance chimique (**Judd, 2002**). Parmi ces substances on trouve les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les huiles essentielles et les alcaloïdes qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

### II .1. Les composés phénoliques

#### II.1.1. Définition

Ce sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimate et celle de l'acétate (**Bruneton, 1999**).

La diversité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine synthétique, et elle augmente souvent avec la participation simultanée du shikimate et l'acétate conduisant à l'élaboration de composés mixtes (flavonoïdes, stibène, xanthonés, etc.). Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés dans les plantes et dans les aliments d'origine végétale (**figure 4**).

#### II.1.2. Les principales classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (**Bruneton, 1999**). Les différentes classes de ces composés phénoliques, et les plantes qui les renferment sont représentées dans le tableau 1.

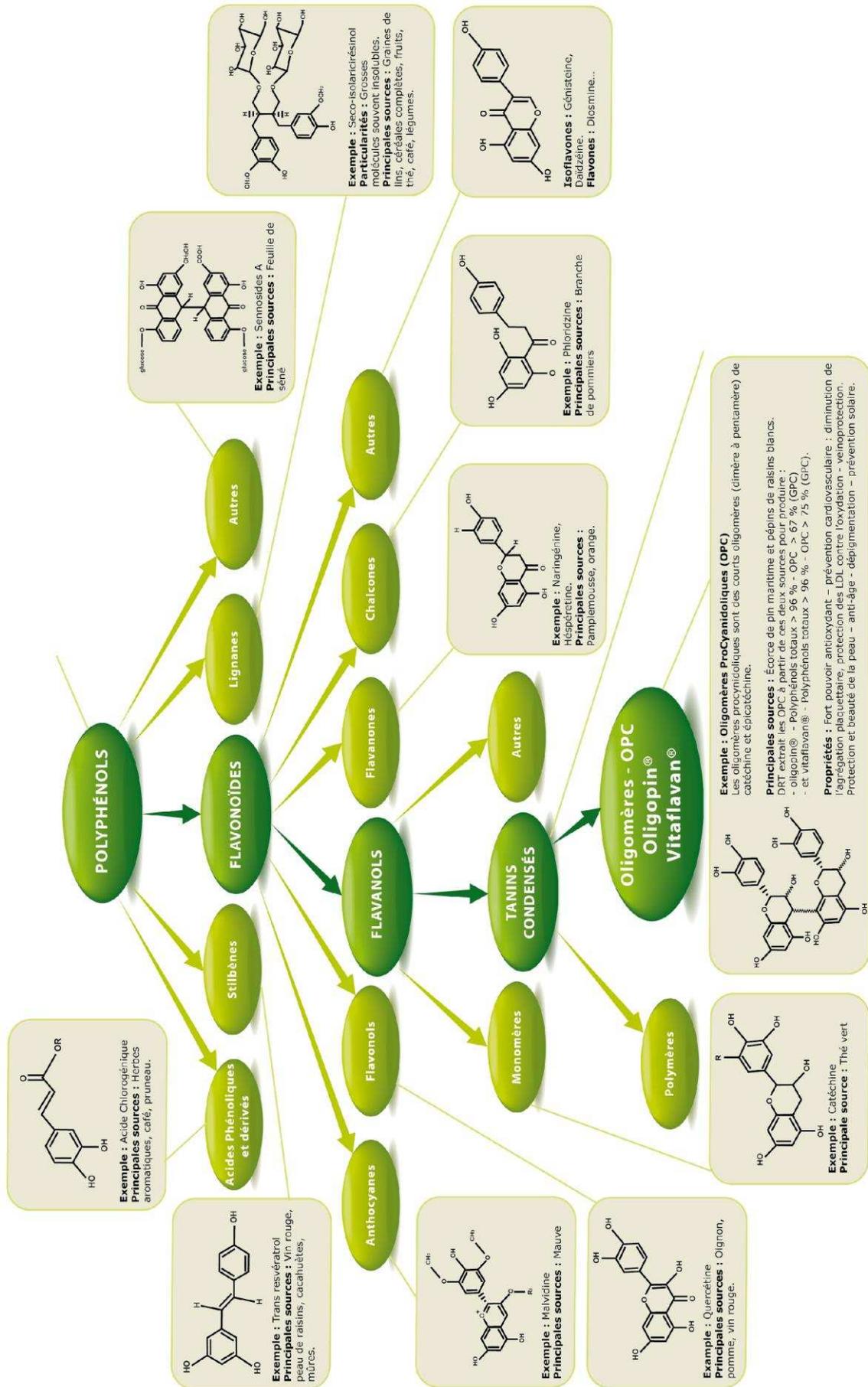


Figure 4 : Classification des polyphénols

**Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques (Bruneton, 1999 ; Hennebelle, 2006).**

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemples	Plantes
6	C6	Phénols simples	Cathécol, hydroquinone	Busserole
7	C6-C1	Acides phénols benzoïques	Ac. gallique, Ac. salysalique, vanilline	Artichaut Saule
8	C6-C2	Acétophénones	3-acétyl6-méthoxybenzaldehyde	Saule
9	C6-C3	Acides phénols cinnamiques	Ac. coumarique, Ac.caféique	Romarin Marronnier d'inde
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine	Drosera spp.
13	C6-C1-C6	Xanthones	Bellidifoline, mangoctine	Racine de gentiane, Centaurée
14	C6-C2-C6	Stiblènes	Hydrangéol, Pinosylvine	Raisin, pin
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine Roténoïde	Ginkgo Thym Camomille
18	(C6-C3)2	Lignanes	Matairésinol	Chardon
30	(C6-C3-C6)2	Bi flavonoïdes	Amentoflavone Hinokiflavone	Carcinia Hypericum
n	(C6-C3-C6)n	Tanins condensés (proanthocyanidols)	Aesculitanins	Marronnier d'inde, vigne

### II.1.3. Propriétés biologiques

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique.

Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules. Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT). Les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine (**Bounatirou et al., 2007**).

Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries (**Makoi et Ndakidemi, 2007**).

Les pigments non azotés sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent l'attention des insectes pollinisateurs, ou servent au contraire à dessiner les formes pour éloigner les prédateurs. D'autre sont des inhibiteurs d'enzymes et interviennent dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies (**Bruneton, 1999**).

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton, 1999**).

Le tableau 2 illustre les rôles attribués aux différentes classes de polyphénols.

**Tableau 2 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques (Bruneton 1999 ; Hennebelle, 2006).**

<b>Composés phénoliques</b>		<b>Activité biologique</b>
<b>Ac. Phénols</b>	Ac. cafeïque	Antibactérienne
	Ac. salicylique	Antifongique, antioxydante
<b>Tanins</b>	Tanin gallique	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, antidiarrhéique , effet antiseptique , effet vasoconstricteur
	Proanthocyanidine	
<b>Flavonoïdes</b>	Lutéoline	Antitumorale, anticarcinogène, anti -inflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur diurétique.
	Catéchine	
	Hespéridine	
	Quercétine	
	Naringénine	
<b>Coumarines</b>	Dicoumarol	Anticoagulant, antioxydant, protectrice vasculaire et antioedémateuse

## II.1.4. Les flavonoïdes

### II 1.4.1. Définition

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal (Ghedira, 2005), qui sont caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols (Toufektsian et al., 2008).

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes (figure 5) peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (Beecher, 2003 ; Williams et Grayer, 2004 ; Kueny-Stotz, 2008).

### II 1.4.2. Structure chimique et classification

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone constitués de deux cycles phényles, les cycles A et B, reliés par une chaîne à trois carbones (structure en C6-C3-C6). La chaîne en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisée pour former le cycle C (Bruneton, 1999).

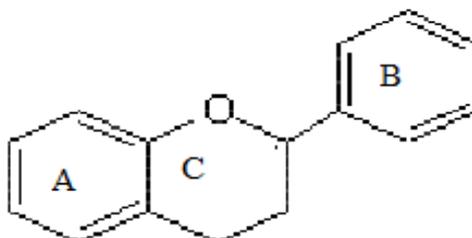
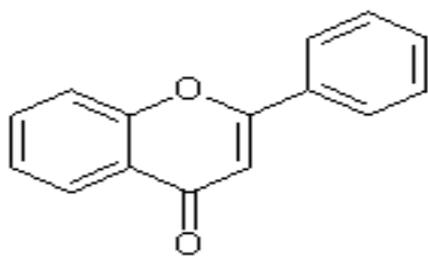


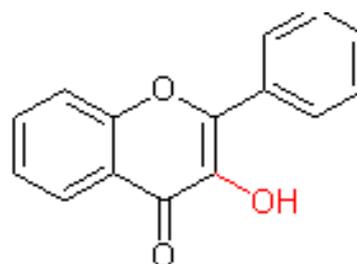
Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules (Harbone, 1988) dont les plus importantes sont : les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanidines (figure 6).

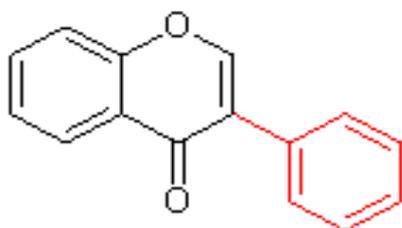
Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous la forme libre (génine) ou sous la forme de glycoside (C ou O glycosylés). On les retrouve dans toutes les plantes vasculaires où elles peuvent être localisées dans divers organes : racines, tiges, feuilles et fruits (Bruneton, 1999).



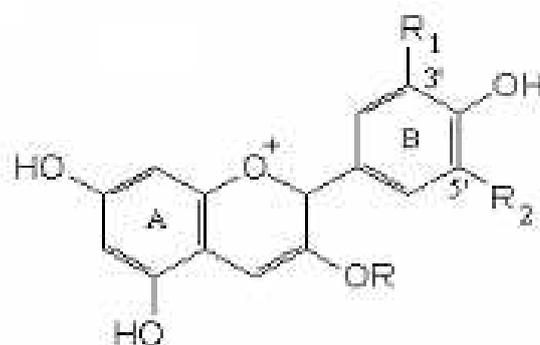
Flavone



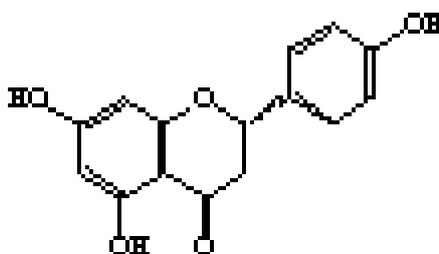
Flavonol



Isoflavone



Anthocyanidines



Flavanone

Figure 6 : Les principales classes de flavonoïdes

### II.1.4.3. Biosynthèse des flavonoïdes

Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone. Par l'action d'enzymes, cette chalcone, est métabolisée en différentes classes de flavonoïdes (**figure 7**). Des étapes ultérieures, surtout de glycosylation et d'acylation, amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle ils se trouvent in vivo. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées (**Bruneton, 1999**).

### II.1.4.4. Absorption et biodisponibilité

Le métabolisme et la pharmacocinétique des polyphénols, et plus particulièrement les flavonoïdes ont fait l'objet d'intenses recherches. Ces dernières ont montré que les flavonoïdes sont rapidement absorbés dans le tractus intestinal et détectés dans le plasma, ce qui suggère qu'ils sont disponibles pour exercer leurs effets biologiques (**Spencer et al., 2004**).

En effet, il a été démontré que les flavonoïdes peuvent traverser la barrière intestinale et atteindre la circulation plasmatique à des concentrations de l'ordre du micromolaire, concentrations auxquelles ils possèdent des effets bénéfiques observés in vitro (**Manach et al., 2005**).

**Scalbert et al. (2002)** rapportent que l'absorption de la lutéoline dans le petit intestin peut atteindre jusqu'à 60 % de la quantité consommée et que la demie-vie varie de 2 à 28 heures. D'une manière générale, les flavonoïdes sont excrétés dans la bile et dans le duodénum, puis ils sont réabsorbés dans le cycle entérohépatique ce qui explique la longueur de leur demie-vie.

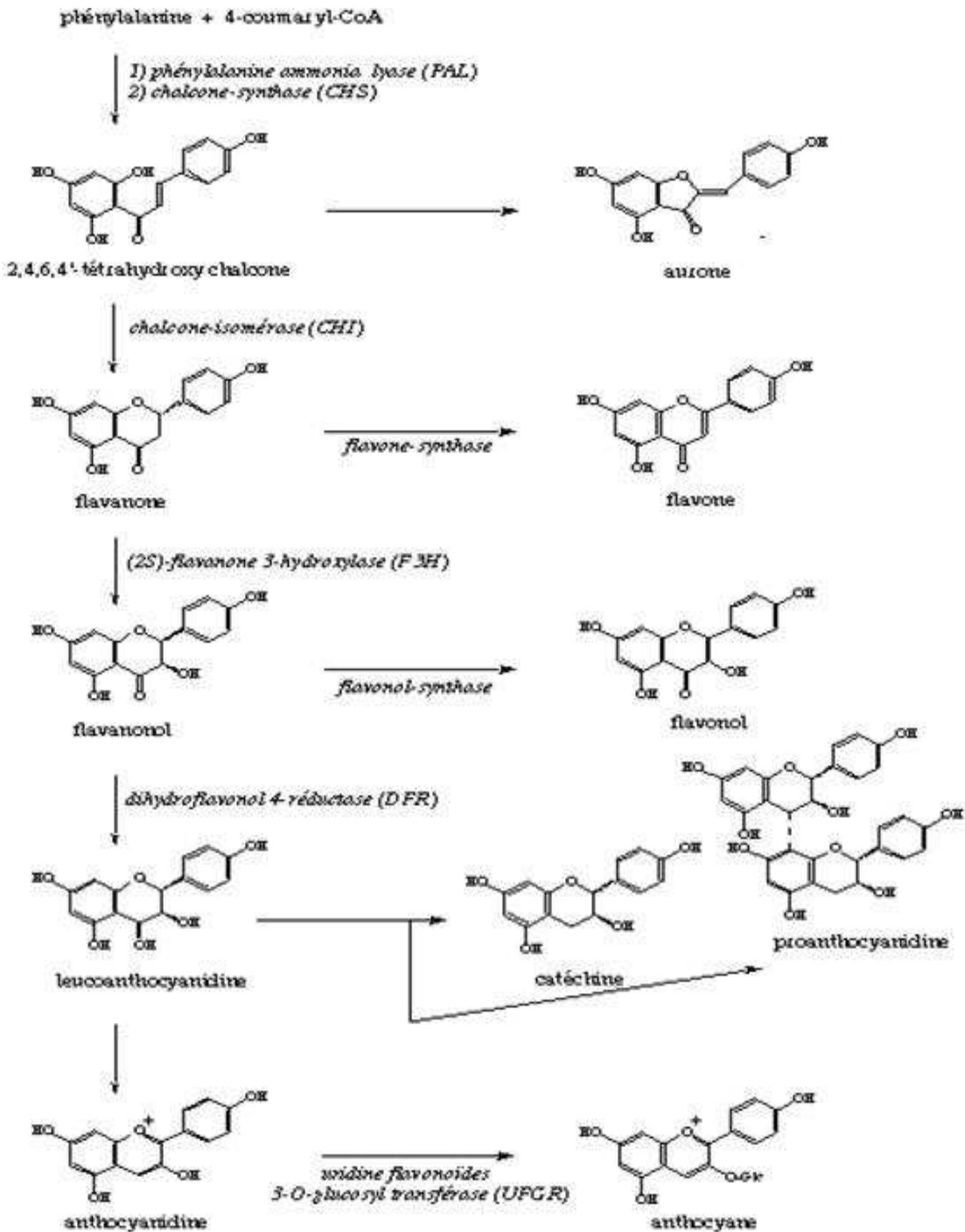


Figure 7 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes ( Bruneton, 1999)

### II.1.4.5. Propriétés biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont suscité l'intérêt scientifique depuis plusieurs décennies. D'abord à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation, mais aussi parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes (**Manach et al., 2004**). Ils ont également pour fonction de protéger ces dernières contre les pathogènes d'origine virale ou bactérienne, les prédateurs comme les insectes (**Bravo, 1998**).

Plus particulièrement, les flavonoïdes sont impliqués, chez les plantes, dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse et ils jouent un rôle de protection contre les effets néfastes des rayons ultraviolets en agissant comme antioxydant (**Havsteen, 2002**).

Les flavonoïdes parviennent à capturer les espèces réactives de l'oxygène associées au stress oxydatif, les empêchant ainsi de créer des dommages cellulaires. En effet, ils sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils inhibent aussi l'oxydation des LDL et, de ce fait, peuvent prévenir l'athérosclérose et diminuer les risques de maladies cardiovasculaires (**Tu et al., 2007**).

Les flavonoïdes sont capables d'exercer en plus des propriétés antioxydantes, des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et antiulcérogènes (**Di Carlo et al., 1999**). Certains flavonoïdes ont également démontré un potentiel d'agent vasodilatateur (**Woodman et Chan, 2004**). Ils ont été surnommés les « modificateurs naturels des réponses biologiques » (**Middleton et al., 2000**).

Une panoplie d'études in vitro ont ensuite montré que les flavonoïdes peuvent moduler l'activité d'une grande variété d'enzymes impliquées dans des voies importantes qui régulent la division et la prolifération cellulaire, l'agrégation des plaquettes, la détoxification, l'inflammation et la réponse immunitaire (**Middleton et al., 2000**), ils sont donc capables de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires.

Récemment, plusieurs études épidémiologiques ainsi que des études réalisées dans différentes lignées cellulaires ont démontré le potentiel antitumoral et anticancéreux des flavonoïdes (**Birt et al., 2001 ; Yang et al., 2001 ; Ramos, 2007**) notamment les molécules

appartenant à la sous-classe des flavones efficaces contre le colon (**Wenzel et al., 2000**) et les poumons (**Liu et al., 2005**). De plus les anthocyanidines ont montré des effets d'inhibition de la migration de cellules provenant de tumeurs hautement invasives et prolifératives, les glioblastomes (**Lamy et al., 2007**)

### **II.1.5. Les tanins**

#### **II.1.5.1. Définition**

Les tanins sont une famille complexe de principes actifs qu'on trouve dans l'ensemble des végétaux, et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, etc.). Ils ont la capacité de former des complexes avec des macromolécules (les protéines ...) et des liaisons entre les fibres de collagènes, d'où leur viennent la plupart de leurs propriétés (**Paolini et al., 2003**).

Leur structure chimique est particulièrement variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique ; il existe deux catégories de tanins, d'origine biosynthétiques différentes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Paolini et al., 2003**).

- Les tanins hydrolysables : Ce sont des esters d'oses et d'acides phénols (acide gallique ou ellagique) (**Bruneton, 1999**).
- Les tanins condensés : ou tanins catéchiques ou proanthocyanidols : Ce sont des polymères flavanoliques, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone- carbone le plus souvent C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> ou C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> tel la catéchine ou l'épicatéchine.

#### **II 1.5.2. Propriétés biologiques des tanins**

Les tanins sont des métabolites secondaires des plantes, leur conférant une protection contre les prédateurs (herbivores et insectes). La propriété astringente des tanins est à la base d'autres propriétés (vulnéraire, antidiarrhéique..), elle permet la cicatrisation, l'imperméabilisation de la peau et des muqueuses, favorise la vasoconstriction des petits vaisseaux (**Paolini et al., 2003**).

En outre, les tanins ont un très grand pouvoir antibactérien (**Bassene et al., 1995 ; Baba Moussa, 1998 ; Kolodziej, 1999**), antiviral (**Nonaka et al., 1990 ; Pousset et al., 1993 ; Hong et al., 2000**), anti-inflammatoire (**Mota et al., 1985**) et une activité antimutagène (**Kaur et al., 2000**). Les plantes riches en tanins sont utilisées dans les cas de rhume, de maux

de gorge, les problèmes de sécrétions trop importantes, les infections internes ou externes, blessures, coupures et brûlures (**Bruneton, 1999**).

## **II .2. Les composés terpéniques**

### **II. 2.1. Les saponosides**

#### **II. 2.1.1. Définition**

On entend par saponosides (mot latin “ sapon ”, savon ; “ saponaire ”, l’herbe à savon), des hétérosides à aglycones de structure stéroïde ou triterpénique qui tiennent une grande place parmi les substances d'origine végétale (**Robinet, 1951**).

#### **II .2.1.2. Propriétés biologiques des saponosides**

Les saponosides ont une activité expectorante, ils rendent un peu moussant la muqueuse des bronches inflammatoires et facilitent l’expectoration. De plus, ils sont de puissants hémolysants, ils possèdent également des propriétés édulcorantes, largement utilisées dans l’industrie agro-alimentaire (**Bruneton, 1999**).

D’autre part les travaux de **Steinmetz et al. (1993)** ont mis en évidence l'activité antifongique de saponosides triterpéniques extraits du lierre sur les levures et les dermatophytes. Dans un même ordre d’idée, les saponosides l’ $\alpha$ -hédérine ont montré une activité anti tumorale et antibactérienne.

## **II. 3. Alcaloïdes**

### **II.3.1. Définition**

Les alcaloïdes sont des molécules d'origine naturelle. On les trouve principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et chez certains micro-organismes.

Leur structure chimique de base est un hétérocycle azoté sauf pour quelques substances dans lesquelles l'azote est extra cyclique (c'est le cas de la colchicine et de l'éphédrine par exemple). Il existe plus de six mille alcaloïdes mais ce chiffre est en constante augmentation (**Judd et al., 2002**).

### **II.3.2. Propriétés biologiques des alcaloïdes**

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène du point de vue de leur structure, de leurs propriétés et de leurs effets biologiques.

Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique (**Bruneton, 1999**).

Les alcaloïdes sont aujourd'hui nommés d'après la plante qui les a fournis, toujours avec une terminaison en "ine". D'une façon générale, les alcaloïdes sont amers et utilisés comme apéritifs (**Bruneton, 1999**).

### III. Les antioxydants

#### III.1. Généralités

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés pour lutter contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres (**tableau 3**). Ces derniers sont produit quotidiennement par l'organisme ; ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux (**Bartosz, 2003**) mais, ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides (**Pourrut, 2008**), des acides nucléiques (**Favier, 2003**) en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, l'artériosclérose.

Des systèmes de défense permettent de prévenir la formation radicalaire ou de limiter les lésions d'oxydation résultantes. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle.

**Tableau 3 : Liste des principaux radicaux libres.**

Radical	Formule
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Hydroxyle	$OH^{\cdot}$
Peroxyle	$ROO^{\cdot}$
Hydroperoxydes	$ROOH$
Alcoxydes	$RO^{\cdot}$
Oxygène singulet	$1/2O_2$
Oxyde nitrique	$NO^{\cdot}$

### III.2. Les antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes ( Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (**Mika et al., 2004**).

- Les superoxydes dismutases (SOD) : sont des métallo-enzymes se retrouvant dans l'ensemble du monde du vivant. Elles catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (**Arora et al., 2002**).
- Les catalases (CAT) : Sont des enzymes majoritairement peroxysomales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (**Arora et al., 2002**).
- Les peroxydases (POX): Sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons.
- Les peroxyredoxines (PRX), aussi appelées thiorédoxines peroxydases, sont des peroxydases non hémiques contenant un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique. Les PRX sont des éléments essentiels du système de détoxification des espèces réactives de l'oxygène.
- Glutathion peroxydase (GPX) : Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>.

### III.3. Les antioxydants exogènes

Ils sont présents dans l'alimentation tels que les vitamines A, C, E et les polyphénols en particulier les flavonoïdes, ainsi que les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes anti-oxydants endogènes comme le sélénium, le zinc et le manganèse (**tableau 4**).

Ces antioxydants nutritionnels sont indispensables mais leur action est limitée jusqu'à ce qu'ils soient régénérés.

- La vitamine E : Le principal anti-oxydant nutritionnel est la vitamine E (essentiellement l'  $\alpha$ -tocophérol), liposoluble, puissant anti-oxydant mais qui peut avoir des effets délétères à très forte dose. Elle agit principalement par le transfert direct d'atomes d'hydrogène et permet d'inhiber la lipoperoxydation dans les cellules **(Njus et Kelley, 1991)**

La vitamine E est abondante dans les germes de blé, les légumes verts, les œufs, les noix et les corps gras notamment les huiles de tournosol, de soja, de maïs **(Koechlin-Ramonatxo, 2006)**.

- *L'ascorbate ou vitamine C* : est l'antioxydant hydrosoluble majeur, réagit rapidement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, ou encore avec le peroxyde d'hydrogène. Elle est indispensable par sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes **(Pourrut, 2008)**. La vitamine C est abondante dans les agrumes, les fruits rouges, les pommes, les brocolis **(Benbrook, 2005)**.

- Les caroténoïdes : sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules notamment le lycopène et le  $\beta$ -carotène, précurseurs de la vitamine A. Ils sont présents dans les carottes, les fruits rouge et jaunes, les légumes verts et les tomates **(Marc et al., 2004)**.

Le rôle biologique des caroténoïdes est, entre autres, complémentaire de celui de la vitamine E, elle-même régénérée par la vitamine C, d'où l'intérêt de consommer une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes variés pour bénéficier des nombreux effets de synergie entre micronutriments **(Miller et al., 1996)**.

- Les flavonoïdes : Ce sont des substances naturelles présentes dans tout le règne végétal. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer le cuivre ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène comme la xanthine oxydase **(Lahouel et al., 2006)**.

- Les tanins : Les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides.
- Les coumarines : Ils sont capables de piéger les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes, importants dans la prévention de la peroxydation des lipides membranaires et ils ont une activité antiperoxydante (**Diallo, 2005**).
- Le sélénium : il neutralise les métaux toxiques en particulier le plomb et le mercure. Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers.

**Tableau 4 : Exemples d'antioxydants retrouvés dans les aliments**

<b>Antioxydant</b>	<b>Protège contre</b>	<b>Sources</b>
Vitamine C	Les maladies cardiovasculaires, les cataractes, et certains types de cancer	Agrumes, tomate, melon, fraise, kiwi, poivron, brocoli
Vitamine E	Les maladies cardiaques et cancer de la prostate, ralentit la maladie d'Alzheimer	Noix et graines, huiles, fruits et légumes
Caroténoïdes	Les cancers, en particulier le cancer du poumon, et les maladies cardiovasculaires	Carotte, patate douce, courge, brocoli, chou frisé, épinard ; fruits : abricot, pêche
Flavonoïdes	Cancer	Bleuet, cerise, canneberge, mûre, cassis, prune, raisin rouge
Sélénium	Réduction de l'incidence des cancers de la prostate, du côlon et du poumon	Céréales complètes, noix, oignon, ail, volaille, viande

# CHAPITRE II

## Partie expérimentale

## I. Matériel végétal

### I.1. Origine géographique et période de récolte des plantes

Les espèces sélectionnées ont été récoltées dans deux régions différentes (**tableau 5**) :

- La région de Ain sefra, wilaya de Naâma : pour l'espèce *Ajuga iva* durant le mois d'avril (**figure 8**).
- La région de Tlemcen (Mansourah) : pour l'espèce *Satureja calamintha* au mois d'octobre, période de pleine floraison (**figure 8**).

Ces deux espèces sont très utilisées par la population locale. Leurs propriétés thérapeutiques et pharmaceutiques n'ont pas donné lieu à d'importantes recherches scientifiques.

**Tableau 5 : Situation géographique des stations de récolte.**

Région	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Ain Sefra	32°45'	0°34'	Aride
Tlemcen	34°51'	1°20'	Semi aride

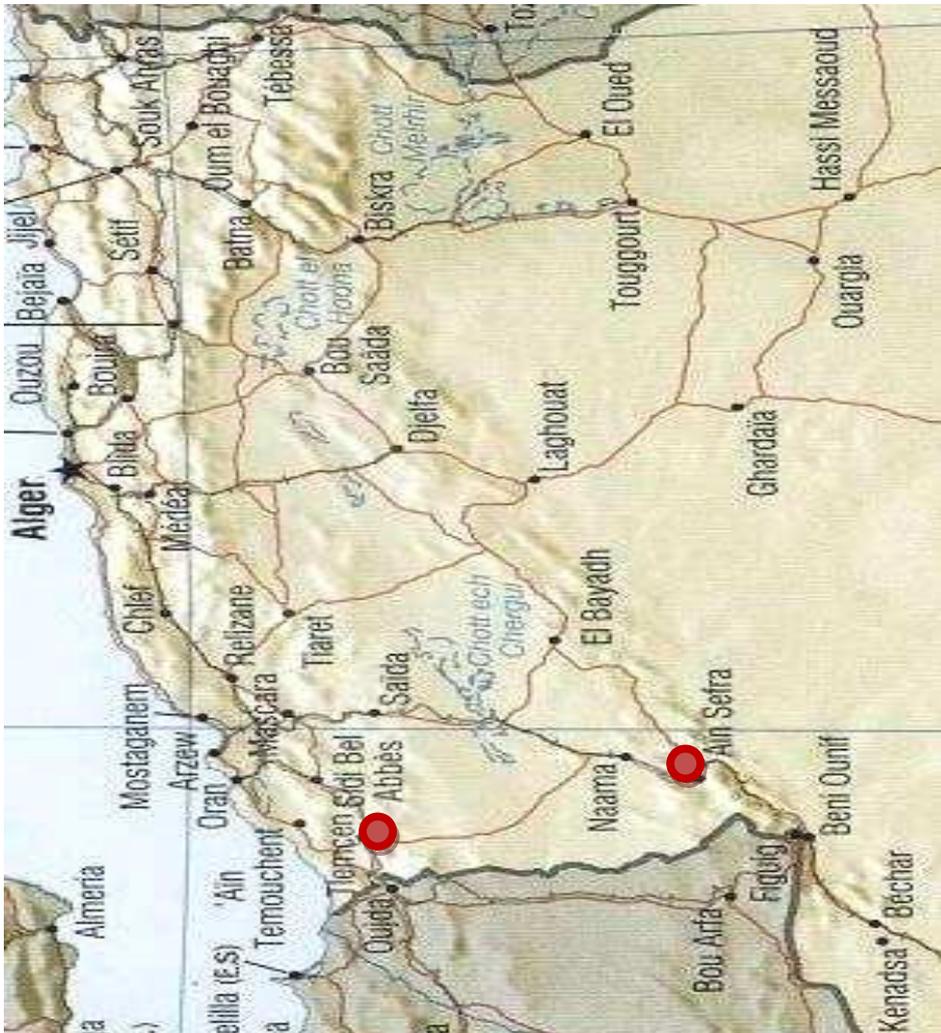
### I.2. Identification botanique

Les deux espèces ont été identifiées par le professeur BENABADJI N. du laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen (Algérie).

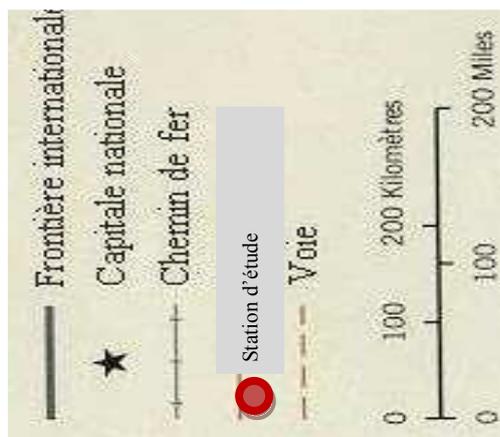
### I.3. Préparation des échantillons

Les plantes récolées et triées sont séchées à l'air libre, à l'ombre et à température ambiante pendant six jours, puis broyées au mortier.

Ces poudres sont ensuite conservées dans des flacons, en verre hermétiquement fermés à basse température – 18°C en vue de procéder aux différentes manipulations.



**Légende de la carte**



**Figure 8 : Situation géographique des stations d'étude**

## II .Tests phytochimiques

Les espèces sélectionnées font l'objet d'une étude phytochimique qui consiste à détecter les différents composés chimiques existant dans la plante.

Trois solvants de polarités différentes (eau, éthanol, éther diéthylique) ont été utilisés, au cours de ces tests qui sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

### II.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud

50g de matériel végétal sont mis en contact avec 300 ml d'eau dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux différents tests (**Annexe A**).

#### II.1.1. Amidon

Le test effectué consiste à :

- Chauffer 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition ;
- Ajouter le réactif d'amidon

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée (**Guignard, 1979**).

#### II.1.2. Saponosides

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse (**Bruneton, 1999**). Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, après l'agitation, le mélange est abandonné pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée:

Pas de mousse = test négatif

Mousse moins de 1cm = test faiblement positif

Mousse de 1-2cm = test positif

Mousse plus de 2cm = test très positif

### II.1.3. Les tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait aqueux, 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  diluée 10 fois. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins (**Trease et Evans, 1987**).

### II .1.4. Les anthraquinones

La détection des anthraquinones consiste à :

- Traiter 1g du matériel végétal avec 10 ml de KOH (0,5N) et 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  dilué à 5% ;
- Bouillir et refroidir le mélange
- Filtrer, puis acidifier le filtrat avec de l'acide acétique ;
- Extraire la solution acide obtenue avec 10 ml de toluène ;
- Agiter l'extrait de toluène en présence de 5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$

Une réaction positive est révélée par formation d'une couleur rouge au niveau de la couche alcaline.

## II.2. Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol

50g de matériel végétal sont mis en contact avec 300 ml d'éthanol dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux différents tests (**Annexe B**).

### II.2.1. Les flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1ml d' $\text{HCl}$  concentré et 0,5g de tournure de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (**Bruneton, 1993**).

### II.2.2. Les alcaloïdes sels

Leur détection consiste à :

- Evaporer à sec 20 ml de l'extrait éthanolique ;
- Ajouter 5 ml d' $\text{HCl}$  (10%) au résidu obtenu, puis chauffer dans un bain marie ;
- Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%) jusqu'au pH 9 ;

- Extraire la solution avec l'éther diéthylique, ensuite concentrer à sec ;
- Dissoudre le résidu dans du HCl (2%) ;
- Tester la présence des alcaloïdes par quelques gouttes de réactif de Mayer et Wagner afin d'obtenir un précipité blanc et un précipité brun respectivement indiquant leur présence (**Memelink et al., 2001**).

### II.2.3. Les tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait éthanolique 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire (tanins galliques), vert ou bleue-verte (tanins catéchiques).

### II.2.4. Les anthracénosides, les coumarines et les anthocyanosides

Pour mettre en évidence ces composés, il faudra suivre les étapes suivantes :

- Ajouter 15 ml d'HCl (10%) à 25 ml de l'extrait éthanolique ;
- Porter l'ensemble à reflux pendant 30 minutes ;
- Refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 15 ml d'éther ;

Ensuite, chacune des ces familles est détectée séparément :

#### a. Les anthracénosides

La détection des anthracénosides est réalisée par le réactif de Bornträger, en traitant 8ml de la solution extractive étherique par ce dernier. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangée-rouge au violet- pourpre.

#### b. Les coumarines

Leur détection consiste à :

- Evaporer à sec 5 ml d'eau chaude, puis diviser le volume en deux parties ;
- Prendre le demi volume comme témoin et ajouter à l'autre volume en 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH (10%) ;
- Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV

La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence intense (**Bruneton, 1999**).

### c. Les anthocyanosides

Le test effectué consiste à doser la solution aqueuse acide avec une solution NaOH.

Les anthocyanosides ont des colorations variant en fonction du pH. De rouge stable en  $\text{pH} < 3$ , elles varient au bleu en milieu alcalin.

#### II.2.5. Les stérols et Stéroïdes

Deux essais ont été effectués :

**Essai 1** : il consiste à :

- Evaporer à sec 10 ml d'extrait éthanolique ;
- Traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre puis filtrer ;
- Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydride acétique ;
- Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ;
- Agiter, puis laisser la solution reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à  $21^{\circ}\text{C}$ ).

**Essai 2** : Il consiste à :

- Evaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme, puis filtrer ;
- Traiter le filtrat par la réaction de Liebermann-Burchardt.

Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique la présence des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement.

#### II.2.6. Les composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

### II.3. Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique

50g de matériel végétal sont mis en contact avec 300 ml d'éther diéthylique dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant 1 heure. Le mélange est filtré et l'extrait étherique est soumis aux différents tests (**Annexe C**).

#### II.3.1. Les huiles volatiles

La détection des huiles volatiles consiste à :

- Evaporer à sec 20 ml de l'extrait étherique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool ;
- Concentrer à sec la solution alcoolique obtenue.

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme.

#### II.3.2. Les acides gras

L'essai effectué consiste à :

- Concentrer à sec 20 ml de la solution étherique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool ;
- Traiter la solution alcoolique avec une solution base de soude ou de potasse ;
- Ajouter un peu d'eau et extraire la solution avec l'éther diéthylique ;
- Concentrer à sec la solution étherée.

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

#### II.3.3. Les alcaloïdes bases

La détection des alcaloïdes consiste à :

- Evaporer à sec 10 ml de l'extrait étherique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 ml d'HCl (2%) ;
- Ajouter 1 à 2 gouttes de réactif de Mayer.

La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

## II.4. Réactifs et réactions de caractérisation

Les réactifs utilisés au cours de ces tests sont :

- Réactif d'amidon : Dissoudre 1,2g d'iode ( $I_2$ ) dans 50ml d'eau distillée contenant 2,5g d'iodure de potassium (KI) puis chauffer pendant 5 minutes et diluer jusqu'à 250ml ou 500 ml.
- Réactif de Wagner : Dissoudre 2g de KI et 1,27g  $I_2$  dans 75ml d'eau distillée. Ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.
- Réactif de Mayer : Dissoudre 1,358g de  $HgCl_2$  dans 60ml d'eau distillée. Dissoudre 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.
- Réaction de liqueur de Fehling : Mélanger 5ml de liqueur Fehling A avec 5ml de liqueur Fehling B. Le caractère réducteur des aldoses ou des cétones donne un précipité rouge brique.
- Réaction de Liebermann-Burchardt : Mélanger 5ml de la solution à tester avec 5ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser reposer la solution 30 minutes à 21°C. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert.
- Réaction de Bornträger : En milieu alcalin aqueux ( $NH_4OH$ ), les anthracénosides donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

## III. Extractions sélectives et dosage

La mise en évidence des différentes familles de composés dans les feuilles des deux espèces étudiées, nous a permis de cibler les familles prépondérantes que nous avons extraites selon les méthodes d'extraction sélectives ; ensuite nous avons procédé à l'analyse des extraits par des méthodes chromatographiques ou par des dosages spectrophotométriques.

### III.1. Extraction des composés phénoliques

#### III.1.1. Préparation des extraits bruts secs

##### III.1.1.1. Préparation des extraits aqueux

Dix grammes de poudre de chacune des plantes ont été portés à reflux pendant 2 heures dans 150 ml d'eau distillée, puis filtrés ; ce filtrat a ensuite été évaporé à sec sous

pression réduite à 65°C au Rotavapor (Buchi R- 200). Le résidu obtenu est déterminé en poids pour calculer le rendement (Majhenic et al., 2007).

### III.1.1.2. Préparation des extraits bruts méthanoliques

Une prise d'essai de 2,5g de poudre de chacune des plantes a été mise à macérer dans 25ml de méthanol absolu sous agitation magnétique pendant 30 minutes. L'extrait a ensuite été stocké à 4°C durant 24 heures, filtré et évaporé à sec sous pression réduite à 50°C au Rotavapor. Le résidu sec pesé est repris par 3ml du méthanol et conservé à -18°C (Falleh et al., 2008).

### III.1.2. Calcul du rendement

Le pourcentage en extrait bruts sec méthanolique et aqueux a été calculé par la formule suivante :

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

**R (%)** : Rendement exprimé en %.

**M**: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

**M<sub>0</sub>** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

### III.1.3. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits (aqueux et méthanolique) des plantes qui font l'objet d'analyse a été déterminée par la méthode de **Singleton et Rossi (1965)**.

Une quantité de 200µl des extraits de chaque plante est mélangé avec 1ml du réactif de Folin–Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0,8ml de carbonate de sodium à 7,5% Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>. 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 765nm.

Une courbe d'étalonnage ( $y=ax+b$ ) a été réalisée en parallèle par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme du poids sec de la plante en poudre en appliquant la formule suivante :

$$C = (c \times V) / m$$

**C** : La teneur en phénols totaux (mg d'ac. gallique/ g de matière sèche).

**c** : La concentration de l'ac. gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

**V** : Volume de l'extrait méthanolique ou aqueux

**m** : Le poids de la matière sèche (g).

#### III.1.4. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits bruts méthanolique et aqueux a été déterminée spectrophotométriquement selon la méthode décrite par **(Kim et al., 2003)**.

Une quantité de 100µl de l'extrait de chaque plante a été mélangée avec 0,4ml d'eau distillée et par la suite avec 0,03ml d'une solution de nitrite de sodium  $\text{NaNO}_2$  à 5%. Après 5 minutes, 0,02ml d'une solution de  $\text{AlCl}_3$  à 10% a été ajouté. Après 5 minutes on additionne au mélange 0,2ml de solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M et 0,25ml d'eau distillée. L'ensemble est agité à l'aide d'un vortex et l'absorbance a été mesurée à 510 nm.

La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage ( $y = ax + b$ ) réalisée par la catéchine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de catéchine par gramme de la plante.

#### III.1.5. Extraction des fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes

En vue de mettre en évidence certains composés appartenant à certaines classes des composés phénoliques nous avons soumis notre extrait sec méthanolique à un fractionnement à l'acétate d'éthyle et n-butanol selon la méthode de **Bekkara et al. (1998)**

Les résidus secs obtenus après évaporation du filtrat méthanolique de chaque plante ont été repris dans 20ml d'eau bouillante et extraits dans une ampoule à décanter successivement avec 2 x 20ml d'acétate d'éthyle (AcOEt) et butanol (n-BuOH). Les deux fractions de chaque phase organique ont été réunies et concentrées au rotavapor. Les résidus secs ont été repris dans 3ml de méthanol puis conservé à  $-18^\circ\text{C}$ . Ces derniers étant la phase d'acétate d'éthyle et la phase n-butanol respectivement (**Annexe D**).

### III.1.6. Analyse de la composition chimique des extraits bruts secs et des fractions

#### AcOEt et n-buOH des flavonoïdes par CCM

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple dont le principe est basé sur le phénomène d'adsorption. Elle est utilisée dans la séparation et l'identification des molécules pures, les extraits (mélange complexes de métabolites) et les échantillons biologiques.

Trois microlitres de chaque extrait sont déposés à des points précis, à 1 cm du bord inférieur de la plaque de gel de silice (20x20 cm d'épaisseur).

Après plusieurs essais de systèmes de solvants, nous avons adopté les deux systèmes suivants, selon **Males et Medić- Sarić, (2001)**.

- Chloroforme/méthanol/acide acétique/ eau ; (100 : 15 : 0,3 : 0,5) ; (v/v/v/v).
- Acétate d'éthyle/acide formique/ eau distillé ; (65: 15 : 20) ;(v/v/v).

Après le développement dans la cuve en verre, la lecture a été faite par observation des plaques sous lampe UV à 365nm. Les Rf des spots ont été enregistrés

### III.1.7. Extraction des tanins

#### III.1.7.1. Protocole d'extraction

Le mode opératoire utilisé est celui décrit par **Bruneton (1999)**

##### ► Dégraissage du matériel végétal

Avec l'utilisation de l'appareil de Soxhlet, 100g de broyat des feuilles a été délipidés par 150 ml de l'éther de pétrole pendant deux heures.

##### ► Extraction des tanins

Dans un ballon monocol 100g du matériel végétal dégraissé ont été mis en présence de 250 ml d'eau distillée et 160 ml d'acétone. L'ensemble a été porté à une macération pendant quatre jours. Après filtration et élimination de l'acétone, la solution a été extraite deux fois avec 50 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides, et décantée pour extraire la phase aqueuse quatre fois avec 50 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis évaporée. Le résidu obtenu est déterminé en poids pour calculer le rendement en tanins.

### III.1.7.2. Calcul du rendement

Le pourcentage en tanins est calculé par la formule :

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

**R** : Rendement des tanins en (%)

**M** : Masse en grammes de l'extrait sec résultant

**M<sub>0</sub>** : Masse en grammes du matériel végétal obtenu après dégraissage

### III.1.7.3. Analyse de la composition chimique des tanins par CCM

Les analyses ont été effectuées sur une plaque de plastique recouverte de gel de silice G60 ; 20x20cm à 0,5cm d'épaisseur.

4µl d'extrait conservé dans l'acétone, de chaque plante ont été déposés à des points précis, à 1cm du bord inférieur de la plaque.

Le système de solvant utilisé est celui donné par **Lea, (1978)** : acétone/toluène/acide formique, (30 : 30 : 10) ; (v/v/v).

Après le développement, la lecture a été faite par observation des plaques sous la lampe UV à 365 nm. Les R<sub>f</sub> ont été comparés avec ceux des étalons.

## III .2. Extraction des saponosides

### III.2.1. Protocole d'extraction

Les saponosides ont été extraits selon la méthode décrite par **Okwu et Josiah, (2006)**.

- Une prise d'essai de 20 g du matériel végétal de chaque plante a été dispersée dans 200 ml de solution à 20% d'éthanol
- Une première extraction a été réalisée dans un bain marie à 55°C sans rotation pendant 4 heures ;
- Après filtration, le résidu obtenu a subi une deuxième extraction avec 200 ml d'une solution aqueuse à 20% qui a été filtré ensuite ;
- Les filtrats collectés ont été concentrés dans un bain marie à 90°C pour obtenir un volume de 40 ml ;

- Dans une ampoule à décanter, on mélange la solution concentrée avec 20 ml d'éther diéthylique, en agitant vigoureusement ;
- Cette opération a été répétée trois fois ;
- La phase aqueuse récupérée a subi une extraction avec 20 ml du n-butanol ;
- Cette opération a été répétée trois fois ;
- Les extraits combinés du n-butanol ont été lavés deux fois avec 10 ml d'une solution aqueuse à 5% de NaCl puis chauffés dans un bain-marie ;
- Après évaporation, le résidu obtenu est déterminé en poids pour calculer le rendement en saponosides.

### III.2.2. Calcul du rendement

Le pourcentage en saponosides a été calculé par la formule suivante :

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

**R (%)** : Rendement exprimé en %.

**M**: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

**M<sub>0</sub>** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

## IV. Pouvoir antioxydant

Les extraits aqueux, méthanoliques, et les fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol des deux plantes étudiées repris dans 3ml de méthanol sont testées pour leur pouvoir antioxydant selon deux méthodes :

### IV.1. Méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

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  $K_3Fe(CN)_6$  en  $Fe^{2+}$ .

- Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%.
- L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite ;
- 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction ;
- Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes ;

- 2,5ml du surnageant sont mélangés à 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

#### **IV.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH**

Pour évaluer l'activité antioxydante, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par **Sanchez-Moreno et al., (1998)**. Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

Cinquante microlitres de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations ou de standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,0025g/l). En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH.

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

#### **➤ Expression des résultats**

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs \text{ c} - Abs \text{ e}) / Abs \text{ c}] \times 100$$

**Abs c** : Absorbance du contrôle

**Abs e** : Absorbance de l'échantillon testé

Nos résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues.

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur  $IC_{50}$  qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (**Samarth et al. 2008**).

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire (**Brand-williams et al., 1995**).

$$ARP = 1 / IC_{50}$$

**ARP** : Puissance anti radicalaire

**IC<sub>50</sub>** : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

## V. Pouvoir antimicrobien

Les tests antibactériens et antifongiques ont pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait des feuilles de *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries et moisissures. Les extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes dont ils sont extraits et permettraient, à partir du présent travail, d'ouvrir d'autres pistes à la recherche.

Afin de mettre en évidence l'effet antibactérien *in vitro* des différents extraits, nous avons choisi la méthode de diffusion des disques sur milieu de Mueller-Hinton gélosé. Les extraits bruts méthanoliques et aqueux ont été solubilisés dans du DMSO pour obtenir des concentrations de 40 mg/ml et 100 mg/ml respectivement.

L'essai antifongique a été utilisé selon la méthode de contact direct sur milieu PDA. Les résultats obtenus sont comparés à ceux d'un antibiotique et d'un antifongique testés sur les mêmes souches bactériennes et fongiques.

### V.1. Provenance des germes étudiés

Les souches étudiées ont été fournies par M<sup>me</sup>Bekhechi sauf la souche *Bacillus cereus* qui a été procurée par M<sup>me</sup> Malek (**Tableau 6**). Elles sont responsables de nombreuses maladies qui affectent actuellement l'homme, les animaux et les plantes qui, dans certaines conditions, se comportent en contaminants, provoquant ainsi d'importantes mycoses, des allergies et des intoxications.

**Tableau 6 : Provenance des germes étudiés**

Souches utilisés	Code de la souche	Provenance
<b>a-Bactéries :</b> Bactéries à Gram (+) :		Laboratoire de microbiologie de l'Université de Tlemcen
<i>Bacillus cereus</i>	<b>ATCC 11778</b>	(M <sup>me</sup> Malek)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>ATCC25923</b>	Centre vétérinaire de Tlemcen et Laboratoire des Produits Naturels de l'Université de Tlemcen (M <sup>me</sup> Bekhechi, et M <sup>r</sup> Abdelouahid )
<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>ATCC 29212</b>	
<b>Bactéries à Gram (-) :</b> <i>Escherichia coli</i>	<b>ATCC25922</b>	
<b>b-Moisissures :</b> <i>Aspergillus flavus</i>	<b>MNHN 994294</b>	
<i>Fusarium oxysporium</i>	<b>MNHN 963917</b>	
<i>Cladosporium herbarum</i>	<b>MNHN3369</b>	

### V.2. Antibiotique et antifongique utilisés

La sensibilité des souches microbiennes a été testée vis-à-vis d'un antibiotique et d'un antifongique selon la méthode de diffusion sur disque (**tableau7**).

**Tableau 7 : Caractéristiques de l'antibiotique et de l'antifongique utilisés**

<b>Antimicrobiens</b>	<b>Famille</b>	<b>La dose</b>
Ciprofloxacine (ATB)	Quinolones	5µg
Nystatine (ATF)	Polyènes	30µg /ml

La ciprofloxacine est une fluoroquinolone, qui possède un vaste spectre d'activités contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

La nystatine est efficace contre les infections dues à une grande variété de levures et de champignons

### **V.3. Pouvoir antimicrobien des extraits aqueux et méthanolique des feuilles de *Satureja calamintha* et *Ajuga iva*.**

#### **V.3.1. Méthode d'étude du pouvoir antibactérien des extraits**

##### **V 3.1.1. Principe**

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongogramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide.

L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante.

Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (**Broadasky et al., 1976**).

##### **V.3.1.2. Protocole expérimental (Lesueur et al., 2007)**

Des disques de papier filtre de 6mm de diamètre imbibés de 15µl des extraits bruts (méthanolique et aqueux) ont été placés à la surface de gélose Mueller Hinton sèche, inoculée au préalable par un millilitre de dilution de la suspension bactérienne contenant approximativement  $10^7$ UFC/ml de *Staphylococcus aureus* et  $10^6$ UFC/ml pour les autres souches bactériennes. Après incubation à 37°C pendant 24heures, la sensibilité a été évaluée en mesurant le diamètre d'inhibition.

Les résultats obtenus sont comparés à celui de l'antibiotique testé sur les mêmes souches et par la même méthode. Trois répétitions sont effectuées pour chaque extrait.

### V.3.2. Méthode d'étude du pouvoir antifongique des extraits

La méthode de contact direct est utilisée en vue de déterminer les extraits actifs par l'évaluation du taux d'inhibition selon la méthode de **Fandohan et al. (2004)**.

Une quantité de 500 µl de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux des deux plantes est incorporée séparément dans des tubes contenant 20ml du milieu PDA maintenu en surfusion. Chaque tube est homogénéisé instantanément par agitation manuelle puis son contenu est coulé dans une boîte de pétri. Un disque mycélien de diamètre de 6mm prélevé de la culture jeune du mycète a été inoculé.

La lecture des résultats a été faite après 5jours d'incubation à  $(25\pm 2)$  °C par mesure du diamètre de la zone de croissance.

Parallèlement, nous avons déterminé le diamètre de la zone de croissance de ces mêmes souches fongiques en absence d'extrait.

L'effet antimicrobien de nos extraits sur la croissance des souches filamenteuses est déterminé par la mesure du taux d'inhibition de la croissance en utilisant la formule d'Ebbot (**Motiéjunaité et Peiculyté, 2004**) :

$$T = (D_k - D_0) / D_k \times 100$$

**D<sub>k</sub>** : Diamètre de la colonie fongique du témoin (en mm)

**D<sub>0</sub>** : Diamètre de la colonie fongique en présence de l'extrait (en mm)

**T** : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage

L'extrait est dit :

- ✓ Très actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100 %, la souche fongique est dite très sensible ;
- ✓ Actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 75 %, la souche fongique est dite sensible ;
- ✓ Moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 50%, la souche est dite limite ;
- ✓ Peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 25%, la souche est dite peu sensible ou résistante.

## **V.4. Préparation des inoculums**

### **V.4.1. Bactéries**

Les souches bactériennes ont été revivifiées dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures. Puis des gouttelettes de suspension bactérienne sont ensemencées en strie dans des boîtes de Pétri préalablement coulées de gélose nutritive.

Après incubation, deux ou trois colonies, bien isolées, ont été prélevées et mise en culture dans 10ml de bouillon nutritif. Après 18 heures d'incubation à 37°C, nous avons effectué des dilutions de la suspension afin de standardiser l'inoculum. Ce dernier doit être ajusté à une densité optique entre 0,08-0,1 à 625nm soit environ  $10^8$  UFC/ml. Les dilutions de 1/10 pour *Staphylococcus aureus* et 1/100 pour les autres souches ont été réalisées dans de l'eau physiologique stérile pour obtenir successivement  $10^7$ UFC/ml et  $10^6$ UFC/ml.

### **V.4.2. Moisissures**

Les souches conservées dans du PDA acidifié inclinée à 4°C, sont ensemencées sur le milieu PDA coulé en boîtes de Pétri et incubées à  $25\pm 2^\circ\text{C}$  pendant 5 jours.

## **V.5. Milieux de culture utilisés**

- Pour les bactéries, nous avons utilisé deux milieux de culture.

Pour la revivification des souches, nous avons utilisé gélose nutritive pouvant servir à la culture des bactéries n'ayant pas d'exigences particulières.

- Pour les moisissures, le milieu choisi pour l'antifongigramme est le milieu de base pour la culture des moisissure qui est Potato Dextrose Agar (PDA).

# CHAPITRE III

## Résultats et Discussion

## I. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les feuilles de deux plantes étudiées *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* épuisés par l'eau, l'éthanol et éther diéthylique sont regroupés dans le **tableau 8**.

Dans les feuilles de ces plantes, la recherche des alcaloïdes, des anthraquinones, des composés réducteurs, des amidons, des anthocyanosides, des anthracénosides s'est montrée négative mais celle de flavonoïdes, des tanins et des huiles volatiles a été positive.

Il est à signaler que les saponosides, les stérols et stéroïdes sont présents en faible quantité dans les deux plantes.

D'autre part, les coumarines sont des classes de familles chimiques faiblement caractérisées dans *Satureja calamintha* mais totalement absentes dans les feuilles de *Ajuga iva*.

L'analyse phytochimique réalisée a permis de constater la présence des cinq grands groupes chimiques, les tanins, les flavonoïdes, les stérols et stéroïdes, les huiles volatiles et les saponosides, alors que les coumarines ne semblent présentes que dans *Satureja calamintha*. Suite à notre recherche bibliographique il n'y a pas eu de travaux sur la composition chimique de l'espèce *Satureja calamintha*. Cependant, **El-Hilaly et al., (2004)** ont rapporté la présence des mêmes classes de familles chimiques retrouvées au niveau des feuilles de *Ajuga iva*.

**Tableau 8 : Résultats des tests phytochimiques sur les feuilles de *Satureja calamintha* et *Ajuga iva***

Classes recherchées	<i>Satureja calamintha</i>	<i>Ajuga iva</i>
Flavonoïdes	++	++
Tanins	+++	+++
Stérols et stéroïdes	+	+
Alcaloïdes sels	-	-
Amidon	-	-
Composés réducteurs	-	-
Saponosides	+	+
Anthraquinones	-	-
Coumarines	+	-
Anthracénosides	-	-
Anthocyanosides	-	-
Huiles volatiles	+++	++
Acide gras	-	-
Alcaloïdes bases	-	-

- : Test négatif

++ : Test positif

+ : Test faiblement positif

+++ : Test fortement positif

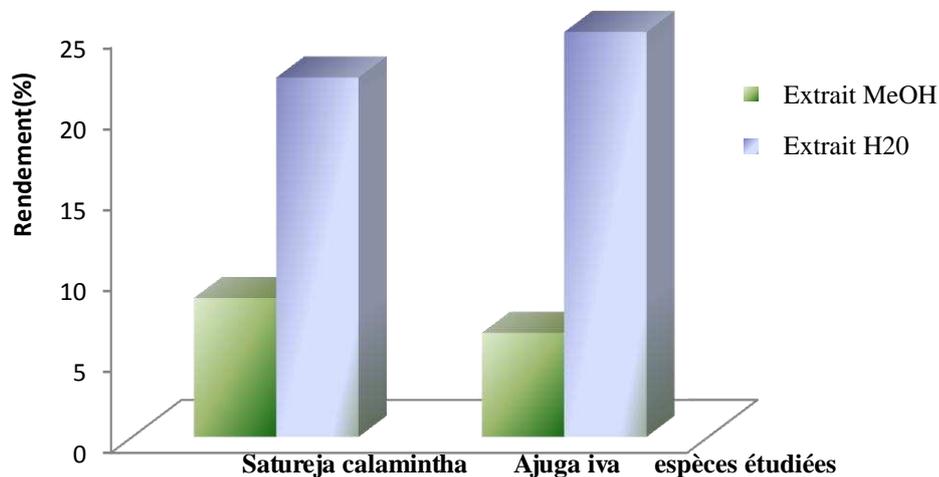
## II. Extraction et dosage des composés phénoliques

### II.1. Rendement en extraits bruts secs

Les résultats obtenus (**figure 9, annexe E**) montrent que le rendement en extrait méthanolique des feuilles de *Satureja calamintha* (8,58%) est légèrement supérieur à celui des feuilles de *Ajuga iva* (6,43%). Par contre, l'extraction à l'eau et à température d'ébullition a donné un taux élevé en extrait sec dans les feuilles de *Ajuga iva* 25% par rapport aux feuilles de *Satureja calamintha* 22,19%.

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

Il a été démontré que pour l'extraction par les solvants à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenu à température ambiante (**Majhenic et al., 2007**) et qu'ils sont plus élevés pour l'extrait aqueux que méthanolique (**Majhenic et al., 2007**) ce qui est en accord avec notre résultats.



**Figure 9 : Rendements (%) en extraits bruts secs des espèces étudiées.**

Le calcul des rendements permet non seulement d'apprécier les extraits totaux issus de chaque espèce, mais également d'envisager la quantité d'organes à prélever en cas de besoin

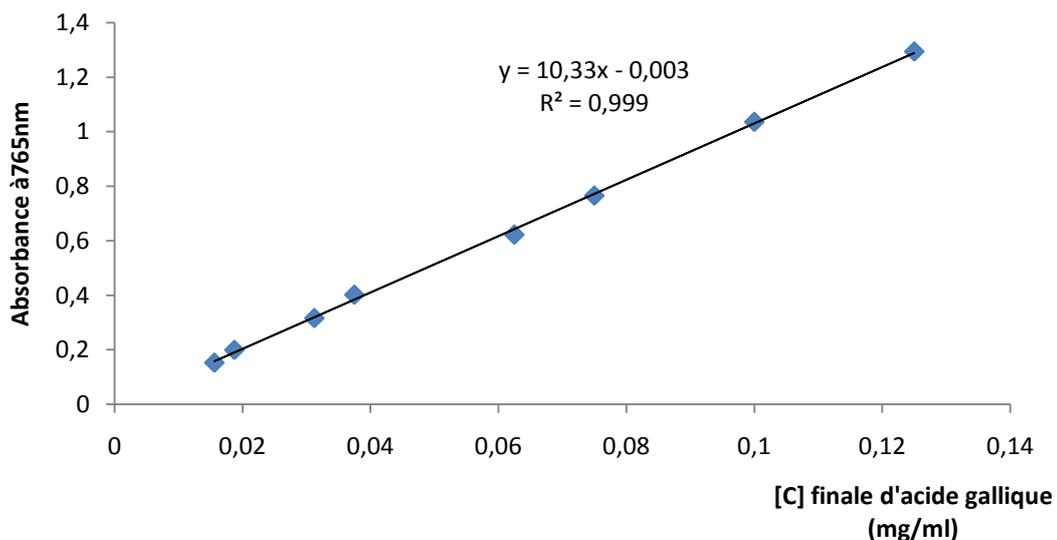
pour une éventuelle étude similaire ; ce qui, rendrait l'utilisation rationnelle et donc durable des espèces visées.

## II. 2. Teneur des extraits bruts en phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des espèces étudiées ont été déterminées en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu, ce dernier forme un complexe rédox avec l'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et l'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) lors de l'oxydation des phénols.

Malgré la sensibilité et la simplicité de la méthode Folin, elle n'est pas spécifique des polyphénols. En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres réducteurs, l'acide ascorbique et des composés soufrés (Singleton et al., 1999).

Une étude comparative en phénols totaux a été faite grâce à une courbe d'étalonnage (figure 10, annexe F), réalisée avec un extrait d'acide gallique à différentes concentrations



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

Les teneurs en phénols totaux mesurés à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu varient de 1,323 à 2,968 mg/g et 10,44 à 12,6mg/g équivalent en acide gallique pour les extraits méthanoliques et aqueux respectivement (tableau 9).

**Tableau 9 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits méthanoliques et aqueux des espèces étudiées**

Plantes	Teneurs en phénols totaux (mg/g)	
	Extrait méthanolique	Extrait aqueux
Satureja calamintha	2,968	12,6
Ajuga iva	1,323	10,44

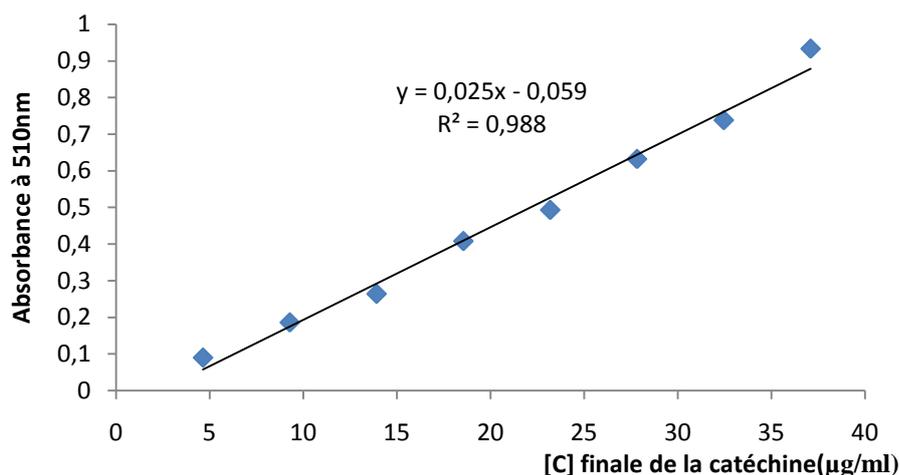
Les deux espèces *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* ont des teneurs en phénols totaux assez proche dans les extraits aqueux, tandis que pour les extraits méthanoliques cette teneur est supérieure d'environ 45% dans *Satureja calamintha* que dans *Ajuga iva*.

D'autre part, **Saadaoui et al., (2007)** ont montré que la teneur phénolique de l'extrait méthanolique de quelques plantes appartenant à différentes familles *Punica granatum*, *Rétama raetam*, *Thymus capitatus*, *Rosmarinus officinalis*, *Ruta chalepensis*, *Ajuga iva*, *Lawsonia inermis* et *Agave americana* varie entre 1,68 à 11,07 mg/g de matière sèche exprimée en équivalent d'acide gallique.

### II.3. Teneurs en flavonoïdes des extraits bruts méthanolique et aqueux

Des dosages spectrophotométriques ont été effectués à partir des extraits bruts méthanoliques et aqueux des deux espèces afin de déterminer la teneur totale des flavonoïdes.

Une courbe d'étalonnage (**figure 11, annexe G**) a été réalisée avec un extrait de catéchine à une longueur d'onde 510nm.



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

Les quantités des flavonoïdes correspondantes des espèces étudiées ont été rapportées en mg équivalent de catéchine/g du matériel végétal sec (**tableau 10**).

**Tableau 10 : Teneurs en flavonoïdes dans les extraits méthanoliques et aqueux des espèces étudiées**

Plantes	Teneurs en flavonoïdes (mg/g)	
	Extrait méthanolique	Extrait aqueux
Satureja calamintha	1,280	3,131
Ajuga iva	1,050	0,629

Les teneurs en flavonoïdes de *Satureja calamintha* (1,280mg/g) et de *Ajuga iva* (1,050mg/g) sont assez proches dans l'extrait méthanolique, cependant on remarque qu'il y a 39% plus de flavonoïdes dans *Satureja calamintha* que dans *Ajuga iva* et ceci pour l'extrait aqueux.

Nos valeurs ont été comparées à celles des travaux antérieurs (**tableau 11**) sur des espèces de la même famille et sont toutes inférieures à celle de *Teucrium polium* (**Djeridane et al., 2006**) alors que les teneurs en flavonoïdes dans l'extrait aqueux de *Satureja calamintha* est presque similaire à celui de *Teucrium polium* (**Belmekki, 2009**).

**Tableau 11 : Tableau comparatif des teneurs en flavonoïdes**

<b>Espèces (Origine)</b>	<b>Teneurs en (mg/g)</b>	<b>Références bibliographiques</b>
Teucrium polium (Laghouat)	4,63 ± 0,10	<b>(Djeridane et al., 2006)</b>
Teucrium polium (Beni snous)	3,2	<b>(Belmekki, 2009)</b>
Salvia verbenaca (Beni snous)	2,9	
Saccocalyx satureioides (Ain sefra)	1,11	

#### **II.4. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par CCM**

Nous avons soumis nos extraits méthanoliques et aqueux à une analyse sur chromatographique sur couche mince, cependant, malgré la variation de plusieurs systèmes de solvants nous ne sommes pas arrivés à une bonne séparation de nos extraits pour cela nous avons adopté une partie du protocole de **Bekkara et al., (1998)** en soumettant nos extraits à des extractions par l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Ces deux dernières fractions ont été soumises à l'analyse en utilisant deux systèmes de solvant (**Males et Médic- Saric, 2001**).

Système 1 : Chloroforme/ méthanol/acide acétique/eau ; (100 :15 :0,3 :0,5) ; (v : v : v : v)

Système 2 : Acétate d'éthyle/ acide formique/ eau distillée ; (65 : 15 :20) ; (v : v : v)

Après le développement du chromatogramme, et lorsque le front du solvant d'élution a atteint la ligne supérieure, la plaque a été retirée, séchée et examinée sous la lampe UV à 365nm afin d'avoir une identification du nombre de constituants présents (**figures 12, 13**).

Les systèmes de solvant utilisés nous ont permis de séparer plusieurs composés dans les fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol de nos échantillons (**tableau 12, 13**). Après la révélation sous lampe UV à 365nm, les Rf des différents extraits flavonoïdiques ont été comparés avec ceux de témoins utilisés ainsi que ceux établis par **Benhammou, (2006) (tableaux 14, 15)**.

En effet, un Rf est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support donné.



**Figure 12: Photo du chromatogramme résultant de l'analyse des deux fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes par le système solvant 1.**



**Figure 13 : Photo du chromatogramme résultant de l'analyse des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes par le système solvant 2.**

- |  |   |
|--|---|
| 1. Fraction n-butanol de Ajuga iva           | 2. Fraction acétate d'éthyle de Ajuga iva           |
| 3. Fraction n-butanol de Satureja calamintha | 4. Fraction acétate d'éthyle de Satureja calamintha |

**Tableau 12: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïdiques des feuilles de *Satureja calamintha* et de *Ajuga iva*.**

**Système de solvants 1 :** Chloroforme/MeOH/acide acétique/eau : 100/15/0,3/0,5.

**Adsorbant :** gel de silice.

Espèces étudiées	Fraction de l'extrait méthanolique	Rf	Couleur des spots
<i>Satureja calamintha</i>	AcOET	0,04	Violet
		0,10	Violet
		0,86	Vert
	n-BuOH	0,05	Jaune
		0,09	Violet
		0,11	jaune
0,20		Bleu	
<i>Ajuga iva</i>	AcOET	0,28	Jaune
		0,88	Jaune
		0,03	Marron
	n-BuOH	0,06	Bleu
		0,88	Jaune
		0,02	Vert
0,05		Violet	
n-BuOH	0,10	Violet	
	0,13	Violet	
	0,41	Jaune	

Ce système de solvant nous a permis de séparer plusieurs composés :

- Pour les feuilles de *Satureja calamintha*, trois composés ont été séparés et mis en évidence dans la fraction d'acétate d'éthyle, tandis que pour la fraction butanolique nous avons mis en évidence six composés.
- Pour les feuilles de *Ajuga iva* dans la fraction d'acétate d'éthyle, le nombre de taches révélés dans l'acétate d'éthyle est de l'ordre de trois et il est de six pour la fraction butanolique.

**Tableau 13: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïques des feuilles de *Satureja calamintha* et de *Ajuga iva*.**

**Système de solvants 2 :** Acétate d'éthyle/ acide formique/ eau distillée ; (65 : 15 :20)

**Adsorbant :** Gel de silice

Espèce étudiée	Fraction de l'extrait méthanolique	Rf	Couleur de spots
<i>Satureja calamintha</i>	AcOET	0,03	Jaune
		0,61	Vert
		0,75	Vert
		0,77	Bleu
		0,85	Jaune
		0,89	Marron
	n-BuOH	0,67	Violet
		0,85	Violet
<i>Ajuga iva</i>	AcOET	0,02	Vert
		0,06	Vert
		0,87	Marron
		0,88	Violet
		0,91	Violet
	n-BuOH	0,04	Jaune
		0,76	Bleu
		0,81	Violet
		0,86	Vert
		0,90	Vert

Dans ce système de solvant, nous constatons que dans les feuilles de *Satureja calamintha*, le nombre de taches dans la fraction d'acétate d'éthyle atteint six spots alors que dans la fraction butanolique est de l'ordre de deux.

Pour les feuilles d'*Ajuga iva*, le nombre de spots révélé dans l'extrait d'acétate d'éthyle et n-butanol est au nombre de cinq.

Les valeurs des Rf des différents extraits flavonoïdiques ont été comparés avec ceux de témoins utilisés et ceux établis par **Benhammou, (2006) (tableaux 14, 15)** pour le même système de solvants.

**Tableau 14 : Les résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques**

**Système solvants 1 :** Chloroforme/méthanol/acide acétique/ eau ; (100:15:0,3: 0,5) ; (v/v/v/v).

Témoins	Rf	Couleur des spots	Classes phénoliques
Rutine	0,04	Violet	Flavonol
Catéchine	0,09	Violet	Flavanol
Acide gallique	0,13	Bleu violet	Acide phénol
Quercétine	0,41	Jaune	Flavonol
Ac.paracoumarique	0,64	Violet	Acide phénol
Pyrocatechol	0,71	Violet	Phénol simple

**Tableau 15: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques par le système solvant 1 ( Benhammou, 2006)**

**Système solvant 1:** Chloroforme/méthanol/acide acétique/ eau ; (100:15:0,3: 0,5) ; (v/v/v/v).

Témoin	Rf	Couleur des spots	Classes phénoliques
Acide férulique	0,55	Bleu	Acide phénols
Myricétine	0,08	Jaune	Flavonol
Résorcinol	0,40	Violet	Phénol simple
Hydroquinone	0,36	Violet	Phénol simple

Le système de solvant 1 nous a permis de séparer plusieurs constituants et mettre en évidence quatre composés phénoliques répartis dans les deux espèces (**tableau 16**).

La présence de la catéchine et la rutine dans les deux fractions de *Satureja calamintha*, tandis que dans les feuilles de *Ajuga iva*, nous avons pu mettre en évidence deux composés phénolique, la quercétine et la catéchine et ceci dans la fraction butanolique.

Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont déjà été publiés pour les lamiacées ; la quercétine, la lutéoline, l'apigénine, la naringénine et la catéchine ont été isolées de *Ajuga iva* (Bennaghmouch et al. 2001; El-Hilaly et al., 2004), et les flavanols sont identifiés dans *Satureja obovata* (Francisco et al., 1988).

**Tableau 16 : Les composés mis en évidence dans le système de solvant 1 pour les deux espèces étudiées.**

Espèces étudiées	Fraction	Rf	Composé mis en évidence
Satureja calamintha	AcOET	0,04	Rutine
		0,10	Catéchine
	n-BuOH	0,09	Catéchine
Ajuga iva	AcOET	-	-
	n-BuOH	0,10	Catéchine
		0,41	Quercétine

### III. Extraction des tanins

Les tanins sont une classe de familles chimiques qui sont présentes dans les deux espèces étudiées, pour cela nous avons procédé à une série d'extraction liquide-solide et liquide-liquide. Les extraits obtenus ont été concentrés sous pression réduite et les rendements ont été calculés.

#### III.1. Rendement en tanins

Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'histogramme dans la **figure 4 (annexe H)**.

Les valeurs de rendement en tanins des deux espèces *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* de ont été comparés (**tableau 17**) à celles de différentes espèces appartenant à la même famille des lamiacées (Belmekki, 2009 ; Vârban et al., 2009).



**Figure 14 : Rendement en (%) des tanins des espèces étudiées**

Les résultats obtenus montrent que la teneur en tanins de *Satureja calamintha* est plus importante par rapport à celle de l'espèce *Ajuga iva*.

**Tableau 17: Rendement (%) en tanins des différentes espèces de lamiacées**

Plantes	Rendement (%)	Références bibliographiques
<i>Saccocalyx satureioïdes</i>	0,23	<b>Belmekki, 2009</b>
<i>Teucrium polium</i>	0,68	
<i>Salvia verbenaca</i>	0,20	
<i>Satureja Hortensis L.</i>	4	<b>Vârban et al., 2009</b>

D'autre part, on constate que les rendements en tanins des plantes étudiées par **Belmekki, (2009)** sont faibles par rapport à notre résultat. Par contre le rendement en tanins obtenu dans *Satureja calamintha* est légèrement identique à celui révélé par **Vârban et al., 2009**

### III.2. Résultats de la chromatographie sur couche mince

Pour la séparation des extraits des tanins récupérés dans l'acétone un seul système de solvant a été utilisé : (acétone/toluène/acide formique), (30/30/10) ; (v/v/v). Ce dernier a permis de séparer cinq spots dans *Satureja calamintha* et six spots dans *Ajuga iva*

(figure 15). Les Rf des spots obtenus ont été comparés avec ceux des étalons (tableaux 18). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 19.



E1 : Extrait acétonique de *Satureja calamintha*      E2 : Extrait acétonique de *Ajuga iva*

**Figure 15 : Photo du chromatogramme résultant de l'analyse des extraits tanniques des deux espèces par chromatographie sur couche mince.**

**Tableau 18 : Rf des différents étalons utilisés**

Étalons	Rf
Phloroglucinol	0,66
Pyrogallol	0,70
Hydroquinone	0,72
Résorcinol	0,74
Catéchol	0,76

**Tableau 19: Les composés mis en évidence dans les deux espèces étudiées.**

**Système solvant** : acétone / toluène/ acide formique, (30/30/10) ;(v/ v /v)

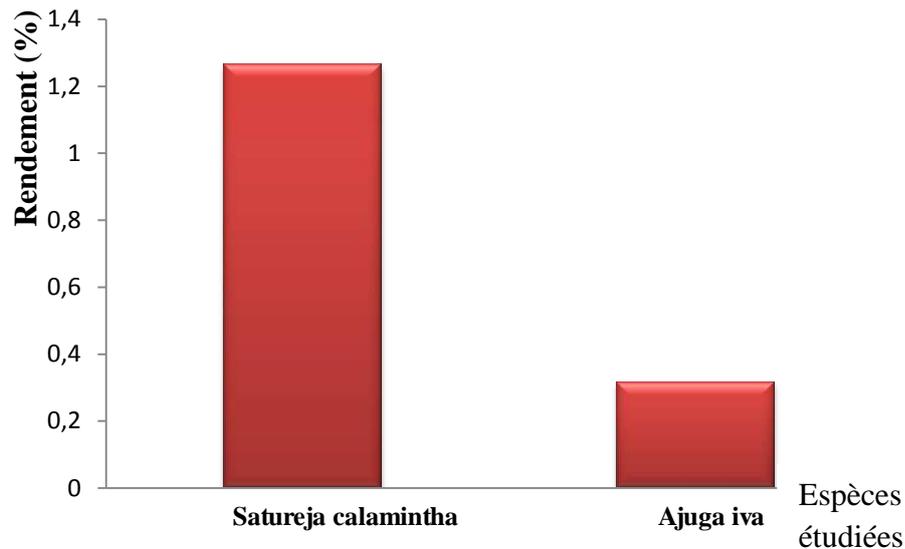
**Absorbant** : gel de silice.

Plantes étudiées	Rf	Composés mis en évidence
Satureja calamintha	0,93	-
	0,81	-
	0,72	Hydroquinone
	0,76	Catéchol
	0,56	-
Ajuga iva	0,92	-
	0,74	Résorcinol
	0,70	Pyrogallol
	0,56	-
	0,51	-
	0,48	-

Par cette comparaison, nous avons pu mettre en évidence deux composés dans les feuilles de Satureja calamintha, à savoir, l'hydroquinone et le catéchol et deux composés, le résorcinol et le pyrogallol, dans les feuilles de Ajuga iva.

#### IV. Extraction des saponosides

L'extraction alcoolique des feuilles des deux plantes a permis de déterminer le rendement en saponosides (**figure 16, annexe I**).



**Figure 16 : Rendement (%) en saponosides des espèces étudiées.**

Les résultats rapportent que les feuilles de *Satureja calamintha* renferment les saponosides avec un pourcentage plus élevé que celui des feuilles de *Ajuga iva*.

La teneur en saponosides de *Saccocalyx satueioides* et *Teucrium polium* étudiées par **Belmekki (2009)**, est de 1,9 et 2,65 respectivement, ces résultats sont plus importants que les notre.

## V. Pouvoir antioxydant des extraits de *Satureja calamintha* et *Ajuga iva*

### V.1. Méthode de la réduction de fer (FRAP)

L'activité antioxydante des extraits des plantes étudiées a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (**Benzie et Strain, 1996**). Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (**Li et al., 2008**).

La présence des réductants dans les extraits des plantes provoque la réduction de  $Fe^{3+}$ /complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent,  $Fe^{2+}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (**Chung et al., 2002**).

En d'autre terme, le système  $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$  confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi-quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox (**Amarowicz et al., 2004**).

Les figures 17 et 18 (annexe N, O) représentent le pouvoir réducteur des extraits des deux plantes étudiées et de l'acide ascorbique à différentes concentrations.

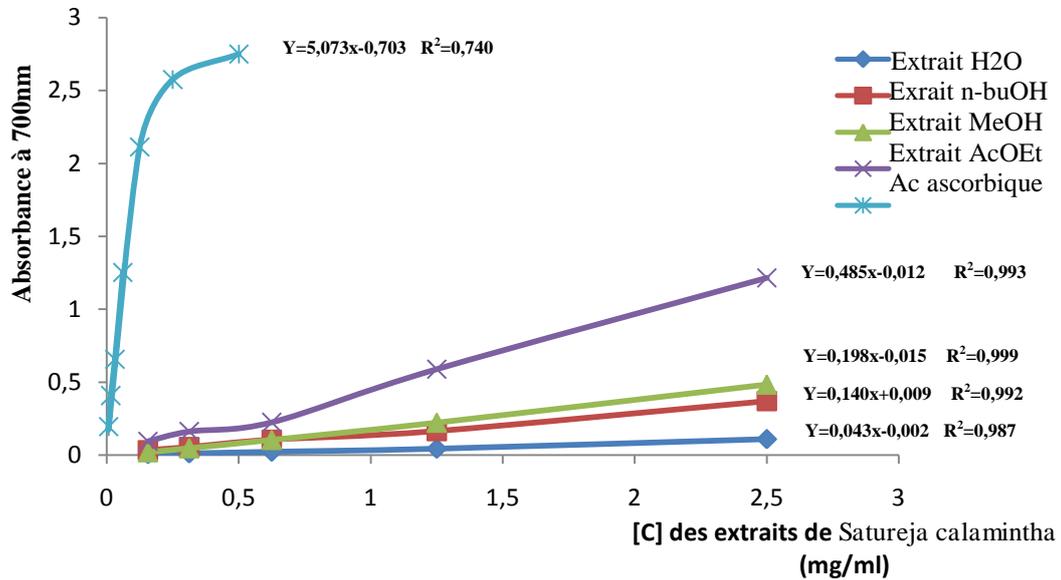


Figure 17 : Pouvoir réducteur des quatre extraits de l'espèce *Satureja calamintha*

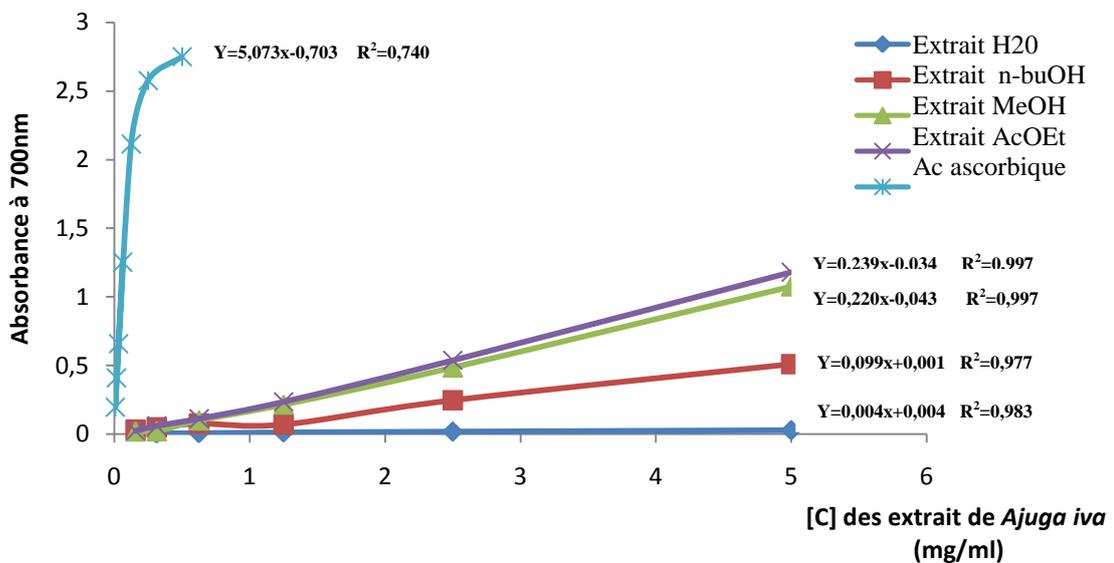


Figure 18 : Pouvoir réducteur des quatre extraits de l'espèce *Ajuga iva*

Ces résultats montrent que le pouvoir réducteur des extraits des deux plantes est dose dépendante (concentration dépendante). A la concentration de 2,5mg/ml, le pouvoir réducteur de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Satureja calamintha* est largement supérieur (DO=1,215) par rapport aux autres extraits, mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique.

D'après la **figure 17**, on constate que la fraction acétatique possèdent une bonne action vis-à-vis de  $Fe^{3+}$  présent dans la solution testée suivie de l'extrait méthanolique et la fraction butanolique, alors que l'extrait aqueux n'est actif qu'à partir de la concentration 1,25mg/ml où l'on enregistre une augmentation de l'absorbance de 0,045 à 0,111.

Il en est de même pour l'espèce *Ajuga iva*, tous les extraits possèdent un pouvoir réducteur inférieur à celui de l'acide ascorbique.

La **figure 18** montre que le pouvoir réducteur de l'extrait acétate d'éthyle est similaire à celui de l'extrait méthanolique mais, il est supérieur aux autres phases : butanolique et aqueuse.

A la concentration de 5mg/ml les extraits acétate d'éthyle et méthanolique s'avèrent plus puissant vis-à-vis de réduction de fer (les valeurs de DO= 1,18; DO=1,076, respectivement) et les extraits butanoliques et aqueux sont moins efficace, et leur DO successives est 0,51 et 0,028.

Il est à signaler que la phase acétate d'éthyle des deux plantes présente une activité antioxydante plus intéressante que les autres phases. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de **Chua et al., (2008)**, dont les résultats ont montré que leur fraction butanolique possède une forte puissance de réduction de fer suivie de l'extrait méthanolique ensuite l'extrait acétatique et l'extrait aqueux.

Le pouvoir réducteur des espèces *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* sont probablement dues à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réductants et inactivateurs des oxydants (**Siddhuraju et Becker, 2007**). Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jeong et al., 2004**)

Par ailleurs, la plupart des activités antioxydantes non enzymatiques telles que le piégeage du radical libre et l'inhibition de la peroxydation est mis en place par la réaction rédox (**Zhu et al., 2002**).

V.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

L'activité antioxydante des différents extraits de *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515nm (figure 19). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires (Majhenic et al, 2007).

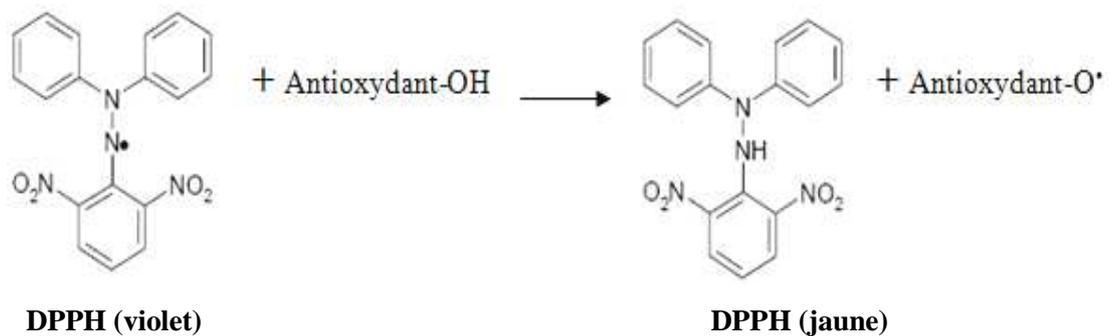


Figure 19 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Afin de comparer cette activité antioxydante avec celle de l'acide ascorbique, une courbe d'étalonnage réalisée par ce dernier a été tracée (figure 20, annexe J).

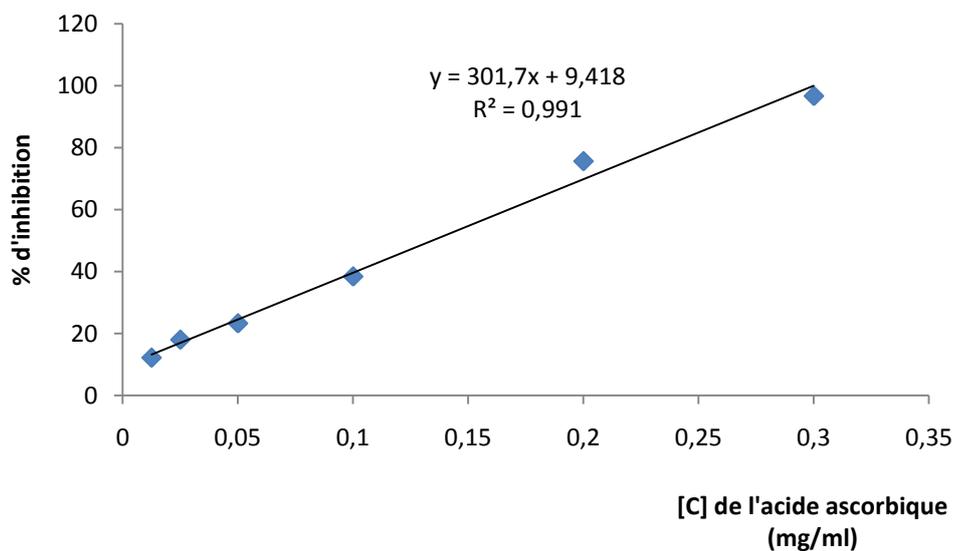


Figure 20 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

Les **figures (21, 22, 23, 24) annexes** correspondants (**K, L**) rapportent les résultats du pouvoir antioxydant des extraits de *Satureja calamintha* et de *Ajuga iva* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

D'une manière générale, tous les extraits testés méthanolique, aqueux, acétatique et butanolique ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 515nm selon leurs concentrations.

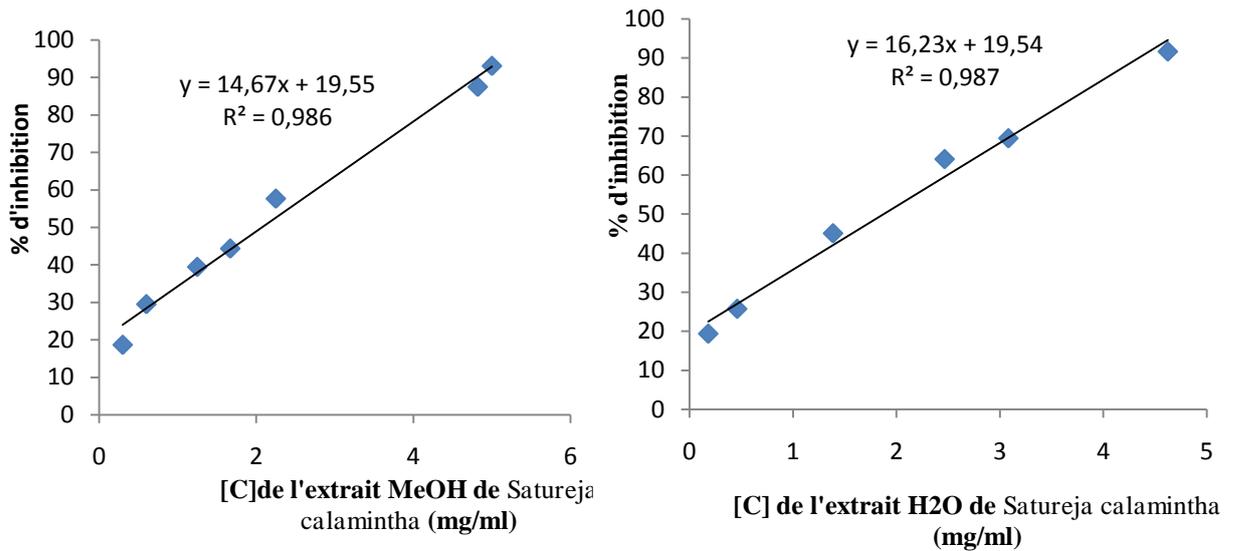
La **figure 21** montre que l'extrait méthanolique de *Satureja calamintha* présente un pourcentage d'inhibition comparable à celui de l'extrait aqueux, il est supérieur à 90% à des concentrations de l'ordre de 5mg/ml pour l'extrait méthanolique et de 4,624mg/ml concernant l'extrait aqueux.

La réduction de la solution méthanolique de DPPH augmente d'environ 90% à la concentration 5,58mg/ml de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Satureja calamintha* et de moins de 60% à 7,17 mg/ml de la fraction n- butanol de la même espèce (**figure 22**).

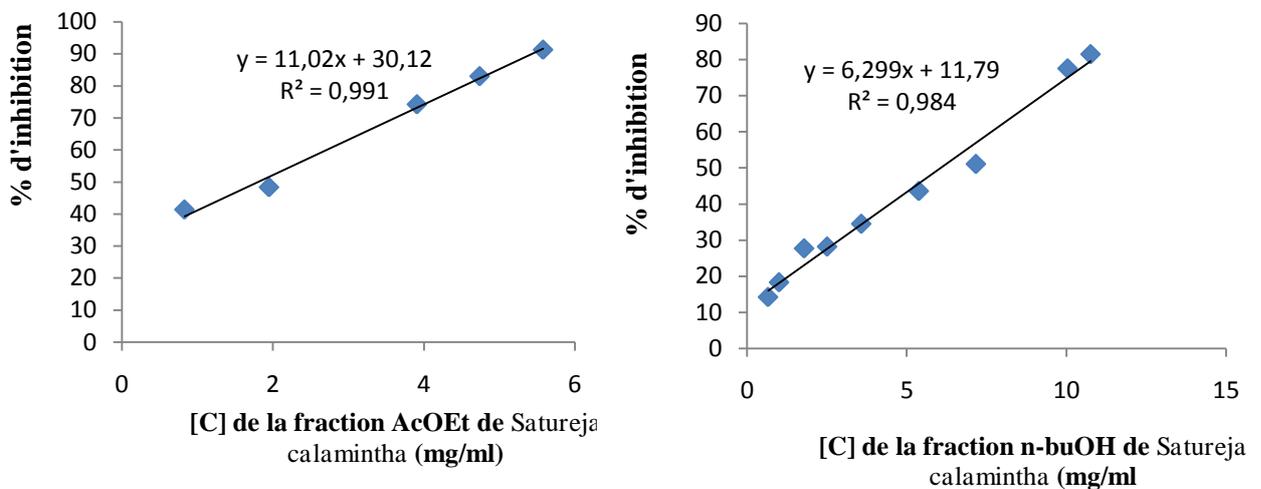
D'après les **figures 23 et 24**, l'extrait d'acétate d'éthyle de *Ajuga iva* paraît le plus actif par rapport aux autres extraits et on constate que l'activité de l'acétate d'éthyle est plus importante sur la réduction du DPPH à partir de la concentration 4,22mg/ml suivie de l'extrait méthanolique (4,48mg/ml) et butanolique avec une concentration deux fois plus importante.

L'extrait aqueux quant à lui présente un pourcentage d'inhibition supérieur à 80% à une concentration plus élevée de l'ordre de 46,3 mg/ml.

Ces résultats montrent que nos extraits possèdent une puissante activité à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH.



**Figure 21 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique et aqueux de Satureja calamintha.**



**Figure 22 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations de la fraction d'acétate d'éthyle et n-butanol de Satureja calamintha .**

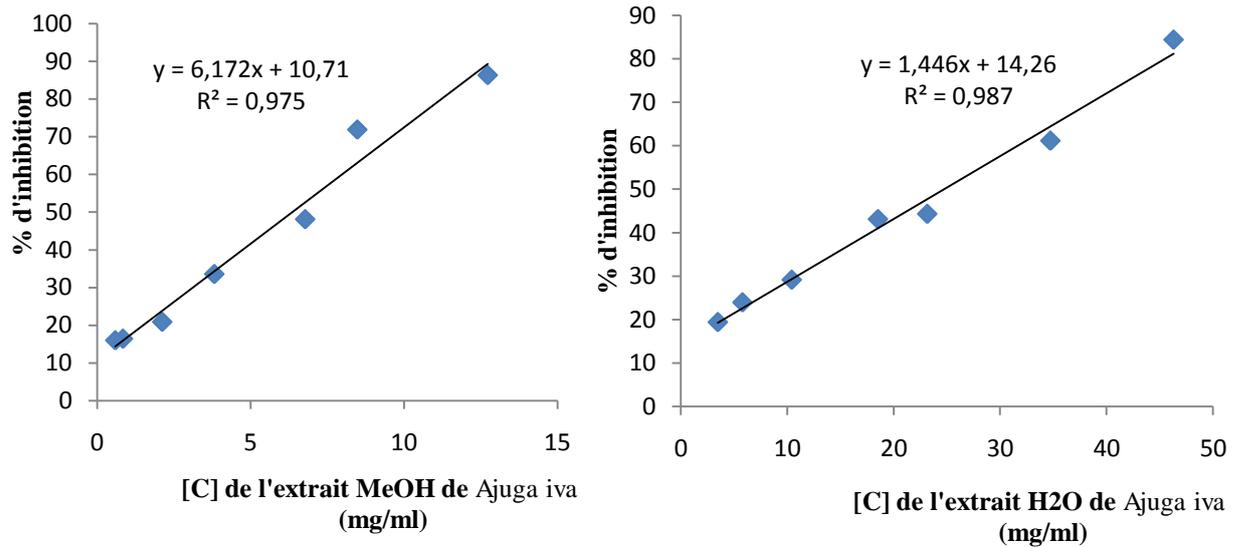


Figure 23 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique et aqueux de Ajuga iva.

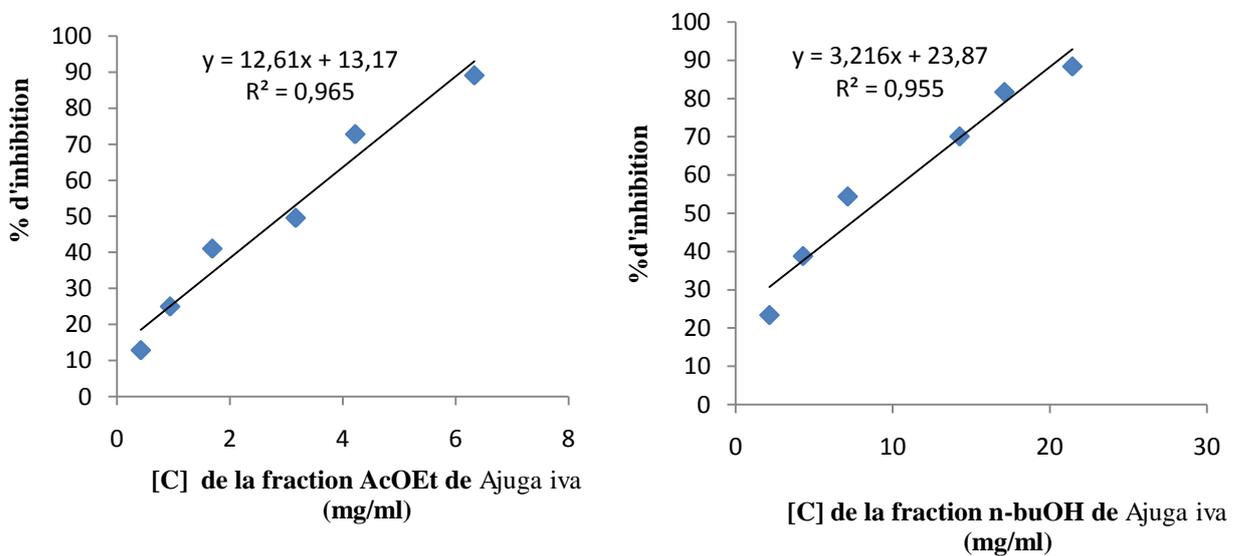


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations de la fraction d'acétate d'éthyle et n-butanol de Ajuga iva

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit deux paramètres :

- ✓ Le calcul de  $IC_{50}$  : il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution.

Les valeurs de  $IC_{50}$  des deux espèces étudiées *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* pour les différents extraits méthanolique, aqueux, acétatique et butanolique (**tableau 20**) ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire :  $y = ax + b$

Où  $y = 50\%$  (pourcentage de réduction de DPPH)

$x : IC_{50}$  (la concentration en extrait et de l'acide ascorbique)

- ✓ Le calcul du pouvoir antiradicalaire : (APR) qui est inversement proportionnel à l' $IC_{50}$  (**tableau 20**).

$$(APR=1/IC_{50})$$

**Tableau 20 : Valeurs des  $IC_{50}$  et le pouvoir antiradicalaire (ARP) des différents extraits des deux plantes.**

Plantes	Extraits	$IC_{50}$ (mg/ml)	ARP
<i>Satureja calamintha</i>	MeOH	2,075	0,482
	AcOEt	1,804	0,554
	n-buOH	6,066	0,164
	Aqueux	1,876	0,533
<i>Ajuga iva</i>	MeOH	6,36	0,157
	AcOEt	2,920	0,342
	n-buOH	8,125	0,123
	Aqueux	24,71	0,040
Acide ascorbique		0,134	7,462

À des fins comparatives un antioxydant standard est utilisé : l'acide ascorbique. Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec  $IC_{50}$  de l'ordre de 0,134mg/ml. La valeur d' $IC_{50}$  de l'acide ascorbique est supérieure à celle rapportée auparavant ( $IC_{50} = 0,42\text{mg/ml}$ ) par **Viuda-Martos et al., (2010)**.

Parmi les quatre extraits de *Satureja calamintha*, l'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux représentent les extraits les plus actifs, leur IC<sub>50</sub> successive est de 1,804mg/ml et 1,876mg/ml, suivi de l'extrait méthanolique avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 2,075mg/ml. Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par l'extrait n-butanolique avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre de 6,066mg/ml.

Pour l'espèce *Ajuga iva*, l'activité antiradicalaire de l'acétate d'éthyle s'est montrée plus forte que celle de l'extrait brut méthanolique et butanolique, eux même plus actifs que l'extrait brut aqueux. En comparaison avec l'acide ascorbique, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs.

En résumé, le pouvoir antiradicalaire des extraits peut être classé comme suit :

➤ **Pour l'espèce *Satureja calamintha* :**

Fraction d'acétate d'éthyle > extrait aqueux > extrait méthanolique > fraction n-butanol.

➤ **Pour l'espèce *Ajuga iva* :**

Fraction d'acétate d'éthyle > extrait méthanolique > fraction n-butanol > extrait aqueux.

L'étude comparative (**tableau 21**) montre que les valeurs de IC<sub>50</sub> de nos extraits méthanolique, aqueux et d'acétate d'éthyle correspondant à l'espèce de *Satureja calamintha* ainsi que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Ajuga iva* sont inférieure à celles de *Salvia pisidica* espèce de la même famille des lamiacées rapporté par (**Ozkan et al., 2010**) alors que, ces valeurs sont plus élevées par rapport aux autres espèces de la même famille à savoir : *Coleus aromaticus*, *Nepeta flavida*, *Teucrium polium*, et *Calamintha sylvatica*.

**Tableau 21: Comparaison des valeurs de IC<sub>50</sub> des différentes espèces de la famille des lamiacées**

Espèces	Extrait	IC <sub>50</sub>	Références bibliographique
<i>Coleus aromaticus</i> Benth	Aqueux	210µg/ml	<b>Kumaran et karunakaran, 2006</b>
<i>Nepeta flavida</i>	Méthanolique	63,2µg/ml	<b>Tepe et al., 2007</b>
<i>Teucrium polium</i>		20,1µg/ml	<b>Sharififar et al., 2009</b>
<i>Calamintha sylvatica</i> <i>Bromf subsp. ascendens</i>		58,44µg/ml	<b>López et al., 2007</b>
<i>Salvia pisidica</i>		4,88mg/ml	<b>Ozkan et al., 2010</b>

Il a été démontré par **Ćetković et al., (2007)** que l'extrait n-butanol est plus actif que les extraits acétatiques et aqueux de l'espèce *Satureja montana* ce qui n'est pas en accord avec nos résultats.

Pour le mécanisme de piégeage de radical, la réaction entre l'antioxydant et DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant. Certains composés réagissent rapidement avec DPPH, réduisant un nombre de molécules de DPPH égal au nombre de groupements hydroxyles (**Bondet et al., 1997**).

Par ailleurs, l'activité de piégeage de radical libre des flavonoïdes dépend de la présence du groupe OH, en particulier 3-OH. Les flavonoïdes avec 3-OH et 3',4'-catéchol s'avèrent 10 fois plus importants que le catéchol correspondant et les flavonoïdes avec un hydroxyle libre au C3 (3-OH) (**Heim et al., 2002**).

### **VI. Pouvoir antimicrobien**

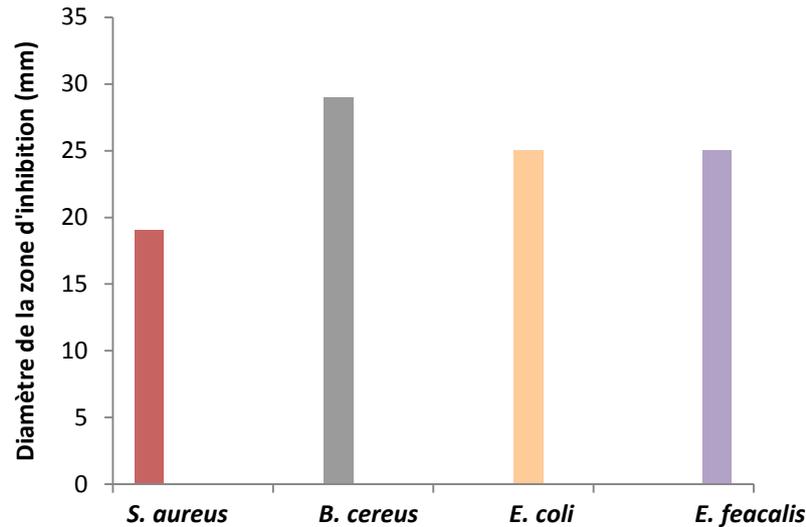
Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels extraits des plantes.

Lors de cette étude, nous avons testé l'action des extraits méthanolique et aqueux des deux espèces végétales *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* vis-à-vis de quelques souches bactériennes et mycéliennes.

Parallèlement, nous avons testé l'effet d'un antibiotique et d'un antifongique vis-à-vis de quelques souches bactériennes et mycéliennes.

#### **VI.1. Pouvoir antimicrobien de l'antibiotique**

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques. Les mesures de celles-ci sont présentées dans la figure suivante (**Figure 25, annexe Q**).

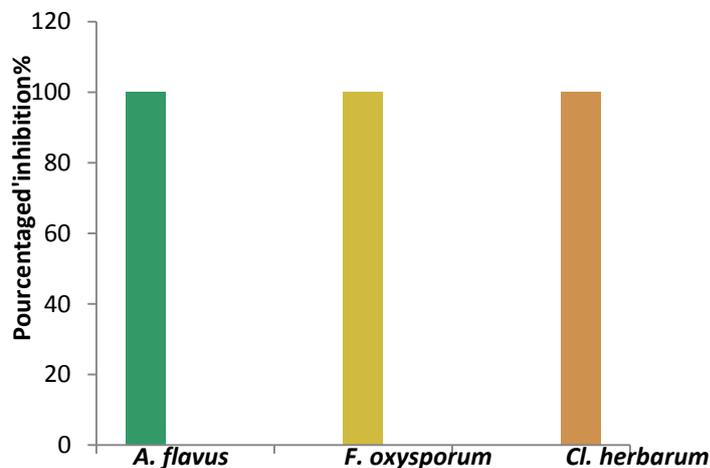


**Figure 25 : Diamètre des zones d’inhibition de ciprofloxacine relatif aux différentes souches bactériennes.**

D’après la **figure 25**, la ciprofloxacine semble avoir une action inhibitrice sur la croissance de toutes les souches testées et on constate que la souche *S. aureus* est moins sensible à l’antibiotique par rapport aux autres souches.

## VI.2. Le pouvoir antimicrobien de l’antifongique

Nous avons testé l’effet antifongique de la nystatine vis-à-vis de trois moisissures. La **figure 26 (annexe P)** rapporte les résultats du pourcentage d’inhibition déterminé à partir des diamètres des zones d’inhibition.



**Figure 26 : Pourcentage d’inhibition de la nystatine relatif aux souches fongiques**

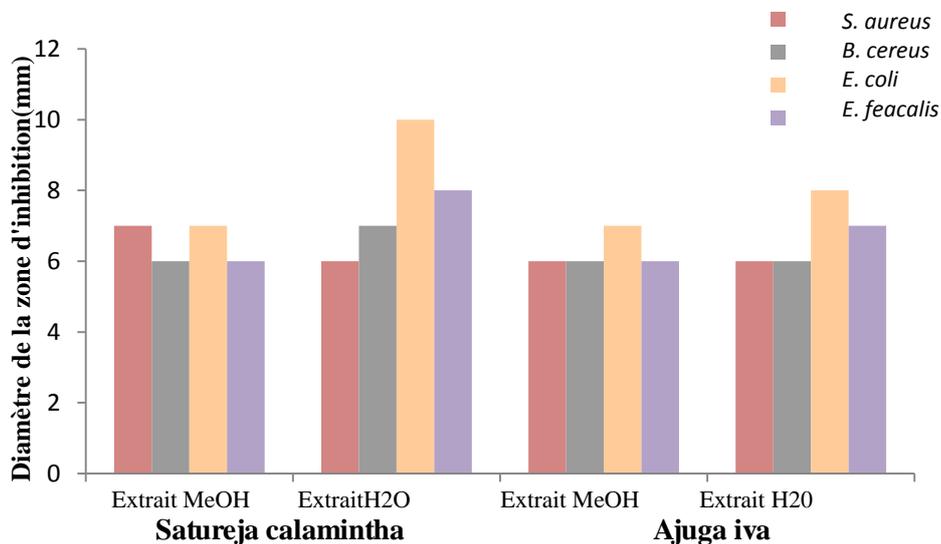
La croissance des souches fongiques : *A. flavus*, *F. oxysporum*, *Cl. Herbarum* en présence de l'antifongique est nulle. Il ressort que l'antifongique est actif sur toutes les souches testées, il est fongistatique.

### VI.3. Pouvoir antimicrobien des extraits

#### VI.3.1. Pouvoir antibactérien des extraits

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition des différents extraits ont été mesurées.

Les résultats obtenus sont donnés dans la **figure 27 (annexe R)**.



**Figure 27: Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des extraits aqueux et méthanoliques relatives aux différentes souches bactériennes.**

La **figure 27** montre que les extraits des deux plantes ont des diamètres d'inhibition inférieurs à 12 mm. Ce qui nous amène à dire que nos extraits ont une faible activité vis-à-vis de ces bactéries.

Il a été rapporté par **Ćetković et al., (2007) (tableau 22)** que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Satureja montana* présente une bonne activité contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* par rapport à l'extrait n-butanol.

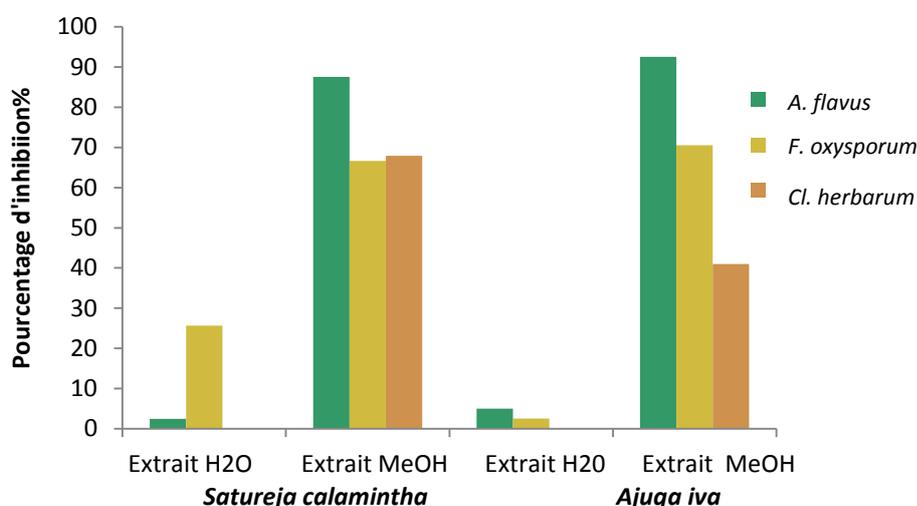
**Tableau 22: Les valeurs de diamètre des zones d'inhibition (mm) des extraits acétatique et butanolique de *Satureja montana* relatives aux souches bactériennes testées.**

Extraits Souches testées	Acétate d'éthyle	n- butanol
<i>P. aeruginosa</i>	16.7±0.52	-
<i>S. aureus</i>	15.3±0.58	10.0±0.0
<i>B. cereus</i>	11.0±0.0	10.0±0.0
<i>E. coli</i>	-	-

- : Pas d'action

### VI.3.2. Pouvoir antifongique des extraits

La figure 28 (annexe P) rapporte les résultats du pouvoir antifongique des extraits aqueux et organiques méthanoliques des deux espèces vis-à-vis des trois souches fongiques par la méthode de contact direct.



**Figure 28 : Pourcentage d'inhibition des extraits de *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* relatifs aux différentes souches fongiques.**

Les résultats obtenus ont montré que les extraits organiques méthanolique de *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* ont produit des zones d'inhibition plus grandes que les extraits aqueux.

L'action de l'extrait méthanolique de *Ajuga iva* est plus importante sur *Aspergillus flavus* (92,5%) et *Fusarium oxysporum* (70,5%), alors que, la souche *Cladosporium Herbarum* s'est montrée plus sensible vis-à-vis de l'extrait méthanolique de *Satureja calamintha* (67,94%) que celui de *Ajuga iva*.

On peut expliquer ces résultats par la différence de composition entre les deux extraits, l'alcool permettant une meilleure extraction de composés moins polaires comme des dérivés terpéniques, tels que ceux identifiés dans *Ajuga iva* (**Takasaki et al., 1998**) ou les flavonoïdes isolée de *Satureja parvifolia* (**Hernandez et al., 2000**).

Les composés phénoliques sont produits en réponse à l'infection microbienne par les plantes. Par conséquent, l'efficacité de ces substances évaluées in vitro ont montré une action inhibitrice sur les microorganismes. De nombreuses études ont montré une relation contradictoire entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir antimicrobien.

**Chabot et al., (1992)** rapporte que les composés les moins polaires comme les flavonoïdes manquant le groupement hydroxyle sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des microorganismes que ceux portant le groupe OH. D'autre part, **Mori et al., (1987)** ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne.

Pour cela nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires.

Une recherche supplémentaire sur la composition chimique de chaque extrait est plus que nécessaire pour comprendre l'évaluation de composés présentant l'activité antimicrobienne.

# Conclusion générale

La découverte de ressources naturelles du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

La présente étude a porté sur les espèces *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* qui appartiennent à la famille des *Lamiaceae*, une des familles les plus importantes dans la flore algérienne et les plus utilisées par les thérapeutes traditionnels. Elle a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique la présence des tanins, des flavonoïdes, des stérols et stéroïdes, des huiles volatiles et des saponosides. Les coumarines ont été mises en évidence seulement dans *Satureja calamintha*.

La détermination du rendement en composés phénoliques a montré la richesse des extraits bruts secs de l'espèce *Ajuga iva* (25%) issus de l'extraction aqueuse tandis que, l'extraction méthanolique a permis d'obtenir des rendements proches en extraits bruts secs : *Satureja calamintha* (8,58%) et *Ajuga iva* (6,43%).

Le dosage des phénols totaux des deux extraits méthanoliques a révélé des teneurs considérables dans *Satureja calamintha* (2,968mg/g) et *Ajuga iva* (1,323mg/g) alors que, la forte teneur a été enregistrée dans les extraits bruts aqueux des deux espèces.

D'autre part, le dosage des flavonoïdes a montré que les deux espèces *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* présentent des teneurs modérées de l'ordre de 1,280 mg/g et 1,050 mg/g respectivement dans les extraits bruts méthanoliques.

Les analyses par chromatographie sur couche mince des fractions acétate d'éthyle et *n*-butanol des flavonoïdes, obtenues par fractionnement de l'extrait brut méthanolique, correspondantes aux deux espèces étudiées, avec deux systèmes de solvant différents, ont montré la présence de flavonols et flavanols dont nous avons identifiés la rutine et la catéchine dans les feuilles de *Satureja calamintha* et la quercétine et la catéchine dans les feuilles de *Ajuga iva*.

Au cours de l'extraction sélective des tanins, le rendement le plus élevé a été obtenu pour l'espèce *Satureja calamintha* 3,96%. L'analyse par chromatographie sur couche mince a permis de séparer un certain nombre de constituants dont le résorcinol, le pyrogallol, l'hydroquinone et le catéchol.

L'estimation du rendement en saponosides a permis d'obtenir un taux plus élevé de 25% pour *Satureja calamintha*.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer et celle du piégeage de radical libre DPPH des extraits méthanolique et aqueux et des fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol correspondant aux deux espèces étudiées a montré que tous nos extraits possèdent un pouvoir antioxydant modéré en particulier les extraits organiques méthanoliques et la fraction d'acétate d'éthyle.

Il est à noter que le pouvoir réducteur de la fraction d'acétate d'éthyle de *Satureja calamintha* est largement supérieur par rapport aux autres extraits, mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique.

D'autre part, l'étude du pouvoir antioxydant de nos extraits par la méthode de piégeage du radical libre DPPH s'est montré modérée dont les valeurs de IC<sub>50</sub> sont classées dans l'ordre du pouvoir antioxydant suivant : fraction d'acétate d'éthyle *Satureja calamintha* (1,804) > extrait aqueux de *Satureja calamintha* (1,876) > extrait méthanolique de *Satureja calamintha* (2,075) > fraction d'acétate d'éthyle de *Ajuga iva* (2,920) > fraction n-butanol de *Satureja calamintha* (6,066) > extrait méthanolique de *Ajuga iva* (6,36) > fraction n-butanol de *Ajuga iva* (8,125) > extrait aqueux de *Ajuga iva* (24,71).

La comparaison de ces valeurs avec celle de l'antioxydant standard, l'acide ascorbique (0,134), nous a permis de déduire que le pouvoir antioxydant de l'ensemble des extraits testés est plus faible que celui de l'acide ascorbique.

Par ailleurs, l'étude du pouvoir antifongique des extraits méthanolique et aqueux des deux plantes vis-à-vis de trois souches mycéliennes a permis de visualiser une action inhibitrice plus intéressante de l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait aqueux.

Il est à signaler que l'action de l'extrait méthanolique de *Ajuga iva* est plus importante sur *Aspergillusflavus* (92,5%) et *Fusarium oxysporum* (70,5%), alors que, la souche *Cladosporium Herbariu* s'est montrée plus sensible vis-à-vis de l'extrait méthanolique de *Satureja calamintha* (67,94%) que celui de *Ajuga iva* .

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion de disque des extraits méthanolique et aqueux des deux plantes, nos résultats montrent que toutes les souches bactériennes testées sont plus au moins résistantes. On peut déduire que nos extraits sont faiblement actifs sur les souches bactériennes testées.

Les espèces *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* sont riches en métabolites secondaires, une exploitation de leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne implique une recherche plus poussée de ses principes actifs.

Un travail complémentaire s'impose en vue d'identifier les différentes molécules en particulier les composés phénoliques présents dans les extraits bruts secs et les flavonoïdes isolées des fractions acétate d'éthyle et n-butanol et les purifier en utilisant diverses techniques chromatographiques notamment la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et des méthodes spectrales pour l'élucidation structurale.

Evaluer et tester les différentes molécules isolées *in vivo* sur différents modèles biologique en vue de les utiliser à des fins thérapeutiques et de conservation des produits destinés à la consommation.

# Références bibliographiques

- Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J.A.; 2004.**  
Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies.  
Food Chemistry, **84**, 551–562.
- Arora A., Sairam R., Srivastava G. ; 2002.**  
Oxidative stress and antioxidative system in plants.  
Current Science, **82**, 1227-1238.
- Atik Bekkara F., Benhammou N., Panovska K.T. ; 2008.**  
Biological activity of essential oil and the extract of the extract of the phenolic compounds of *Inula viscosa* of the area of Tlemcen (Algeria).  
Advances in Food Science, **30**, 132-139
- Baba Aissa F. ; 2000.**  
Encyclopedie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique d'Orient et d'Occident. Ed. Librairie moderne Rouiba, 46.
- Baba Moussa F., Akpagana K., Bouchet P. ; 1998.**  
Comparaison de l'activité antifongique des feuilles et écorces de tronc de *Pteleopsis suberosa* G. Don (Combretaceae).  
Acta botanica gallica, **145 (3)**, 223-288.
- Bartosz G. ; 2003.**  
Generation of reactive oxygen species in biological systems.  
Comments on Toxicology, **9**, 5-21.
- Bassene E., Mahamat B., Lo m., Boye C.S, Faye B. ; 1995.**  
*Comparaison de l'activité antibactérienne de trois Combretaceae : C. micranthum, Guiera senegalensis et Terminalia avicennioides.*  
Fitoterapia, **66(1)**, 86-87.
- Beecher G. R. ; 2003.**  
Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake.  
J. Nutri., **133 (10)**, 3248S-3254S.
- Bekhechi C., Atik-Bekkara F., Abdelouahid E., Tomi F., Casanova J. ; 2007.**  
Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii* Boiss. Et Rent. from Algeria.  
J. Essent. Oil Res., **19**, 594-596.
- Bekhechi C., Boti J.B., Atik Bekkara F., Abdelouahid D. E., Casanova J., Tomi F. ; 2010.**  
Isothymol in Ajowan Essential Oil.  
Natural Product Communication, **5(7)**, 107-1110.
- Bekkara F., Jay M., Viricel M.R., Rome S. ; 1998.**  
Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation.  
Journal Plant and Soil, **203**, 27-36.

**Belarbi-Benmahdi M., Khaldi D., Beghdad C., Gouzi H., Bendimerad N., Hammouti B.; 2009.**

Physicochemical and nutritional study of argan oil (*Argania spinosa* L.) in south-western Algeria.

Pigment & Resin Technology, **38** (2), 96–99.

**Belmekki N. ; 2009.**

Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de *Saccocalyx satureioïdes*, *Salvia verbenaca* et *Teucrium polium* de la région Ouest d'Algérie. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers.

**Benabadji N., Ghezlaoui B-E., Bouazza M., Bendimerad N. ; 2010.**

Phytoécologie et composés secondaires d'un peuplement végétal steppique : Cas de *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) Rehder dans le Chott El-Gharbi (Oranie-Algérie)

Mediterranea Serie de Estudios Biologicos, Epoca II N°21.

**Benbrook C.M. ; 2005.**

Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Rapport sur l'état des connaissances scientifiques.

The Organic Center for Education and Promotion, 45.

**Bendimerad N., Taleb Bendiab S.A., Benabadji A.B., Fernandez X., Valette L., Lizzani-Cuvelier L. ; 2005.**

Composition and antibacterial activity of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.)Rehder essential oil from Algeria.

J. Agric. Food Chem., **53**, 2947-2952.

**Bendimerad N., Taleb Bendiab S. A., Breme K., Fernandez X. ; 2007.**

Essential oil composition of aerial parts of *Sinapis arvensis* L. from Algeria.

J. Essent. Oil Res., **19**, 206-208.

**Bendimerad N., Bekhechi C., Belmekki N., Fernandez X. ; 2009**

Chemical analysis and antimicrobial activity of *Saccocalyx satureioides* Coss.et Dur. essential oil from southwestern Algeria.

International Journal of Essential Oil Therapeutics, **3**, 1-5.

**Benhammou N. ; 2006.**

Etude des activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles et des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* de la région de Tlemcen. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers.

**Benhammou N., Atik Bekkara F., Panovska K.T. ; 2007.**

Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* Desf.

Advances in Food Science (AFS), **29(23)**, 155-161.

- Benhammou N., Atik Bekkara F., Panovska K.T. ; 2008.**  
Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts.  
African Journal of Pharmacy and Pharmacology, **2**, 022-028.
- Bennaghmouch L., Hajjaji N., Zellou A., Cherrah Y. ; 2001.**  
Étude pharmacologique d'Ajuga iva.  
Annales Pharmaceutiques Françaises, **59(4)**, juillet, 284.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. ; 1996.**  
The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay.  
Analytical Biochemistry, **239**, 70–76.
- Birt D.F., Hendrich S., Wang W. ; 2001.**  
Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids.  
Pharmacol. Ther., **90 (3)**, 157-177.
- Bondet V., Williams W.B., Berset C. ; 1997.**  
Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method.  
Lebensmittel-Wissenschaft Un Technologie, **30**, 609-615.
- Bondm M.R., Al-Hillo Y., Lamara K., Ladjel S., Bruno M., Piozzi F., Simmonds M.S.J.; 2000.**  
Occurrence of the antifeedant 14,15-dihydroajugapitin in the aerial parts of Ajuga iva from Algeria.  
Biochemical Systematics and Ecology, **28**, 1023-1025.
- Bouderbala S., Bouchenak M., Lamri-Senhadji M.Y., Prost J., Lacaille-Dubois M. ; 2008.**  
Les iridoïdes d'Ajuga iva atténuent la cholestérolémie et améliorent le transport inverse du cholestérol, chez le rat rendu hypercholestérolémique.  
Nutrition Clinique et Métabolisme, **22**, 63.
- Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. ; 2007.**  
Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian Thymus capitatus Hoff. et link.  
Food Chemistry, **105**, 146-155.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.; 1995.**  
Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.  
Lebensmittel- Wissenschaft and Technology, **28**, 25-30.
- Bravo L. ; 1998.**  
Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.  
Nutr. Rev., **56 (1)**, 317-333.
- Broadasky T. F., Lewis C., Eble T.E. ; 1976.**  
Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat.  
J. Chromatogr., **123**, 33-44.

**Bruneton J. ; 1993**

Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 2<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier. Paris, 274-285.

**Bruneton J. ; 1999.**

Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier. Paris, 199-388.

**Ćetković G.S., Čanadanović-Brunet J., Djilas S.M., Tumbas V.T., Markov S.L., Ćetković D.D. ; 2007.**

Antioxidant Potential, Lipid Peroxidation Inhibition and Antimicrobial Activities of *Satureja Montana* L. subsp. *Kitaibelii* Extracts. Int. J. Mol. Sci., **8(10)**, 1013-1027.

**Chabot S., Bel-Rhlid R., Chênevert R., Piché Y. ; 1992.**

Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoïd compounds under CO<sub>2</sub>-enriched conditions. New Phytol., **122**, 461-467.

**Chua M-T., Tung Y-T, Chang S-T ; 2008.**

Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. Bioresource Technology, **99**, 1918–1925.

**Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., Chou S-T. ; 2002.**

Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **50**, 2454–2458.

**Coll J. ; 2007.**

New minor ecdysteroids from *Ajuga iva* (Labiatae) and complete <sup>1</sup>H-NMR assignment of cyasterone. Asociacion de Quimicos del Instituto Quimico de Sarria, Barcelona, Espagne, **64(528)**, 242-250.

**Diallo A. ; 2005.**

Etude de la phytochimie et des activites biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako, Mali.

**Di Carlo G., MascoJo N., Izzo A.A., Capasso F. ; 1999.**

Flavonoids: olei and new aspects of a class of naturaJ therapelitic drllgs. Life Sci., **65**, 337-353.

**Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N.; 2006.**

Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry, **97**, 654–660.

**Duraffourd C., Lapraz J-C., Chemli R. ; 1997.**

La plante médicinale de la tradition à la science. 1<sup>er</sup> congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222.

**El-Hilaly J., Lyoussi B., Wibo M., Morel N. ; 2004.**

Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology*, **93**, 69–74.

**El-Rhaffari L., Zaid A. ; 2004.**

Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée.

Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes, 293-318.

**Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. ; 2008.**

Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie*, **331**, 372-379.

**Fandohan P., Gbenou J., Gnonlofin B. ; 2004.**

Effet of essential oil on the growth of Fumonisin contamination in corn. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6824-6829.

**Favier A. ; 2003.**

Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.

*L'actualité chimique*, **11**, 108-115.

**Francisco A., Tomas-Barber N., Syed Z-H., Maria I-G. ; 1988.**

The Distribution of Methylated Flavones in the Lamiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, **16**, 43-46.

**Ghedira K., Chemli R., Richard B., Zeches M., Le-Men-Olivier L. ; 1991.**

Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle de Tunisie: étude des parties aériennes d'*Ajuga iva* (L.) Schreb.

*Plantes Médicinales et Phytothérapie*, **25**, 100-111.

**Ghedira K. ; 2005.**

Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique.

*Phytothérapie*, **3(4)**, 162-169.

**Girre L. ; 2001.**

Les plantes et les médicaments. L'origine végétale de nos médicaments. Edition Delachaux et Niestlé SA, Paris, 138.

**Gohari A.R., Saeidnia S., Gohari M.R., Moradi-Afrapoli F., Malmir M., Hadjiakhoondi A. ; 2010.**

Bioactive flavonoids from *Satureja atropatana* Bonge. *Natural Product Research*, **23**, 609-14.

**Gören A.C., Topçu G., Bilsel G., Bilsel M., Wilkinson J.M., Cavanagh Heather M.A.; 2004.**

Analysis of essential oil of *Satureja thymbra* by hydrodistillation thermal desorber and headspace GC/MS techniques and its antimicrobial activity.  
Natural Product Research, **18 (2)**, 189-195.

**Grualbo R., Sesé J. A., Villar L. ; 1993.**

Nouvelle localité de *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Labiatae) dans les Pyrénées espagnoles.  
Le monde des plantes, **447**, 7-11.

**Guignard J-L. ; 1979.**

Abrégé de biochimie végétale. 2<sup>ème</sup> Edition Masson, Paris, 84.

**Guignard J-L. ; 1998.**

Abrégé botanique. 2<sup>ème</sup> Edition Masson. Paris, 199.

**Hamden K., Carreau S., Jamoussi K., Ayadi F., Garmazi F., Mezgeni N., Elfeki A. ; 2008.**

Inhibitory effects of 1alpha, 25dihydroxyvitamin D3 and *Ajuga iva* extract on oxidative stress, toxicity and hypo-fertility in diabetic rat testes.  
J. Physiol. Biochem., **64(3)**, 231-239.

**Harborne J.B. ; 1988.**

The flavonoids, advances in research since 1980. Ed. Chapman et Hall. London.

**Havsteen B. H. ; 2002.**

The biochemistry and medical significance of the flavonoids.  
Pharmacol. Therapeutics, **96**, 67-202.

**Heim K.E., Tagliaferro A.R., et Bobilya D.J. ; 2002.**

Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationship.  
Journal of Nutritional Biochemistry, **13(10)**, 572-584.

**Hennebelle T. ; 2006.**

Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiacées productrices d'antioxydants. *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota Pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologiques de Lille, Lille 1. Ecole Doctorale Sciences de la Matière du rayonnement et de l'Environnement. France.

**Hernandez N.E., Tereschuk M.L., Abdala L.R. ; 2000.**

Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina).  
Journal of Ethnopharmacology, **73**, 317-322.

**Hong X.Y., Wan M., Dong H., But P.P.H., Foo L.Ycap ; 2000.**

Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease.  
Biological and Pharmaceutical Bulletin, **23(9)**, 1072-1076.

**Hubert J. ; 2006.**

Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries.

**Ildiko B., Maria-Loredana S., Dominca R., Simona Codruta C. ; 2009.**

HPTLC quantification of some flavonoids in extracts of *Satureja hortensis* L. obtained by use of different techniques.  
Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, **22(1)**, 25-28.

**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 Agriculture and Food Chemistry, **52**, 3389–3393.

**Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F. ; 2002.**

Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. 1<sup>ère</sup> Edition De Boeck Université. Paris, 383.

**Kaur S.J., Grover I.S., Kumar S. ; 2000.**

Modulatory effects of tannin fraction isolated from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*.  
Food and Chemical Toxicology, **38(12)**, 1113-1119.

**Kim D.O., Chun O.K., Kim Y. J., Moon H.Y., Lee C.Y. ; 2003.**

Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums.  
J. Agric. Food Chem., **51(22)**, 6509-6515.

**Koechlin-Ramonatxo C. ; 2006.**

Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases.  
Nutrition Clinique et Métabolique, **20**, 165-177.

**Kolodziej H., Kayser O., Latte k.P., Ferreira D. ; 1999.**

Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution both method.  
Planta Medica, **65(5)**, 444-446.

**Kueny-Stotz M. ; 2008.**

Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylum sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols et aux proanthocyanidines. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Chimie organique, Université Louis Pasteur-Strasbourg, France.

**Kumaran A., karunakaran R.J. ; 2006.**

Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*.  
Food Chemistry, **97**, 109–114.

**Lahouel M., Amedah S., Zellagui A., Touil A., Rhouati S., Benayache F., Leghouchi E., et Bousseboua H. ; 2006.**

The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effect and flavonoids concentration.

Thérapie, **61(4)**, 347-355.

**Lamendin H. ; 2007.**

Soignez votre bouche par les plantes : remède d'hier et aujourd'hui. 5<sup>ème</sup> Edition L'Harmattan. Paris, 34.

**Lamy S., Blanchette M., Michaud-Levesque J., Lafleur R., Durocher Y., Moghrabi A., Barrette S., Gingras D., Béliveau R. ; 2007.**

Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation.

Carcinogenesis, **27(5)**, 989-996.

**Lea A.G.H. ; 1978.**

The phenolic of ciders: oligomeric and polymeric procyanidins.

J. Sci. Food and Agric., **29**, 471-479.

**Lesueur D., Serra D.de Rocca, Bighelli A., Hoi T.M., Ban N.K., Thai T.H., Casanova J. ; 2007.**

Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveolata* Merrill ex Dandy from Vietnam.

Flavour and Fragrance Journal, **22**, 317-321.

**Li H-B., Wong C-C., Cheng K-W., Feng C. ; 2008.**

Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants.

Lebensmittel- Wissenschaft and Technology, **41(3)**, 385-390.

**Liu L.Z., Fang J., Zhou Q., Hu X., Shi X., Jiang B.H.; 2005.**

Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer.

Mol. Pharmacol., **68(3)**, 635-643.

**Lopez V., Akerreta S., Casanova E., Garcia-mina J.M., Yolanda Caverro R., Calvo Maria I. ; 2007.**

In vitro antioxidant and anti-rhizopus activities of lamiaceae herbal extracts.

Plant Foods for Human Nutrition, **62**, 151-155.

**Loukkas A. ; 2006.**

Atlas des parcs nationaux algériens. Edition Diwane, 87-88.

**Majhenic L., Kerget M.S., Knez Z. ; 2007.**

Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts.

Food Chemistry, **104**, 1258-1268.

**Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A. ; 2007.**

Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes.

African Journal of Biotechnology, **6(12)**, 1358-1368.

**Males Z., Medić-Šarić M. ; 2001.**

Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* waldst. Et Kit.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **24**, 353-359.

**Manach C., WilJiamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C.; 2005.**

Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. 1. Review of 97 bioavailability studies.

Am. J. Clin. Nutr., **81(1)**, 230S-242S.

**Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P.; 2004.**

Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments.

Médecines Sciences, **20**, 458-464.

**Mazari K., Bendimerad N., Bekhechi C., Fernandez X. ; 2010**

Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L.

Journal of Medicinal Plants Research, **4(10)**, 959-964.

**Mchedlishvili D., Kuchukashvili Z., Tabatadze T., Davitaia G. ; 2005.**

Influence of flavonoids isolated from *Saturejahortensis* L. on hypercholesterolemic rabbits.

Indian Journal Pharmacol., **37**, 259-260.

**Memelink J., Verpoort R., Kijine J.W. ; 2001.**

Organization of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism.

Trends in Plant Science, **6**, 212-221.

**Michaelakis A., Spiridon A.T., Georgios Koliopoulos G., Nikos G.C. ; 2007.**

Essential Oils of *Satureja* Species : Insecticidal Effect on *Culex pipiens* Larvae (Diptera: Culicidae).

Molecules, **12**, 2567-2578.

**Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. ; 2000.**

The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.

Pharmacol. Rev., **52(4)**, 673-751.

**Mihajilov-Krstev T., Radnović D., Kitić D., Zlatković B., Ristić M., Branković S. ; 2009.**

Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. Cent.

Eur. J. Biol., **4(3)**, 411-416.

- Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lühje S. ; 2004.**  
Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species.  
Phytochemistry Reviews, **3**, 173-193.
- Miller N-J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. ; 1996.**  
Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls.  
FEBS Letters, **384**, 240-242.
- Mori A., Nishino C., Enoki N., Tawata S ; 1987.**  
Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*.  
Phytochemistry, **26**, 2231-2234.
- Mota R., Thomas G., Barbosa Filho J.M. ; 1985.**  
Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L.  
Journal of Ethnopharmacology, **13**, 289-300.
- Motiejūnaitė O., Peičulytė D.; 2004.**  
Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality.  
Medicina (Kaunas), **40(8)**, 787-794.
- Naghbi F., Mosaddegh M., Motamed S-M, Ghorbani A. ; 2005.**  
Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology.  
Iranian Journal of Pharmaceutical Research, **2**, 63-79.
- Njus D., Kelley P.M. ; 1991.**  
Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo.  
FEBS. Letters, **284(2)**, 147-151.
- Nonaka GI., Nishioka I., Nishi-Zawa A., Yamagishi T., Kashiwada Y., Dutschman GE., Bodner AJ., Kilkuskie RE., Cheng YC., Lee KH. ; 1990.**  
Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells.  
Journal of Natural Products, **53(3)**, 587-595.
- Okwu D.E. et Josiah C. ; 2006.**  
Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants.  
African Journal of Biotechnology, **5 (4)**, 357-361.
- Oyaizu, M. ; 1986.**  
Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine.  
Japanese Journal of Nutrition, **44**, 307-315.
- Ozkan G., Sagdic O., Gokturk R-S., Unal O., Albayrak S. ; 2010.**  
Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia persidica*.  
Food Science and Technology, **43**, 186-190.

**Paolini V., Dorchies Ph., Hoste H. ; 2003.**

Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre.  
Alter. Agri., 17-19.

**Pourrut B. ; 2008.**

Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*.  
Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité : Ecotoxicologie. France.

**Pousset J.L., Rey JP., Levesque J., Corsaget P., Galen FX. ; 1993.**

Hepatitis B surface antigen (HBs Ag) inactivation and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition in vitro by *Combretum glutinosum* perr.(Combretaceae), extracts.  
Phytotherapy Research, **7** (1), 101-102.

**Quezel P., Santa S. ; 1963.**

Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, 788-789.

**Ramos S. ; 2007.**

Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways to cancer chemoprevention.  
J. Nutr. Biochem., **18**(7), 427-442.

**Robinet F-G. ; 1951.**

Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse.  
Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences Techniques. Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich, Suisse. (Prom. No. 1937)

**Saadaoui B., Bekir J., Akrouit J., Ammar S., Mahjoub A., Mars M. ; 2007.**

Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien.  
Revue des régions arides, **1**, 87-92.

**Samarth R.M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A.; 2008**

Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract  
Food Chemistry, **106**, 868-873.

**Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-calixto F. ; 1998.**

A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.  
Journal Sci. Technology International, **8**, 121-137.

**Satrani B., Arah Abdella Fechtal Mohamed, Talbi Blaghen, Chaouch A. ; 2001.**

Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du Maroc.  
Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique, **94(956)**, 241-250.

**Scalbert A., Morand C., Manach C., Remesy C. ; 2002.**

Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health.  
Biomed. Pharmacother., **56(6)**, 276-282.

**Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldini M. ; 2009.**

Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L.  
Food Chemistry, **112**, 885-888.

**Siddhuraju P., Becker K. ; 2007.**

The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts.  
Food Chemistry, **101(1)**, 10-19.

**Singleton V.L., Rossi J.A. ; 1965.**

Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.  
American Journal of Enology and Viticulture, **16**, 144-153.

**Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. ; 1999.**

Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.  
Methods in Enzymology, **299**, 152-178.

**Spencer J.P., Abd-el-Mohsen M.M., Rice-Evans C.; 2004.**

Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity.  
Arch. Biochem. Biophys., **423**, 148-166.

**Steinmetz M.D., Elias R., Maillard C., Boudon G., Régli P., Balansard G., Ghastin C. ; 1993.**

Recherche d'une activité antitumorale de saponosides triterpéniques.  
2<sup>ème</sup> colloque Européen d'ethnopharmacologie et 11<sup>ème</sup> conférence internationale d'ethnomédecine. Heidelberg, 24-27.  
Médicaments et Aliments : *L'Approche Ethnopharmacologique*, 331-332.

**Takasaki M., Yamauchi I.I., Haruna M., Konoshima T. ; 1998.**

New glycosides from *Ajuga decumbens*.  
Journal of Natural Products, **61**, 1105–1109.

**Taleb-Senouci D., Krouf H., Ghomari M.A., Lacaille-Dubois M.A., Bouchenak M. ; 2008.**

Effect of an aqueous extract of *Ajuga iva* on glycaemia, reverse cholesterol transport and atherogenic ratios in rats with streptozotocin-induced diabetes.  
Proceedings of the Nutrition Society, **67(OCE4)**, E194.

**Tepe B., Daferera D., Tepe A.-S., Polissiou M., Sokmen A. ; 2007.**

Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey.  
Food Chemistry, **103**, 1358–1364.

**Toufektsian M-C., de Lorgeril M., Nagy N., Salen P., Donati M.B., Giordano L., Mock H-P., Peterek S., Matros A., Petroni K., Pilu R., Rotilio D., Tonelli C., de Leiris J., BoucherF., Martin C. ; 2008.**

Chronic Dietary Intake of Plant-Derived Anthocyanins Protects the Rat Heart against Ischemia-Reperfusion Injury.  
Journal of Nutrition, **138**, 747-752.

**Trease E., Evans W.C. ; 1987.**

Pharmacognosy Billiaire. Editions Tindall London 13, 61-62.

**Tu Y.C., Lian T.W., Yen J.H., Chen Z.T., Wu M.J. ; 2007.**

Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin.  
J. Agric. Food Chem., **55(24)**, 9969-9976.

**Vârban D.I., Duda M., Vârban R., Muntean S. ; 2009.**

Research Concerning the Organic Technology for Satureja Hortensis L. Culture.  
Bulletin UASVM Agriculture, **66(2)**, 225-229.

**Viuda-Martos M., Yolanda R.N., Sánchez Z., Fernández-López F., José A. ; 2010.**

Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet.  
Flavour Fragrance Journal, **25**, 13–19.

**Wenzel U., Kunlz S., Brendel M. D., Daniel H. ; 2000.**

Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells.  
Cancer Res., **60(14)**, 3823-3831.

**Williams C.A., Grayer R.J. ; 2004.**

Anthocyanins and other flavonoids.  
Nat. Prod. Rep., **21(4)**, 539-573.

**Woodman O.L., Chan ECh. ; 2004.**

Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies.  
Am. J. Clin. Nutr., **81**, 243S-255S.

**Yang C., Landau M., Huang M. T., Newmark H.L.; 2001.**

Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds».   
Anna. Rev. Nutr., **21**, 381- 406.

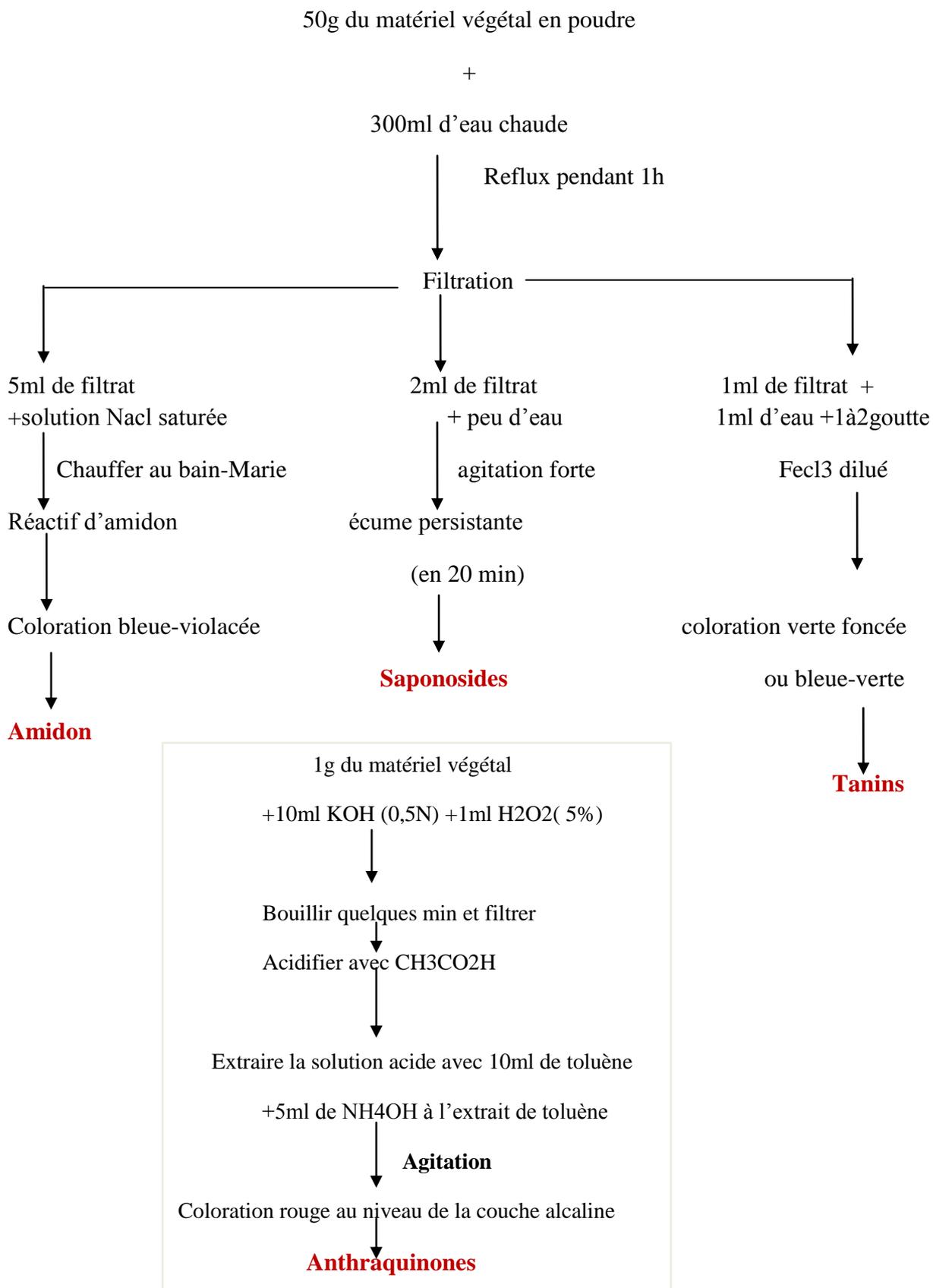
**Zhu Q.T., Hackman R.M., Ensunsa J.L., Holt R.R., Keen C.L. ; 2002.**

Antioxidative activities of oolong tea.  
Journal of Agricultural and Food Chemistry, **50**, 6929–6934.

# Annexes

## Annexe A : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud



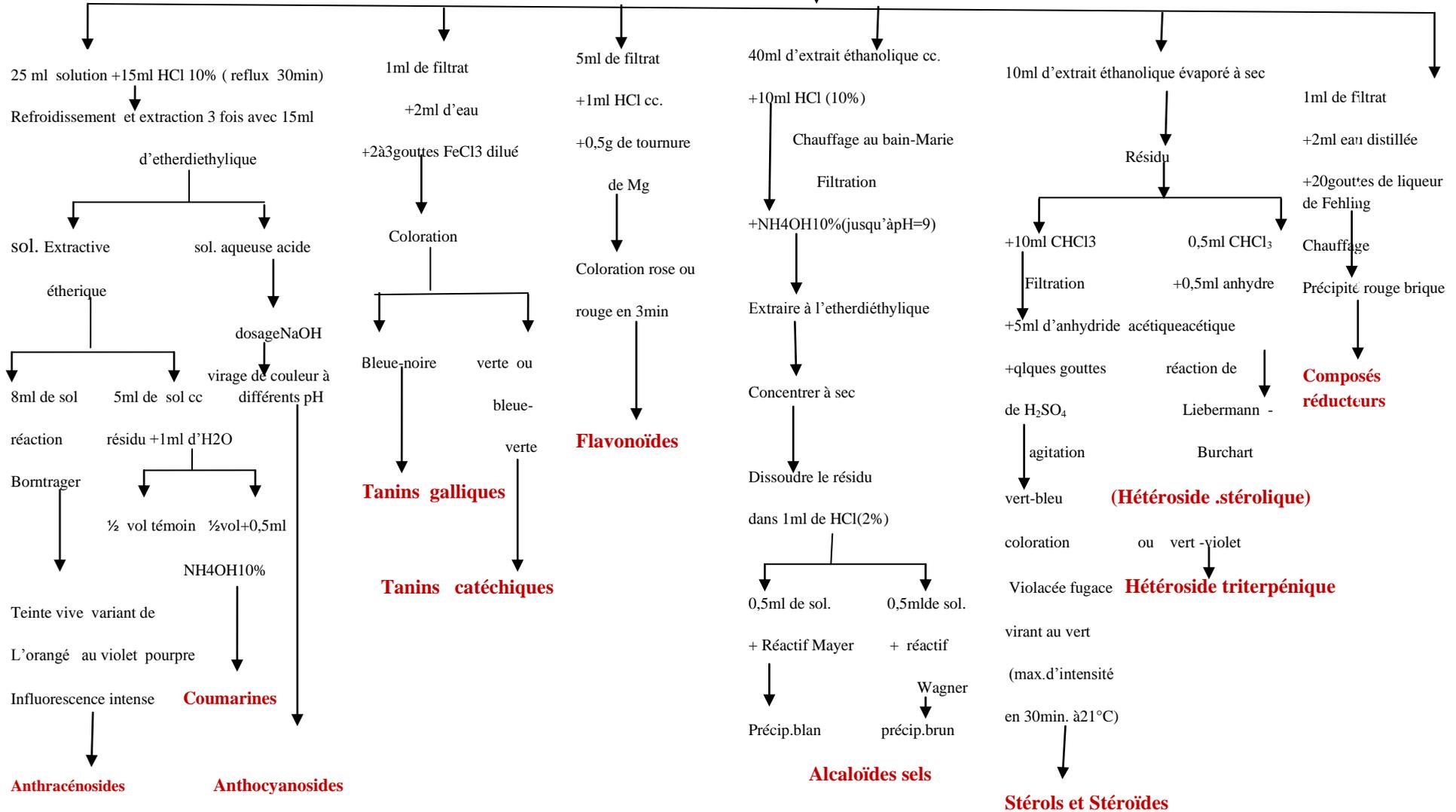
## Annexe B : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol

50g du matériel végétal + 300ml d'éthanol

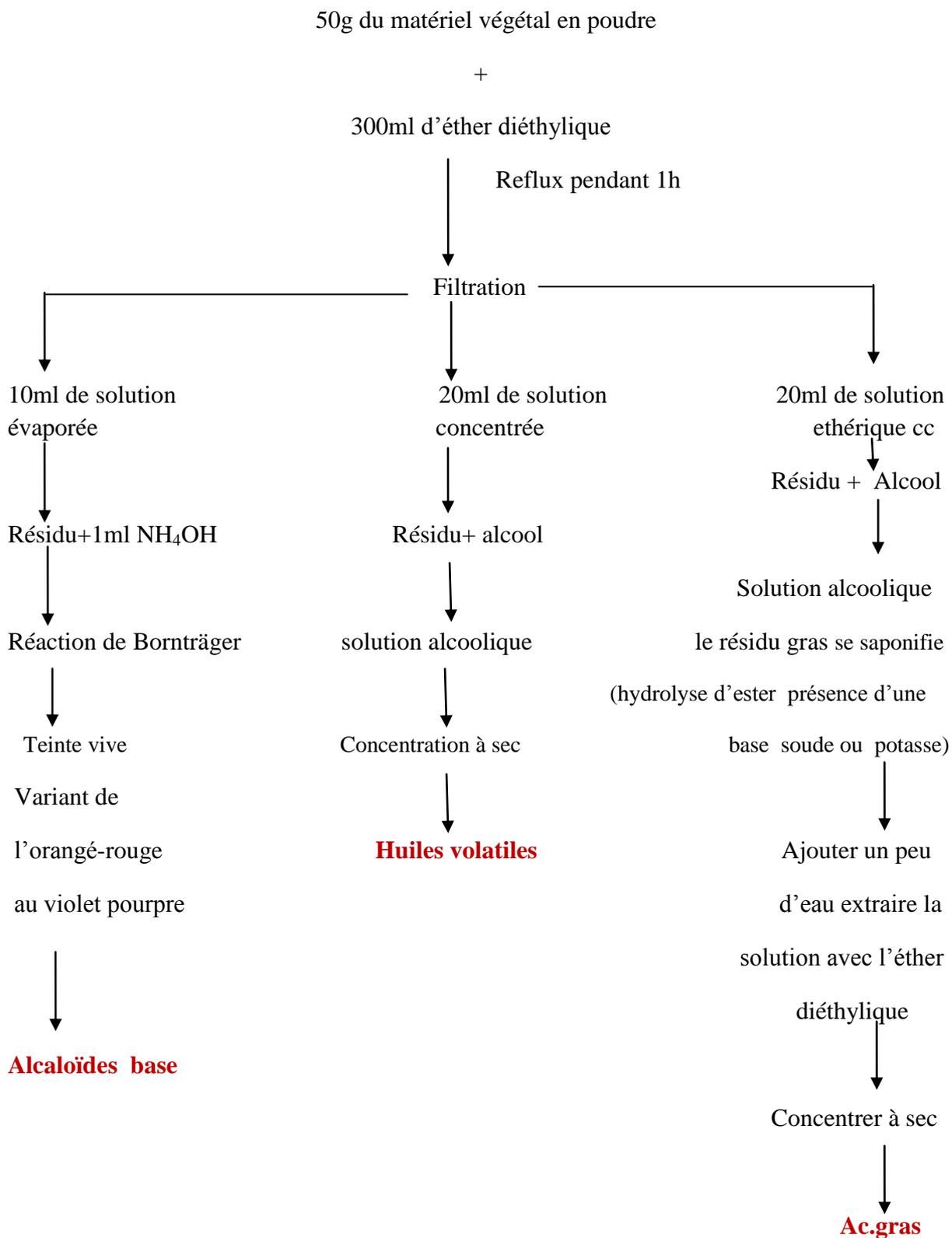
Reflux pendant 1h

Filtration

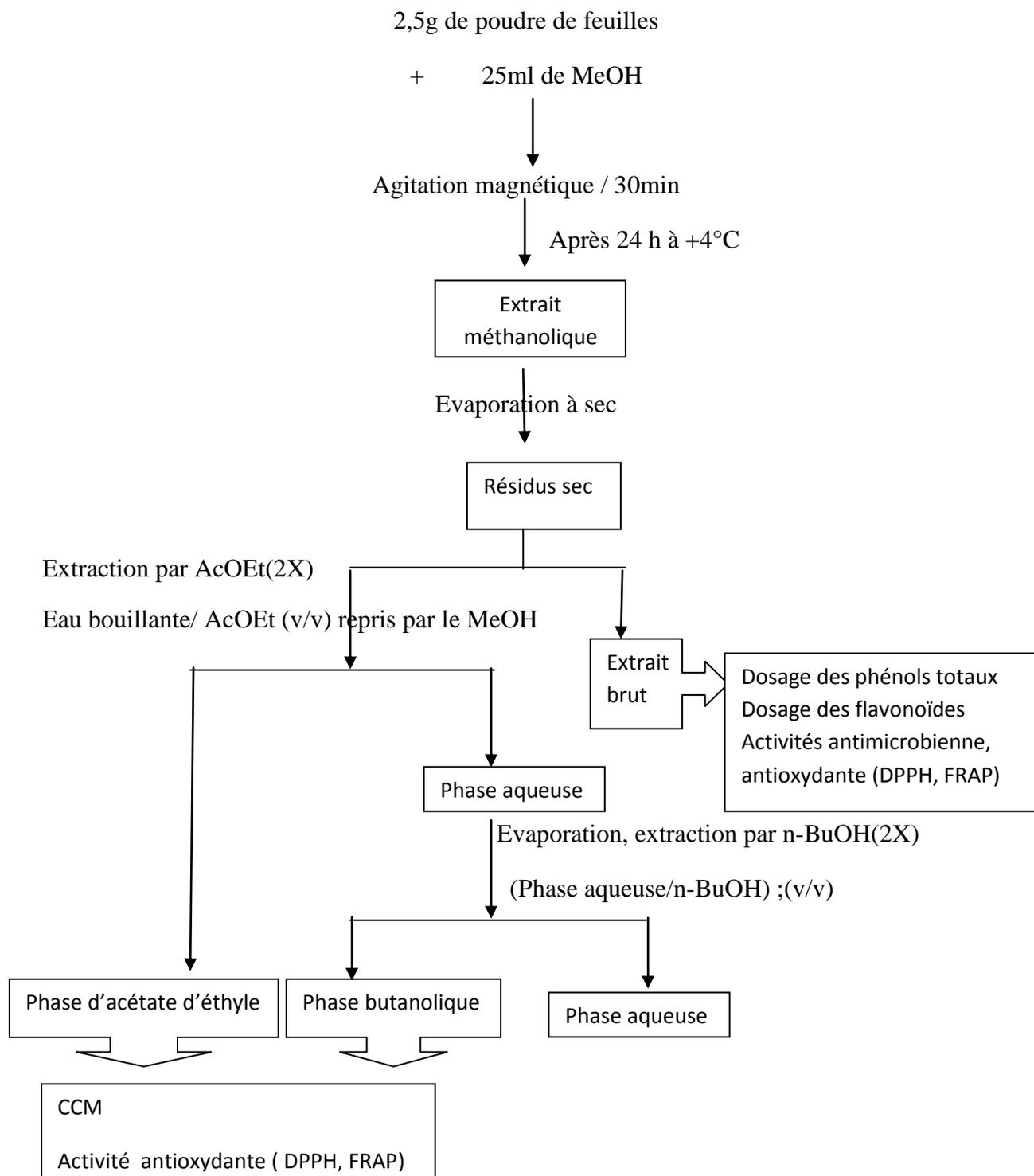


## Annexe C : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec de l'éther diéthylique



## Annexe D : Schéma d'extraction des flavonoïdes



**Annexe E :** Rendement (%) en extrait bruts méthanolique et aqueux (g/100g de la matière sèche) des espèces étudiées.

Plante	Extrait	Rendement (%)
Satureja calamintha	Méthanolique	8,58
	Aqueux	6,43
Ajuga iva	Méthanolique	22,19
	Aqueux	25

**Annexe F :** Valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Concentration en (mg/ml)	0,015625	0,01875	0,03125	0,0375	0,0625	0,075	0,1	0,125
Absorbance à 765nm	0,122	0,203	0,313	0,398	0,644	0,726	1,025	1,380
	0,159	0,202	0,308	0,406	0,578	0,764	1,036	1,240
	0,177	0,193	0,327	0,401	0,644	0,805	1,045	1,260
Moyenne de l'absorbance	0,1526	0,1993	0,316	0,4016	0,622	0,765	1,03533	1,2933

**Annexe G :** Valeurs moyennes de l'absorbance de la courbe d'étalonnage de la catéchine.

Concentration en (mg/ml)	4,637	9,274	13,911	18,548	23,185	27,822	32,459	37,096
Moyenne de l'absorbance à 515 nm	0,09	0,186	0,264	0,408	0,493	0,632	0,738	0,933

**Annexe H :** Rendement (%) en tanins des deux espèces étudiées.

Plantes	Rendement(%)
Satureja calamintha	3,96
Ajuga iva	1,648

**Annexe I :** Rendement (%) en saponosides des espèces étudiées.

Plantes	Rendement (%)
Satureja calamintha	1,264
Ajuga iva	0,316

**Annexe J :** Pourcentage de réduction de l'absorbance du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.

Concentration de l'acide ascorbique en (mg/ml)	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3
DO moyenne	0,824	0,769	0,720	0,578	0,229	0,0315
% de DPPH à 515nm	12,15	17,96	23,24	38,37	75,58	96,64

**Annexe K :** Pourcentage de réduction de l'absorbance du DPPH en fonction des concentrations des extraits méthanolique, AcOEt, BuOH et aqueux de *Satureja calamintha*.

Plante	Extraits	Concentration de l'extrait en (mg/ml)	DO(valeurs moyennes)	% de réduction du DPPH
<i>Satureja calamintha</i>	Méthanolique	5	0,047	93,25
		4,82	0,219	87,49
		2,25	0,419	57,66
		1,5	0,480	41,25
		0,602	0,564	18,76
		0,301	0,602	13,5
		0,289	0,677	10,52
		0,15	0,700	8,58
	AcOEt	5,58	0,022	91,25
		4,74	0,092	82,98
		3,91	0,176	74,2
		1,95	0,317	48,32
		0,83	0,438	41,34
		0,41	0,684	20,12
	n-buOH	10,76	0,150	81,45
		10,04	0,182	77,50
		7,17	0,396	51,05
		5,38	0,408	43,56
		3,58	0,530	34,48
		2,51	0,581	28,18
		1,79	0,585	27,68
		1,004	0,661	18,29
	Aqueux	0,66	0,694	14,21
		4,624	0,052	91,66
		3,083	0,087	69,44
		2,466	0,380	64,09
		1,387	0,437	45,08
0,46		0,514	25,72	
	0,18	0,584	19,35	

**Annexe L :** Pourcentage de réduction de l'absorbance du DPPH en fonction des concentrations des extraits méthanolique, AcOEt, BuOH, et aqueux de *Ajuga iva*.

Plante	Extraits	Concentration de l'extrait en (mg/ml)	DO(valeurs moyennes)	% de réduction du DPPH
<i>Ajuga iva</i>	Méthanolique	4,48	0,195	71,9
		12,73	0,096	86,35
		14,85	0,079	88,76
		6,78	0,360	48,12
		3,819	0,461	33,57
		2,121	0,549	20,89
		0,84	0,580	16,42
		0,59	0,583	15,99
	AcOEt	6,33	0,123	89,10
		4,22	0,325	72,8
		3,165	0,437	49,59
		2,11	0,452	47,86
		1,688	0,511	41,06
		0,94	0,633	25,02
		0,422	0,755	12,91
		n-buOH	21,45	0,088
	17,12		0,125	81,7
	14,26		0,148	70,09
	7,13		0,244	54,38
	4,28		0,371	38,79
	2,14		0,620	23,36
	1,42		0,669	17,3
	Aqueux	46,3	0,141	84,40
		34,725	0,351	61,17
		23,15	0,503	44,35
		18,89	0,514	43,14
		10,4175	0,640	29,20
		5,7875	0,687	24,00
3,4725		0,728	19,46	

**Annexe M :** les valeurs de l'absorbance de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique selon la méthode de FRAP.

<b>Concentration de l'ac.ascorbique(mg/ml)</b>	0,5	0,25	0,125	0,06125	0,03125	0,01562	0,00781
<b>DO moyenne</b>	2,749	2,575	2,113	1,253	0,658	0,409	0,196

**Annexe N:** Valeurs de l'absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits (méthanolique, acétate d'éthyle, butanolique) de Satureja calamintha selon la méthode de FRAP.

<b>Concentrations (mg/ml)</b>	<b>Densité optique</b>			
	<b>Extrait MeOH</b>	<b>Fraction AcOEt</b>	<b>Fraction n-BuOH</b>	<b>Extrait aqueux</b>
2,5	0,484	1,215	0,37	0,111
1,25	0,223	0,59	0,165	0,045
0,625	0,105	0,226	0,106	0,024
0,3125	0,048	0,163	0,055	0,013
0,15625	0,021	0,096	0,035	0,008

**Annexe O :** Valeurs de l'absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits (méthanolique, acétate d'éthyle, butanolique) de Ajuga iva selon la méthode de FRAP.

<b>Concentrations (mg/ml)</b>	<b>Densité optique</b>			
	<b>Extrait MeOH</b>	<b>Fraction AcOEt</b>	<b>Fraction n-BuOH</b>	<b>Extrait aqueux</b>
5	1,076	1,18	0,51	0,028
2,5	0,485	0,537	0,247	0,018
1,25	0,215	0,235	0,07	0,012
0,625	0,1	0,112	0,077	0,007
0,3125	0,02	0,059	0,048	0,005

**Annexe P :** Pourcentage d'inhibition de la Nystatine et les extraits méthanolique et aqueux de *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* relatif aux différentes souches fongiques.

Espèces \ Souches		A. flavus	F. oxysporum	C.herbarum
Satureja calamintha	Extrait MeOH	87,5	66,66	67,94
	Extrait aqueux	2,5	25,64	0
Ajuga iva	Extrait MeOH	92,5	70,51	41,02
	Extrait aqueux	5	2,56	0
Nystatine		100	100	100

**Annexe Q :** Diamètre (mm) des zones d'inhibition de l'antibiotique et du DMSO relatif aux différentes souches bactériennes.

Souches étudiées	Ciprofloxacine (5µg/disque)	DMSO
Escherichia coli	25	6
Enterococcus feacalis	25	6
Staphylococcus aureus	19	6
Bacillus cereus	29	6

**Annexe R :** Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches en présence des extraits aqueux et méthanoliques de *Satureja calamintha* et *Ajuga iva*

	Saturejacalamintha		Ajuga iva	
	Extrait MeOH	Extrait aqueux	Extrait MeOH	Extrait aqueux
E. coli	7	10	7	8
E.feacalis	6	8	6	7
S. aureus	7	6	6	6
B. cereus	6	7	6	6

## Résumé

L'étude des espèces *Satureja calamintha* et *Ajuga iva* appartenant à la famille des Lamiaceae, a porté sur un screening phytochimique visant à caractériser les différentes familles de composés chimiques contenus dans les feuilles, puis l'extraction sélective des classes dont le test est positif. Deux extraits bruts secs ont été préparés à partir de ces deux espèces l'un organique méthanolique, l'autre aqueux. Les rendements sont de l'ordre de 8,58% et 22,19% respectivement pour *Satureja calamintha* et d'environ 6,43% et 25% respectivement pour *Ajuga iva*.

Le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes effectués sur ces extraits bruts ont été déterminés à partir des courbes d'étalonnage d'acide gallique et catéchine respectivement. Le rendement en tanins est supérieur à celui des saponosides dans les feuilles des deux espèces.

L'analyse par CCM des fractions de flavonoïdes et des tanins a permis de révéler la présence de la rutine, la catéchine et l'hydroquinone dans les feuilles de *Satureja calamintha*, et la quercétine, la catéchine le résorcinol et le pyrogallol dans les feuilles de *Ajuga iva*.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) et celle du piégeage de radical libre DPPH des extraits méthanolique et aqueux et des fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol a montré que l'ensemble de nos extraits possèdent un pouvoir antioxydant modéré en particulier les extraits méthanolique et la fraction d'acétate d'éthyle. Par ailleurs l'extrait aqueux de *Satureja calamintha* a présenté une remarquable activité vis-à-vis du radical libre DPPH.

L'effet antifongique des extraits méthanoliques des deux plantes est plus important que celui de l'extrait aqueux. Par ailleurs, nous avons constaté que les extraits méthanoliques et aqueux sont faiblement actifs sur les souches bactériennes.

**Mots clés:** *Satureja calamintha*, *Ajuga iva*, étude phytochimique, composés phénoliques, flavonoïdes, pouvoir antioxydant, pouvoir antimicrobien.

## Abstract

The study on species *Satureja calamintha* and *Ajuga iva*, belong to the Lamiaceae family on a phytochemical screening to characterizing the different families of chemical compounds in the leaves, in addition to the selective extraction of classes when the test is positive. Two dry methanolic and aqueous extracts were prepared from these two species. Yields are respectively 8,58% and 22,19% for *Satureja calamintha*, and 6,43% and 25% respectively for *Ajuga iva*.

Total phenols and flavonoids content of the dry extracts were determined by graphic display of gallic acid and catechin respectively. The yield of tannins was higher than that of saponins in the leaves of the two species.

Analysis of flavonoids and tannins extracts by thin layer chromatography allowed us to reveal the presence of rutin, catechol and hydroquinone in the leaves of *Satureja calamintha*. Within the leaves of *Ajuga iva* quercetin, catechol, resorcinol, and pyrogallol were identified.

The antioxidant activity of organic and aqueous extracts, ethyl acetate fraction and butanolic fraction were evaluated using two different methods, namely ferric reducing power (FRAP) and free radical scavenging activity (DPPH). The results showed that the various extracts have moderate activity, particularly, methanolic and ethyl acetate extracts. Besides the aqueous extracts of *Satureja calamintha* presented an average potent to DPPH radical-scavenging.

The antifungal activity of the methanolic extracts of the two species is more important than aqueous extract. Moreover, the methanolic and aqueous have lower activity towards bacterial species.

**Key words:** *Satureja calamintha*, *Ajuga iva*, phytochemical study, phenolic components, flavonoids, antioxidant power, antimicrobial power.

## المخلص

يُدرج هذا البحث ضمن دراسة بعض ال نباتات من عائلة الشفوية (Lamiacées) فقد تم استخلاص المركبات الكيميائية الموجودة في أوراق النابطة (*Satureja calamintha*) والشندغورة (*Ajuga iva*). تم تحضير المستخلصات العضوية الميتانولية والمائية حيث سجل مردود 8,58% و 22,19% على التوالي لكل من *Satureja calamintha* و حوالي 6,43% et 25% بالنسبة لنبات *Ajuga iva*.

كما أمكن إجراء تحاليل كمية لافينولات و الفلافونيدات بواسطة المنحنيات البيانية لحمض الغاليك و الكاتشين على التوالي. وتحديد مردود الدباغ كان مرتقعا مقارنة بالصابونوزيدات في أوراق كل من النباتات.

أظهر التحليل الكرماتوغرافي لمستخلصات الفلافونيدات و الدباغ على الطبقة الرقيقة، وجود الروتين، الكاتشين و الهيدروكينون في أوراق النابطة. و بين التحليل أيضا وجود الكاتشين، الكارتسين، البيروغالول و الريزورسينول في أوراق الشندغورة .

أثبتت دراسة النشاط المضاد للأكسدة المستعملة على كل من المستخلصات العضوية و المائية للنباتات من خلال طريقة إرجاع الحديد و تثبيط الجذر الحر DPPH نتائج ملموسة خاصة مستخلص الكحول الميتيلي و مستخلص خلات الإثيل. كما بينت النتائج أيضا أن المستخلص المائي للنباطة أظهر نشاطا معتبرا فيما يخص تثبيط الجذر الحر DPPH.

وبالنسبة للتجارب المضادة للفطريات، فقد بينت أن المستخلصات الميتانولية للنباتين لها فعالية على مقاومة أغلب الفطريات المجهرية المستخدمة لهذا الغرض مقارنة مع المستخلصات المائية ، و من جهة أخرى، تعد المستخلصات الميتانولية و المائية غير فعالة على مقاومة نمو البكتيريا.

**الكلمات المفتاحية:** *Satureja calamintha* ، *Ajuga iva* ، دراسة فيطوكيميائية، مكونات الفينولين، الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة، مضادات ميكروبية.