

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen

Faculté des Sciences

Département de Chimie

MEMOIRE



Présenté pour l'obtention du Diplôme de Master en Chimie

Option : Molécules Bioactives: *Synthèses et Applications*

Présenté Par M^r : BENMILOUD Kamal

Thème

**Criblage phytochimique, activités
antioxydantes et anticandidose des
extraits de *Nepeta amethystina* (Gouzeia)**

Soutenu le 27 /05/2014 devant le jury composé de :

Présidents	Boufeldja Tabti Saïd Ghalem	Professeur Professeur	Université de Tlemcen Université de Tlemcen
Examineurs	Hocine Allali Nouria Merad Meriem Merad DIB Mohamed el Amin Djabou Nassim	Professeur MCA MCA MCA MCA	Université de Tlemcen Université de Tlemcen Université de Tlemcen Université de Tlemcen Université de Tlemcen
Invité	Alain Muselli	HDR	Université de Corse(France)
Encadreur	Mourad Bendahou	Professeur	Université de Tlemcen

Année Universitaire: 2013 - 2014

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen

Faculté des Sciences

Département de Chimie

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme de Master en Chimie

Option : Molécules Bioactives: *Synthèses et Applications*

Présenté Par M^r : BENMILOUD Kamal

Thème

**Criblage phytochimique, activités
antioxydantes et anticandidose des
extraits de *Nepeta amethystina* (Gouzeia)**

Soutenu le 27 /05/2014 devant le jury composé de :

Présidents	Boufeldja Tabti Saïd Ghalem	Professeur Professeur	Université de Tlemcen Université de Tlemcen
Examineurs	Hocine Allali Nouria Merad Meriem Merad DIB Mohamed el Amin Djabou Nassim	Professeur MCA MCA MCA MCA	Université de Tlemcen Université de Tlemcen Université de Tlemcen Université de Tlemcen Université de Tlemcen
Invité	Alain Muselli	HDR	Université de Corse(France)
Encadreur	Mourad Bendahou	Professeur	Université de Tlemcen

Année Universitaire: 2013 - 2014



Dédicace

Je dédie ce travail à ma mère, qu'elle trouve ici

toute ma gratitude pour leur soutien tout au long

de mes études.

A mes soeurs et mes frères

A tous mes collègues et amies

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire des substances naturelles bioactives (LASNABIO) et au laboratoire de microbiologie appliquée à l'agro-alimentaire au biomédical et à l'environnement (LAMAABE), sous la direction de monsieur M. Bendahou professeur au au Département de Biologie, Faculté SNV/STU, Université ABB de Tlemcen. Je tiens à lui formuler mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance pour l'honneur qu'il a fait d'avoir accepté la direction de ce mémoire.

Je remercie Messieurs Boufeldja Tabti et Saïd Ghalem professeurs au département de chimie, faculté des sciences, université ABB de Tlemcen d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de mon mémoire de master.

Je tiens à souhaiter le bien venu et remercier A. Muselli, Dr HDR à l'université de Corse d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie ardemment madames N. Merad et M. Merad, maîtres de conférences A au département de chimie, faculté des sciences, université ABB de Tlemcen, pour l'honneur qu'ils ont fait d'avoir accepté de siéger à mon jury de mémoire.

Je tiens à remercier chaleureusement monsieur le professeur H. Allali et messieurs M.A. Dib et N. Djabou, maîtres de conférences A au département de chimie, faculté des sciences, université ABB de Tlemcen, d'avoir accepté de faire partie du jury de mon mémoire de master.

Je remercie également le professeur J. Costa directeur du laboratoire de Chimie des Produits Naturels, UMR-CNRS 6134, Corti, France, pour la réalisation des analyses CPG et CPG/SM des extraits.

J'exprime mes fortes gratitude à C. Bellahcène, F. Benbelaid et A. Khadir, étudiants doctorants à LAMAABE, pour leur aide à la réalisation des tests biologiques.

Pour n'oublier aucune personne, je tiens à remercier infiniment tous les gens qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire en particulier madame le professeur S. Merghache, mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Merci à toutes et à tous....

Liste des abréviations

% : Pourcentage

[] : Concentration

Abs : Absorbance

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

ARP : Puissance Anti-Radicalaire (ou Puissance Antioxydante)

UFC : Unité formant colonie

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

cm : centimètre

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde

DPPH· : Radical 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl

EF : Extrait Flavonoïdique

ETOH : Ethanol

FRAP : Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (*Ferric reducing/antioxidant power*)

HCl : Acide Chlorhydrique

HE : Huile Essentielle

MH : Mueller Hinton

N. amethystina : *Nepeta amethystina*

Qté : Quantité

UI : Unité Internationale

UV : Ultra Violet

µg : Microgramme

µl : Microlitre

Liste des figures

Figure 1 : <i>Nepeta amethystina</i>	4
Figure 2: structure de népétalactone.	6
Figure 3: Classification des polyphénols	10
Figure 4 : Structure du 2-phényle chromane.....	11
Figure 5 : Structure générale des flavonoïdes	11
Figure 6: Structures des squelettes de base des flavonoïdes.....	12
Figure 7: Structure des anthocyanosides.....	12
Figure 8 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).....	13
Figure 9: Cycle «biofilmisation - planctonisation».....	17
Figure 10: protocole d'extraction des flavonoïdes.....	26
Figure 11: Courbe d'étalonnage des polyphénols	33
Figure 12: Teneur en polyphénols totaux (g/100g de poids sèche de la plante).....	33
Figure 13: Courbe d'étalonnage des flavonoïdes	34
Figure 14: Teneur en flavonoïdes (g/100g da matiere végétale)	34
Figure 15: Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.	35
Figure 16: Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de BHT.....	35
Figure 17: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations d'HE et l'extrait de l'hydrolat par rapport à l'acide ascorbique et BHT.....	36
Figure 18: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits (aqueux, éthanolique, éthérique).....	37
Figure 19: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations des fractions flavonoïdiques (brute ; acétate d'éthyle ; 1-buthanol).....	38
Figure 20: Pouvoir réducteur de l'huile essentielle; l'extrait l'hydrolat; les extraits; les fractions flavonoïdique et BHT	40
Figure 21: Pouvoir réducteur de fer de l'huile essentielle; et l'extrait de l'hydrolat et des extraits (éthanolique; étherique; aqueux); et des fractions flavonoïdiques (brute; acétate d'éthyle; 1- buthanol) et BHT	42
Figure 22: Diametres des zones d'inhibition en millimetres (mm)	44
Figure 23: Résultats de la détermination de la concentration inhibitrice de biofilm	45
Figure 24: Densité de l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat.....	58

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique de l'HE de <i>N. amethystina</i> d'Espagne	6
Tableau 2: Résultats des tests phytochimiques sur <i>Nepeta amethystina</i>	30
Tableau 3: Rendements et teneurs relatives des constituants de l'HE et de l'extrait d'hydrolat.....	31
Tableau 4: IC ₅₀ des extraits naturels et des standards.....	39
Tableau 5 : Résultats du pouvoir anticandida par la méthode de Vincent.....	43
Tableau 6: Résultats de la détermination de la concentration inhibitrice de biofilm.....	44

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
CHAPITRE I: PRESENTATION DE <i>Nepeta amethystina</i>	4
I.1.Description botanique :.....	5
I.2.L'utilisation de la plante:	5
I.3.Classification	5
I.4.Composition chimique de l'huile essentielle de <i>N. amethystina</i>	5
CHAPITRE II: GENERALITE SUR LES HUILES ESSENTIELLES ET LES FLAVONOIDES	7
II.1. Généralités sur les huiles essentielles.....	7
II.1.1. Définition.....	7
II.1.2. Composition chimique	7
II.1.3. Propriétés physico-chimiques des HE.....	7
II.1.4. Domaines d'utilisation	8
II.2. Généralités sur les polyphénols (flavonoides).....	8
II.2.1. Généralité sur les polyphénols	8
II.2.2. Définition des flavonoides.....	11
II.2.4. Propriétés biologiques des polyphénols	14
II.3. Généralités sur les hydrolats.....	16
II.4. Candidoses et biofilms	17
PARTIE 2: EEXPÉRIMENTATION	18
CHAPITRE I: MATERIEL ET METHODES	19

I.1. Matériel végétal	19
I.1.1. Origine géographique et période de récolte	19
I.2. Tests phytochimiques	19
I.2. Extraction de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat	23
I.2.1. Procédé d'extraction de l'huile essentielle	23
I.2.2. Procédé d'obtention de l'extrait de l'hydrolat	23
I.3. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat par CPG / CPG - SM	24
I.5. Extraction et dosage des flavonoïdes	25
I.6. Etude du pouvoir antioxydant :	27
I.6.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	27
I.6.2. Méthode de la réduction du fer FRAP	27
I.7. Tests anticandidoses.....	28
I.7.1. Méthode de Vincent (Aromatogramme).....	29
I.7.2. Détermination des concentrations inhibitrices de biofilm (CIB).....	29
CHPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	30
II.1. Tests phytochimiques	30
II.2. Rendements et analyse chimique de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat par CPG/CPG-SM	31
II.3. Dosage des polyphénols	32
II.4. Dosage des flavonoïdes	33
II.5.1. Méthode antiradicalaire au DPPH.....	34
II.5.2. Méthode de la réduction de fer.....	40
II.6. Résultats de l'activité anticandidose des extraits	43

II.6.1. Méthode de Vincent	43
II.6.2. Détermination de la concentration inhibitrice de biofilm (CIB)	44
CONCLUSION GENERALE	47
REFERANCE BIBLIOGRAPHIQUE :	49
ANNEXES :	58

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes [1]. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l'efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé publique.

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 [2].

Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO) et l'augmentation accrue de résistances des micro-organismes aux antibiotiques. En effet, (i) les ERO sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires. Quelque soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides ; (ii) alors que les infections microbiennes en particulier les mycoses posent toujours de graves problèmes dans le monde entier. Plus spécialement dans les pays sous développés où il y a un appauvrissement de certaines classes sociales dans lesquelles les patients se retrouvent dépourvus de tout traitement [3].

En appuyant sur cette vision, Il devient indispensable d'intensifier l'effort de recherche pour développer de nouveaux médicaments accessibles à tous, obtenus à partir de plantes locales, de formulation aisée et peu coûteuse.

Parmi les substances naturelles d'origine végétale, les polyphénols (flavonoides) et les huiles essentielles qui ont fait l'objet de nombreuses recherches notamment pour leurs propriétés biologiques : antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anticarcinogènes.

Vu ces considérations ci-dessus, et dans le cadre de la recherche des substances naturelles bioactives extraites du règne végétal, nous nous sommes intéressé à l'évaluation du pouvoir antioxydant et anticandida des extraits de *Nepeta amethystina*.

Le choix de cette plante et de ces propriétés biologiques sont dues (i) très peu de travaux sont réalisés sur la composition chimique de cette plante excepté ceux de **Valasco-Negueruela et al.** [4] sur la composition chimique de l'huile essentielle et le travail de **Seladji et al.** [5] sur le criblage phytochimique et l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique ; (ii) plante très utilisée par la population locale de Ain esafra.

Le présent travail est structuré en deux parties :

- La première partie concerne les travaux antérieurs sur *Nepeta amethystina* et des généralités sur les huiles essentielles, les flavonoïdes et les hydrolats
- La deuxième partie concerne le travail expérimental et la présentation des résultats obtenus avec discussion.

Partie 1
Synthèse
bibliographique

Chapitre I: Présentation de *Nepeta amethystina*

Le genre *Nepeta* est composé d'environ de 250 espèces réparties dans l'Europe, l'Asie, le Nord Africain et les régions montagneuses d'Afrique tropicale. Les propriétés pharmacologiques et les diverses activités biologiques sont généralement attribués aux composés lactonique principalement trouvés dans l'huile essentielle de l'espèce *Nepeta*[6].

La Népétalactone est un monoterpène oxygéné qui existe dans la forme de huit stéréoisomères qui ne diffèrent que par l'orientation d'une liaison chimique simple et montrent différentes activités biologiques :

- ✓ Attirant des chats [7]
- ✓ Toxiques pour certains insectes [7]
- ✓ Des intérêts particuliers pour la santé humaine contre *Helicobacter pylori* [8]

D'après **Quezel et Santa** [9], cinq espèces du genre *Nepeta* existent en Algérie dont l'espèce *Nepeta amethystina*. A Ain-Sefra (Algérie) l'espèce *Nepeta amethystina* est connue sous le nom vulgaire **Gouzeia** (**Figure 1**).



Figure 1 : *Nepeta amethystina*

I.1. Description botanique :

C'est un sous arbrisseau odorant appartenent à la famille des Labiées. C'est une plante vivace de 20 à 50 cm d'hauteur, qui fleurit de Juin à Août. Tige quadrangulaires, à feuilles opposées et à fleurs en cymes, calice à 5 dents et fruits à 4 akènes soudés. Corolle irrégulière, bilabée à 4 étamines. Bractées florales très petites, inflorescences très lâches, plante grisâtre à feuilles lancéolées et crénelées, fleurs bleues et plante à tige très rameuse.

I.2. L'utilisation de la plante:

Nepeta amethystina est utilisée pour traiter les piqûres d'insectes et en infusion comme diurétique, fébrifuge, fortifiante, antispasmodique, stimulante, antiasthmatique, aussi contre les bactéries, les champignons et les virus [10] [11].

I.3. Classification

Selon **Ubera et Valdes** [12], **Valdes et al.** [13] et **Cantino et al.** [14] *Nepeta amethystina* est classé comme suit:

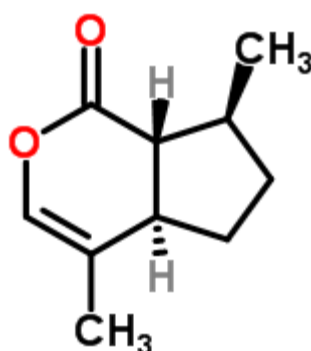
Embranchement	Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Gamopétales
Ordre	Tubiflorales
Famille	Labiées
Sous famille	Nepetoïde
Genre	<i>Nepeta</i>
Espèce	<i>Nepeta nepetella</i>
Sous espèces	<i>Nepeta amethystina</i>

I.4. Composition chimique de l'huile essentielle de *N. amethystina*

Le genre *Nepeta* et particulièrement l'espèce *N. amethystina* n'a pratiquement pas été étudiée de point de vue chimique et activité biologique. Rappelant que seulement deux travaux sont recensés. Celui de **Velasco-Negueruela et al.** (tableau 1) qui ont montré que l'huile essentielle de *Nepeta amethystina* contient comme produits majoritaires : 4 α -7 α -7 α -nepetalactone (41,88%); suivi de 4 α -7 α -7 β -nepetalactone (39,42%) [15] (**figure 2**).

Tableau 1: Composition chimique de l'HE de *N. amethystina* d'Espagne [15].

Composé identifiés	Teneur (%)
α - pinène	0.12
Camphène	Tr
β - pinène	0.78
3-octanone	0.17
Myrcène	0.26
p-Cymmène	0.28
1.8 Cinéol + Limoène	1.11
Cis β -Ocimène	0.82
Trans β -Ocimène	0.73
Cis oxyde de linalyl	0.13
Linalol	0.78
Néo-allocimène	0.20
p-Cymène-8-ol	0.41
Aldehyde NI	5.30
t-carvéol	0.1
Géraniol	0.15
Thymol	0.05
4 β -7 α -7 $\alpha\alpha$ -nepetalactone	Tr
4 α -7 α -7 $\alpha\alpha$ -nepetalactone	41.88
4 α -7 α -7 $\alpha\beta$ -nepetalactone	39.42
4 β -7 α -7 $\alpha\beta$ -nepetalactone	1.01
β -Boubonène	0.72
β -Elemène	0.52
β -Caryophyllène	0.63
α -Humulène	0.82
δ -Cadinène + acide népétalique	0.2
Oxyde de caryophyllène	1.82
Oxyde de humulène	0.34
α -Cadinol	0.19

**Figure 2:** structure de népétalactone.

Chapitre II: Généralité sur les huiles essentielles et les flavonoides

II.1. Généralités sur les huiles essentielles

II.1.1. Définition

Ce sont des substances volatiles et odorantes obtenues des végétaux par entraînement à la vapeur d'eau. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire[16].

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qui les utilisait autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner.

II.1.2. Composition chimique

Les huiles essentielles ont une composition assez complexe [17]. On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C_5) et comprennent les monoterpènes en (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}) et les triterpènes en (C_{30}). Ils ont la même origine métabolique. Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. En général, une HE est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Parmi ces composés oxygénés, on peut noter la présence d'alcools, d'esters, d'aldéhydes, de cétones, d'ether-oxydes et de carbures.

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques (exemple : Thymus à thymol, à géraniol, à carvacrol, à linalol) [18], et parmi les nombreux constituants d'une HE, l'un domine généralement ; On l'appelle composé majoritaire.

La composition chimique des HE varie encore de façon appréciable avec le milieu et la période de la végétation. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation [19][20].

II.1.3. Propriétés physico-chimiques des HE

Toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HES de cannelle, de girofle et de saffras.

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation [21].

II.1.4. Domaines d'utilisation

I.4.A.a. Phytothérapie:

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies.

Le terme aromathérapie vient du chimiste Français René-Maurice Gattefosse, qui a utilisé l'HE de lavande pendant la première guerre mondiale pour soigner des blessures et des infections. Selon lui, la lavande était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité préoccupe de plus en plus des médecins et des pharmaciens qui ont publié un nombre important d'ouvrages d'aromathérapie [22].

I.4.A.b. Parfumerie et cosmétologie:

L'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable [22] [23][24].

I.4.A.c. Industrie alimentaire :

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure. Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation des HE [25][26]. Les plantes aromatiques et leur HE sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires. Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des HE [27], le carvacrol, qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire [28]. Ils y sont rajoutées pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires [29][30][31]. Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires [32][33][34].

II.2. Généralités sur les polyphénols (flavonoïdes)

II.2.1. Généralité sur les polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement [35]. A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés [36]. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles

(OH) [37]. Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 [38].

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué. La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement [35].

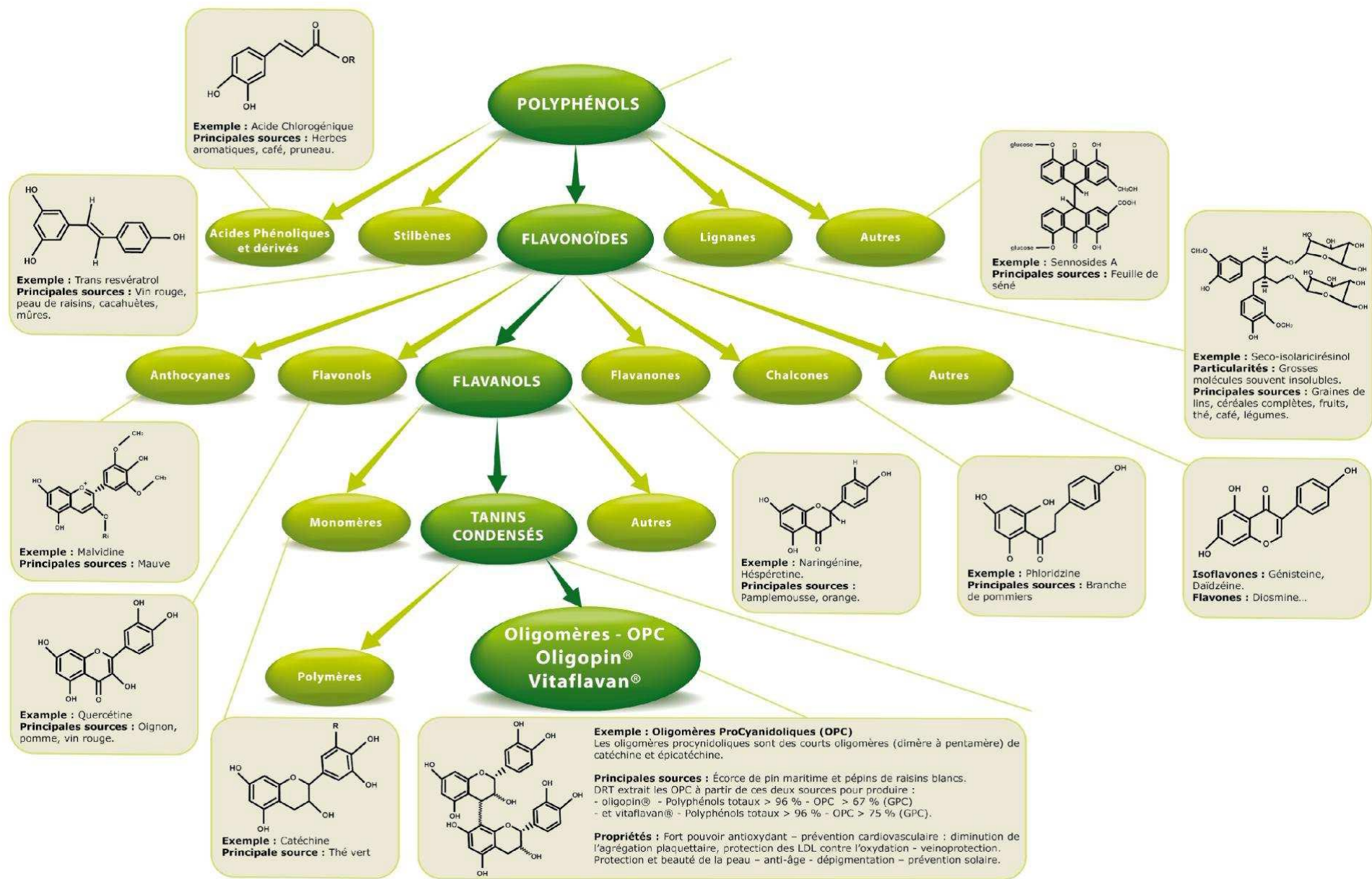


Figure 3: Classification des polyphénols

II.2.2. Définition des flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante [39]. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques [40], dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance [41]. Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus [42] et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane [43] (**Figures 4 et 5**).

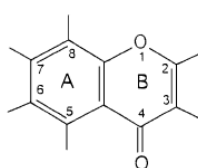


Figure 4 : Structure du 2-phényle chromane

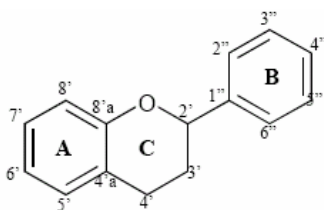
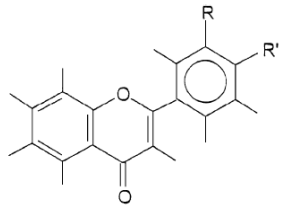
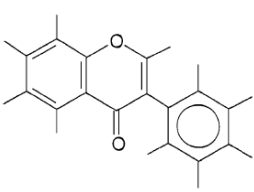
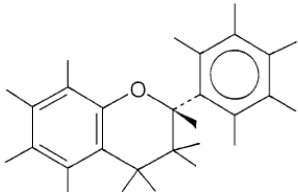
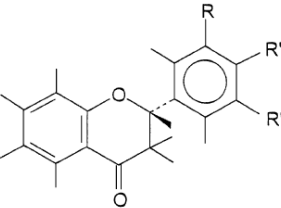
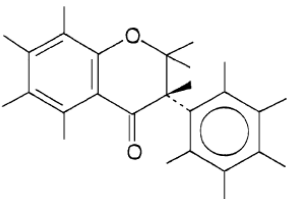
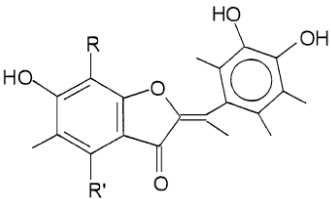
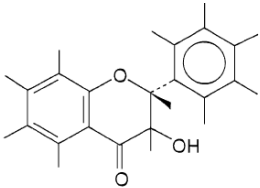
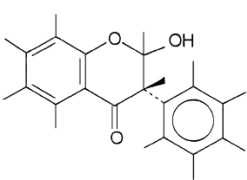
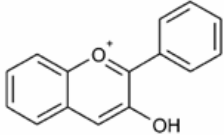


Figure 5 : Structure générale des flavonoïdes

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C2-C3, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo [39][43]. En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes [41][42] (**Figure 6**).

Flavonoles	Isoflavonoles	Isoflavanones

		
Flavones	Isoflavones	Flavanes
		
Flavanones	Isoflavanones	Aurones
		
Flavanols	Isoflavanols	Anthocyanidines
Figure 6: Structures des squelettes de base des flavonoïdes [41]		

a. Anthocyanosides

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits [35]. Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) [44].

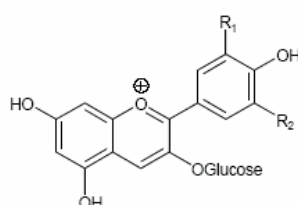


Figure 7: Structure des anthocyanosides

b. Tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des

réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [45][46]. Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines [47]. On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique:

b.1. Tannins hydrolysables

Qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (**Figure 6**) [35][46].

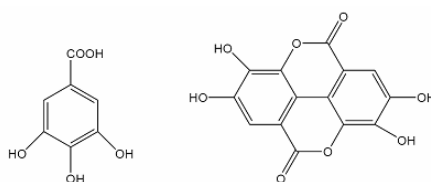


Figure 8 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

b.2. Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols

Qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères [35].

c. Phénols simples et les acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique

c.1. Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque

Les acides phénols en C₆-C₁ dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique [35].

c.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique

La plupart des acides phénols en C₆-C₃ (acides *p*-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large ; les autres (acides *o*-coumarique, *o*-férulique) sont peu

fréquents [35]. Les acides cinnamiques et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation [46].

c.3. Phénols simples

Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montrés pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes [46].

d. Coumarines

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C₆-C₃, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone [48] et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin [46].

e. Quinones

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diéniq (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinones) [35]. Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs [46].

f. Stilbène

Les membres de cette famille possèdent la structure C₆-C₂-C₆ comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides [49].

g. Lignanes

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C₆-C₃). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante dix familles.

II.2.4. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-athérogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire

[50][51]. Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes [52].

Les effets bénéfiques **des polyphénols** intéressent particulièrement deux domaines: la phytothérapie et l'hygiène alimentaire [53]. D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques [37].

En ce qui concerne **les flavonoïdes**, ces composés peuvent empêchés les dommages oxydatifs par différentes mécanismes d'actions: soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes [54, p. 450]; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres [55][56]. Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) [43][46][57]. Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-oestrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion. D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers Citrus) et la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) [58].

Les anthocyanes sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire (*vigne rouge, Vitis vinifera* L.), mais aussi comme diurétiques, voire même antiseptiques urinaires. Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (*myrtille, Vaccinium myrtillus* L.; *cassis, Ribes nigrum* L.) [37]. Présente comme des couleurs brillant dans les fruits et les légumes, les anthocyanidines ont montré leur effet inhibiteur de la croissance des lignées cellulaires humaines [59].

Les tanins sont considérés comme des anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie [60]. Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (chêne, *Quercus* spp.). Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus* spp.) seraient de bons sédatifs cardiaques [37]. Concernant le pouvoir antioxydant des tannins, cette propriété est très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tannins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres [61], ils inhibent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages in vitro [62].

Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives [37]. Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires [57].

Les **acides phénols et ces dérivés** sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés [37]. Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique [63]. Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons [46]. Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuse du poumon chez les souris in vitro et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer [64]. Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux [59].

Certaines **quinones**, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula* L.), les sénés (*Cassia* spp.) et les aloès (*Aloe* spp.). D'autres activités antidépressives (hypericin), anti-protozoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites et plusieurs molécules du groupe ont une toxicité non négligeable. [35][37].

II.3. Généralités sur les hydrolats

Lors du processus d'obtention des huiles essentielles, un sousproduit se forme à partir de l'eau ayant servi à l'extraction des molécules odorantes. Ce produit est l'*hydrolat* ou *hydrosol* en

anglais. Au cours de la distillation, la vapeur d'eau se condense au contact des parois froides d'un réfrigérant. L'eau se dissocie alors spontanément de l'huile essentielle du fait de leur non miscibilité tout en conservant une petite portion des composés volatils de l'huile essentielle. [65] Malgré cette faible concentration en principes actifs, les hydrolats présentent certaines activités pharmacologiques et biologiques intéressantes.

II.4. Candidoses et biofilms

Les candidoses sont des mycoses dues généralement à la levure *Candida albicans*. Elles peuvent être digestives, respiratoires ou génitales. *Candida albicans* est sans conteste la levure qui prédomine en mycologie médicale, c'est une espèce qui n'est rencontrée à l'état saprophytique que sur les muqueuses humaines et animales, jamais rencontrée dans la nature ou sur la peau en dehors des contaminations fortuites. *C. albicans* prolifère plus facilement dans un environnement obscur, chaud et humide [66].

La plupart des espèces microbiennes ne vivent pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces. Cette fixation est facilitée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. L'ensemble micro-organismes et matrice forme un biofilm par opposition à l'état planctonique. L'état biofilm est le mode de vie dominant des micro-organismes (**figure 9**). Aujourd'hui, les médecins biologistes affirment que les infections dont la physiopathologie repose sur l'existence d'un biofilm représentent une situation grave. Ces infections sont souvent chroniques et/ou récidivantes et recouvrent des situations difficiles à gérer: bactériémies/septicémies récurrentes par « planctonisation » de microorganismes constitutifs du biofilm [67].

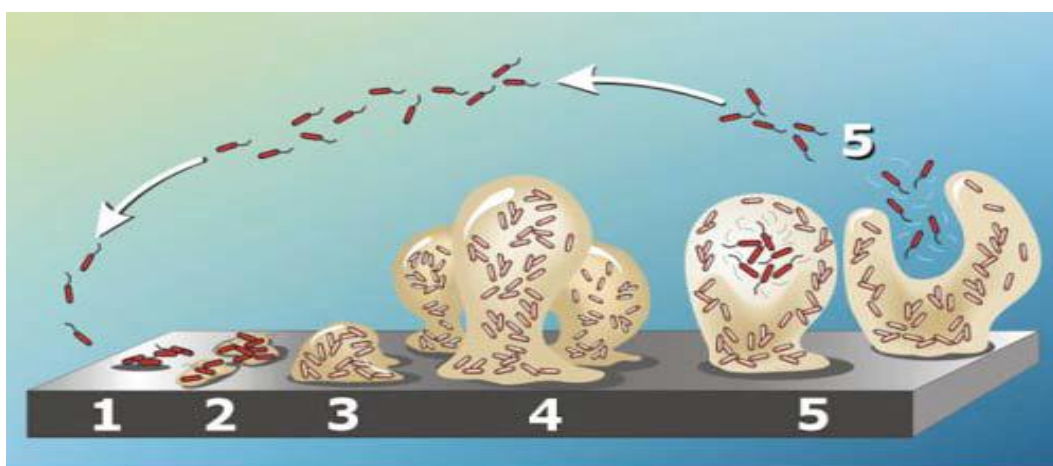


Figure 9: Cycle «biofilmisation - planctonisation» [68]

Partie2

Eexpérimentation

Chapitre I: Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Origine géographique et période de récolte

L'espèce *N.amethystina* a été récoltée dans la région d'Ain sefra, wilaya de Naâma durant le mois de juin 2013 en période de floraison.

Le matériel végétale (feuilles, fleurs et tiges) a été conditionnée dans des sachets en papier de kraft. L'identification botanique de la plante a été faite par monsieur le professeur M. Bouazza du département d'écologie et Environnement – université de TLEMCEM.

I.2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sont des tests basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation ainsi que des examens en lumière ultraviolette dans le but de mettre en évidence les différentes familles chimiques existantes dans la plante.

Pour cela, l'espèce *N. amethystina* à été soumise à des extractions par trois solvants de polarités différentes (eau, éthanol, éther diéthylique).

❖ 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.

i. 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[69].

ii. Saponosides:

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse[70]. 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

iii. 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 FeCl₃ diluée 10 fois. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins [71].

iv. Les anthraquinones:

La détection des anthraquinones consiste à :

- Traiter 1g du matériel végétal avec 10 ml de KOH (0,5N) et 1 ml H₂O₂ 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 NH₄OH

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

❖ 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.

i. Les flavonoïdes:

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1ml d'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 [70].

ii. Les alcaloïdes sels:

Leur détection consiste à :

- ❖ Evaporer à sec 20 ml de l'extrait éthanolique ;
- ❖ Ajouter 5 ml d'HCl (10%) au résidu obtenu, puis chauffer dans un bain marie ;
- ❖ Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de

- ❖ NH_4OH (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 [72].

iii. 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_3 diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire (tanins galliques), vert ou bleu-verte (tanins catéchiques).

iv. 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 :

- ***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.

- ***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_4OH (10%) ;
- Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV

La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence intense [35].

- ***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.

v. *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°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.

vi. *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 [71].

- ❖ Epuisement du matériel végétal avec de 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.

a. *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.

b. 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.

c. 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.

I.2. Extraction de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat

I.2.1. Procédé d'extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation type cleverger. La méthode consiste immerger directement le matériel végétal dans l'eau qui est portée à l'ébullition. Les vapeurs chargées d'huile sont condensées et l'huile se sépare par différence de densité.

I.2.2. Procédé d'obtention de l'extrait de l'hydrolat

La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'eau aromatique par décantation. Cette dernière contient une quantité non négligeable d'essence aromatique sous forme solubilisée.

La récupération de cette huile est réalisée par extraction liquide liquide avec un solvant organique (éther diéthylique) [73]. L'utilisation d'un évaporateur rotatif sous vide permet d'éliminer l'éther et d'obtenir ainsi un extrait huileux.

I.3. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat par CPG / CPG - SM

L'analyse par CPG a été réalisée à l'aide d'un chromatographe de type Perkin Elmer Autosystem GC, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composés, d'un injecteur diviseur et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i ; épaisseur du film : 0,25 μm) respectivement polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane). Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/min) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/min, puis un palier de 45 min à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'huile injectée est de 0,2 μL . La quantification a été faite par intégration électronique directe des aires des pics.

L'analyse par couplage CPG/SM a été réalisée à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer, autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i ; épaisseur du film : 0,25 μm) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplé à une détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Le gaz vecteur est l'hélium (1 mL/min) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/min, puis en un palier de 35 min à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité d' H.E injectée est de 0,2 μL . La détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source est de 150°C. L'appareil fonctionne en impact électronique et la fragmentation est réalisée dans un champ électrique de 70eV. Les spectres de masse obtenus ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

❖ Méthodes d'identifications

- la méthode d'identification par indice de **Kovats**, [74]: les indices de rétention polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une série d'alcanes de C₉ à C₂₅,
- les banques de données des spectres de masses : les spectres de masse obtenus sont comparés à ceux des bibliothèques informatisés : **Köning et coll.**, [75], **NIST** [76], **Mc Lafferty et Stauffer**, [77], **Adams**, [78], la bibliothèque du laboratoire de Corse et les spectres de masse publiés dans la littérature [79][80].

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil Bruker DPX 300 dans le chloroforme deutéré et les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au TMS pris comme référence interne.

I.4. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits (aqueux ; éthérique et méthanolique) de *N. amethystina* a été déterminée par la méthode de **Singleton et Rossi** [81].

Une quantité de 200 μ l des extraits de la 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_2CO_3 . L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/VIS OPTIZEN) 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 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).

I.5. Extraction et dosage des flavonoïdes

On a employé les solutions méthanoliques pour l'extraction des flavonoïdes, méthode décrite par **Upson et al.** [82] (**Fig 9**).

- 100g de plante sèche broyée est placé dans un récipient en présence d'une solution hydroalcoolique MeOH/eau (7:3).
- Le tout est chauffé à 70°C pendant 5 minutes (destruction des parois végétales + inhibition de l'oxydation et/ou l'hydrolyse enzymatique).
- L'échantillon est laissé macérer durant une nuit (24 heures).
- Après filtration sur papier filtre, le filtrat est évaporé sous vide à sec en utilisant un Rotavapeur, à la température de 45-50°C.

- Pour le fractionnement et l'obtention des fractions flavonoïdes, les résidus obtenus ont été récupérés dans l'eau chaude (50 ° C) puis séparé successivement par le 1-butanol et l'acétate d'éthyle. Ensuite, les deux fractions ont été évaporé à sec en utilisant un évaporateur rotatif.
- Les extraits ainsi obtenus destinés aux tests microbiologiques sont récupérés avec le DMSO.

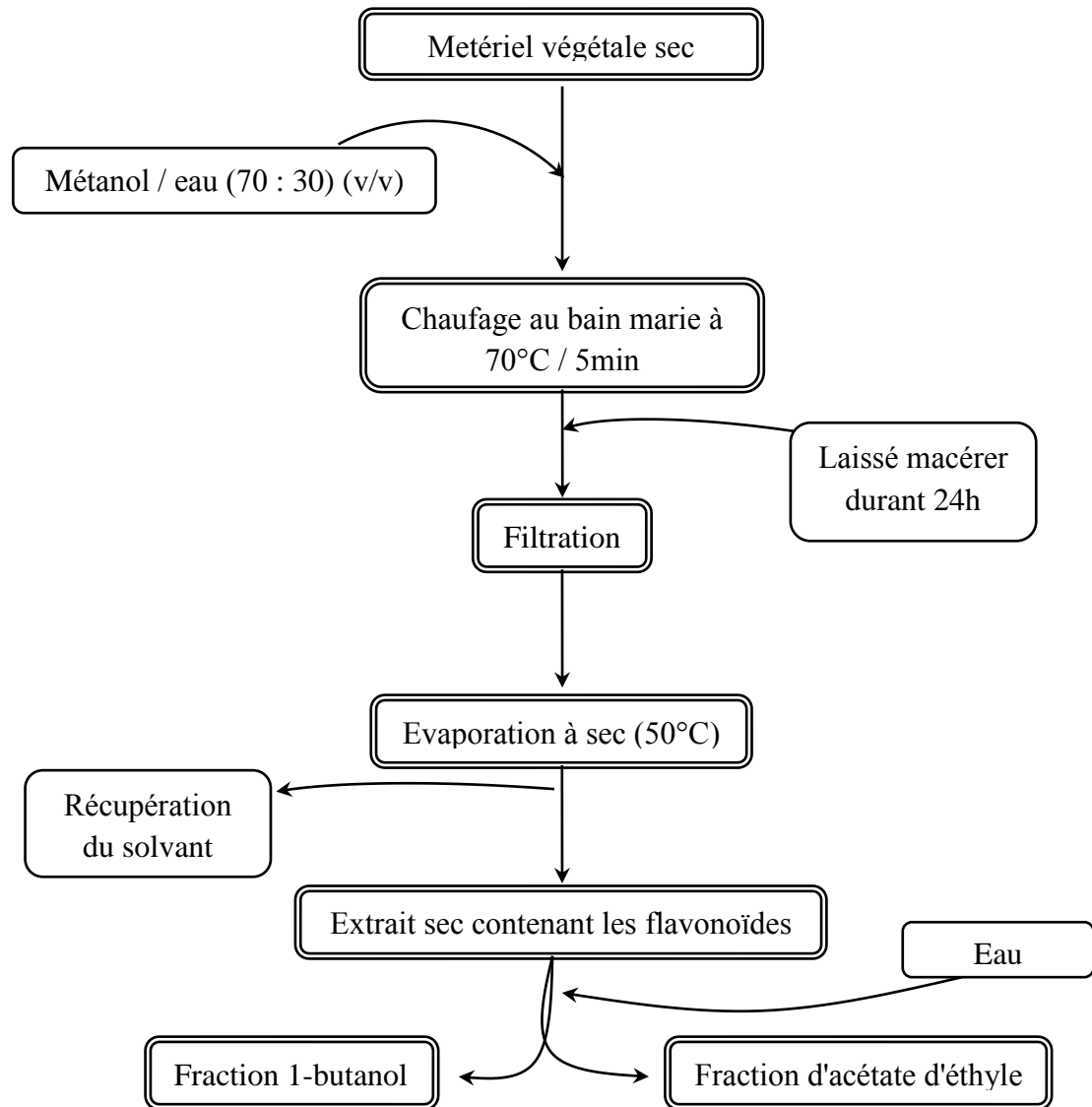


Figure 10: protocole d'extraction des flavonoïdes

❖ Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée spectrophotométriquement selon la méthode décrite par **Upson et al.** [82]. Une quantité de 100ml 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 NaNO_2 à 5%.

Après 5 minutes, 0,02ml d'une solution d'AlCl₃ à 10% a été ajouté. Après 5 minutes on additionne au mélange 0,2ml de solution de Na₂CO₃ 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.

I.6. Etude du pouvoir antioxydant :

I.6.1. 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.**, [83]. 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.

Pour cela, 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 (0,025g/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 517nm 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.

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

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC₅₀ qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH [84].

I.6.2. Méthode de la réduction du fer FRAP

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Oyaizu** [85], basée sur la réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺.

- 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,
- 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 ; BHT) 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 [86].

I.7. Tests anticandidoses

Une étude antérieure du pouvoir antimicrobien de *N. amethystina* a montré que les extraits de cette espèce sont beaucoup plus antifongiques (antilevures) qu'antibactériens. C'est pourquoi, nous avons choisis de tester nos extraits sur les levures.

Nous avons choisi la méthode de diffusion des disques sur milieu de Mueller-Hinton gélosé et la détermination des concentrations inhibitrices. Les extraits étherique, ethanologique et aqueux ont été solubilisés dans le DMSO.

L'essai anti-biofilm formé par *Candida albicans* a été réalisé en milieu liquide sur microplaque à 96 puits.

❖ Les souches testées

L'activité antifongique de *Nepeta amethystina* est déterminé contre trois souches de référence de *Candida albicans* il s'agit de: *Candida albicans* 10231, *Candida albicans* IPP 444 et *Candida albicans* ATCC 26790

❖ Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 4°C dans des tubes contenant Sabouraud Dextrose Agar

❖ Préparation des précultures

5ml de bouillon nutritif a été inoculé avec une colonie de la levure. Après incubation à 30°C pendant 24h, on mesure de la densité optique à 590 nm par un spectrophotomètre. Une DO de 0.08 - 0.1 correspond à 10^8 UFC/ml.

I.7.1. Méthode de Vincent (Aromatogramme)

❖ Principe

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme), repose sur la diffusion du composé 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 [87].

❖ Protocole expérimental

Des disques de papier filtre de 6mm de diamètre imbibés de 4µl pour l'huile essentielle, l'extrait de l'hydrolat et des autres extraits (1mg/ml), ont été placés à la surface de gélose Mueller Hinton sèche, inoculée au préalable par un millilitre de dilution de la suspension de *Candida albicans* contenant approximativement 10^6 UFC/ml . Après incubation à 30°C pendant 24 heures, la sensibilité a été évaluée en mesurant le diamètre de zone d'inhibition [88].

I.7.2. Détermination des concentrations inhibitrices de biofilm (CIB)

❖ Obtention de biofilm

Les concentrations inhibitrices de biofilm (CIB) des extraits ont été déterminées comme décrit par **Nostro et al** [89]. Premièrement, la microplaque à 96 puits a été remplie en distribuant 100 µL d'inoculum à 10^8 UFC/ml dans chaque puit. Après 24 h d'incubation à 30°C , l'inoculum flottant a été doucement enlevé et tous les puits ont été lavés trois fois avec de l'eau physiologique stérile. Dix concentrations de chaque extrait déjà solubilisé dans le DMSO ont été préparées par la série de dilution 1/2 dans le bouillon Mueller-Hinton stérile. Ensuite tous les puits ont été remplis par 70 µL de bouillon Mueller-Hinton stérile avec 30 µL de chaque concentration pour obtenir des concentrations finales de 0,23 mg/ml à 120 mg /ml pour l'huile essentielle et l'extrait de l'hydrolat et de 0,019 mg/ml à 10 mg /ml pour les fractions acétate d'éthyle et 1-butanol.

❖ Lecture des résultats

La concentration inhibitrice de biofilm (CIB) a été déterminée après 24 h d'incubation à 30°C comme la concentration la plus basse sans culture dans le puit visuellement déterminée.

Chpître II : Résultats et discussion

II.1. Tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur la partie aérienne de *N.amethystina* épuisés par l'eau, l'éthanol et l'éther diéthylique sont regroupés dans le **tableau 3**.

Tableau 2: Résultats des tests phytochimiques sur *Nepeta amethystina*

Les familles chimiques recherchées	Résultats		
	Extrait aqueux	Extrait éthanolique	Extrait éthérique
Flavonoïdes	/	+++	/
Tanins	+++	+++	/
Stérols et stéroïdes	/	+++	/
Alcaloïdes sels	/	-	/
Amidon	-	/	/
Composés réducteurs	/	-	/
Saponosides	+	/	/
Anthraquinones	-	/	/
Coumarines	/	-	/
Anthracénosides	/	-	/
Anthocyanosides	/	-	/
Huiles volatiles	/	/	+++
Acide gras	/	/	-
Alcaloïdes bases	/	/	-

- : Test négatif

+ : Test faiblement positif

++: Test positif

+++ : Test fortement positif

/ : Non testé

D'après le tableau 3 la recherche des anthraquinones, des composés réducteurs, des amidons, des alcaloïdes, des anthocyanosides, des anthracénosides sur les différents extraits s'est montrée négative mais celle des flavonoïdes, de l'huile essentielle et des tanains a été positive. Les Stérols, stéroïdes et Saponosides sont présents en faibles quantités.

Les travaux de **SELADJI et al.** [90], ont rapporté la présence des mêmes classes de familles chimiques retrouvées au niveau de la partie aérienne de cette plante.

On peut dire que l'espèce *N. amethystina* est une plante riche en flavonoïdes, huile essentielle et tanins.

II.2. Rendements et analyse chimique de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat par CPG/CPG-SM

Les résultats de rendement et de l'analyse de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat sont consignés dans le tableau 3 et représentés par les annex 1 et 2.

Tableau 3: Rendements et teneurs relatives des constituants de l'HE et de l'extrait d'hydrolat

Constituants	IR _a	IR _b	Huile essentielle %	Extrait d'hydrolat %	Identification
β-Pinene	971	1110	0.41	-	RI,MS
p-Cymene	1014	1268	0.23	-	RI,MS
1,8-Cineole	1022	1209	0.45	0.25	RI,MS
Camphor	1124	1517	0.2	-	RI,MS
Terpinene 4-ol	1166	1600	0.3	0.13	RI,MS
α-Terpineol	1181	1700	0.41	0.79	RI,MS
Myrtenal	1182	1498	0.2	tr	RI,MS
trans-Piperitol	1189	1738	0.4	0.48	RI,MS
Thymol	1277	2189	2.28	0.15	RI,MS
Bornyl acetate	1280	1575	0.5	0.1	RI,MS
Carvacrol	1283	2219	0.35	0.23	RI,MS
4αα,7α,7αα-Nepetalactone	1333	1953	16.25	2.66	RI,MS, ¹ H and ¹³ C NMR
4αα,7α,7αβ-Nepetalactone	1373	2019	72.37	49.17	RI,MS, ¹ H and ¹³ C NMR
(E)-β-Caryophyllene	1420	1591	0.57	0.21	RI,MS

α -Cadinol	1643	2227	Tr	0.45	RI,MS
Total			94,92	54,62	
Teneurs en % (w/w)			0,37	0,25	
Monoterpènes hydrocarbonés			0.64	00	
Monoterpènes oxygénés			93.71	53.96	
sesquiterpenes hydrocarbonés			0.57	0.21	
Sesquiterpenes oxygénés			Tr	0.45	

Ir : Indices de rétention calculés sur colonne apolaire (a) et sur colonne polaire (p). Les abondances sont données sur colonne apolaire.

tr : trace < 0,05

L'utilisation des indices de rétention de Kovats et le couplage CPG/SM nous ont permis d'identifier 15 constituants sur un total de 26 pics. Les composés majoritaires identifiés sont les népétalactones 88,62 % et 51,83 % en totale de l'HE brute et de l'extrait d'hydrolat respectivement. La nature des népétalactones a été élucidée par la RMN ^{13}C . Cette dernière nous a permis de mettre en évidence la présence de **4 α ,7 α ,7 β -Népétalactone (72,37%, 49,17 %) et de 4 α ,7 α ,7 α -Népétalactone (16,25% et 2,66 %) respectivement**. Bien que les monoterpènes oxygénés soient dominant dans les deux extraits, on remarque que l'extrait d'hydrolat contient les mêmes composés que l'HE mais en faible quantité sauf pour le β -caryophyllène et le α -cadinol.

En comparant nos résultats sur l'HE avec ceux de **Velasco-Negueruela** et al. [4] et avec d'autres espèces appartenant au genre *Népéta*, on remarque que notre espèce est plus riche en isomère trans-cis népétalactone suivi de l'isomère cis-trans népétalactone dans les deux extraits, alors que la même espèce d'origine espagnole contient l'isomère trans-cis comme composé majoritaire (39,4%) suivi de l'isomère cis-trans (41,9%). Au regard des népétalactones, notre plante ressemble aux espèces *N. argolica*, *N. nepetella* subsp. aragonensis et *N. nuda* [91] [92] [91].

II.3. Dosage des polyphénols

L'étude quantitative en polyphénols des extraits (méthanolique, éthérique et aqueux) au moyen des dosages spectrophotométriques est présenté par les figures 11 et 12. Les teneurs en polyphénols totaux sont rapportées en équivalent gramme de l'acide gallique.

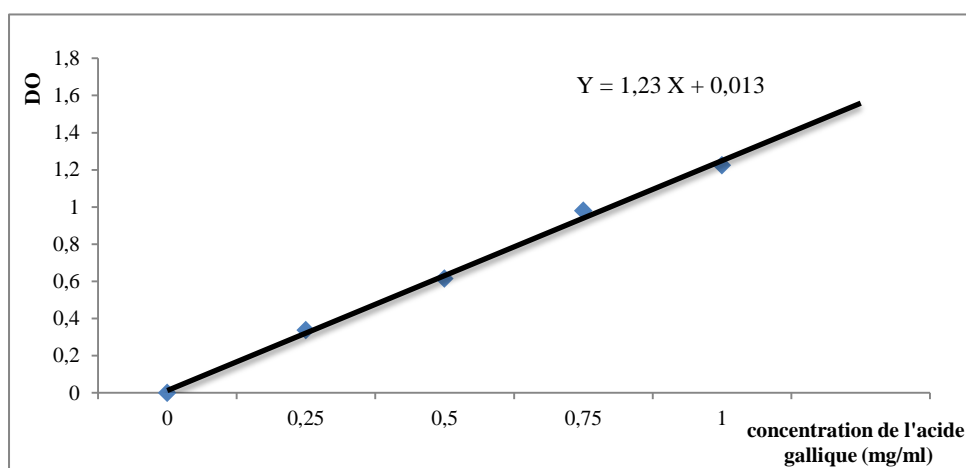


Figure 11: Courbe d'étalonnage des polyphénols

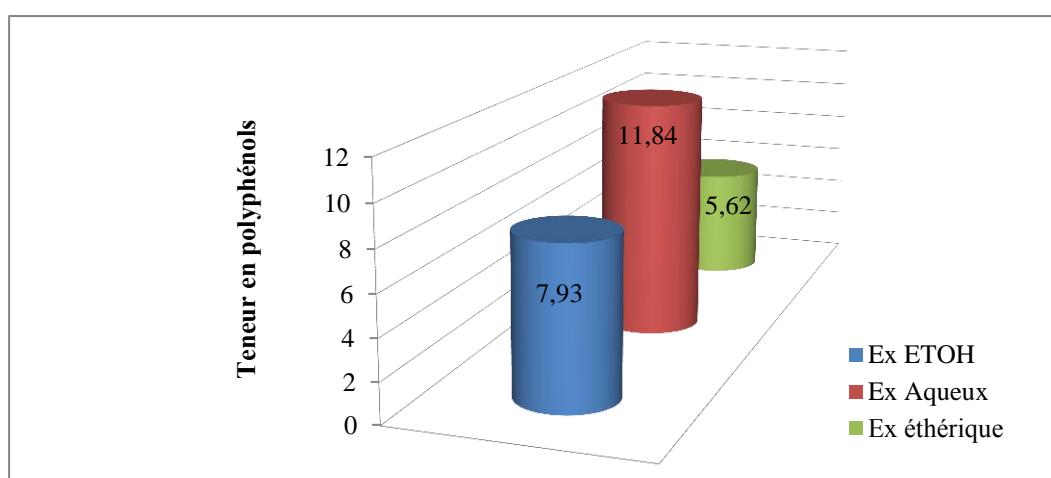


Figure 12: Teneur en polyphénols totaux (g/100g de poids sèche de la plante).

On remarque que les teneurs en polyphénols enregistrés varient de 5.62 % à 11.84 %. L'extrait aqueux est plus riche que les autres extraits.

II.4. Dosage des flavonoïdes

Les résultats du dosage des flavonoïdes des fractions bruts, d'acétate d'éthyle et 1-butanol sont donnés par les figures 13 et 14. Une courbe d'étalonnage a été tracée pour cet objectif, réalisé avec un extrait de **catéchine**. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent gramme de l'étalon utilisé et déterminés par l'équation de type: $y = a x + b$.

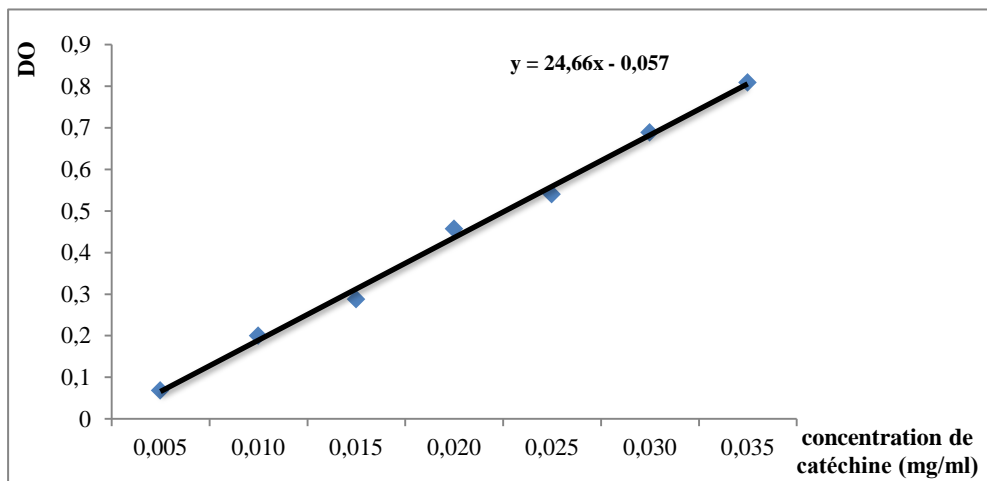


Figure 13: Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

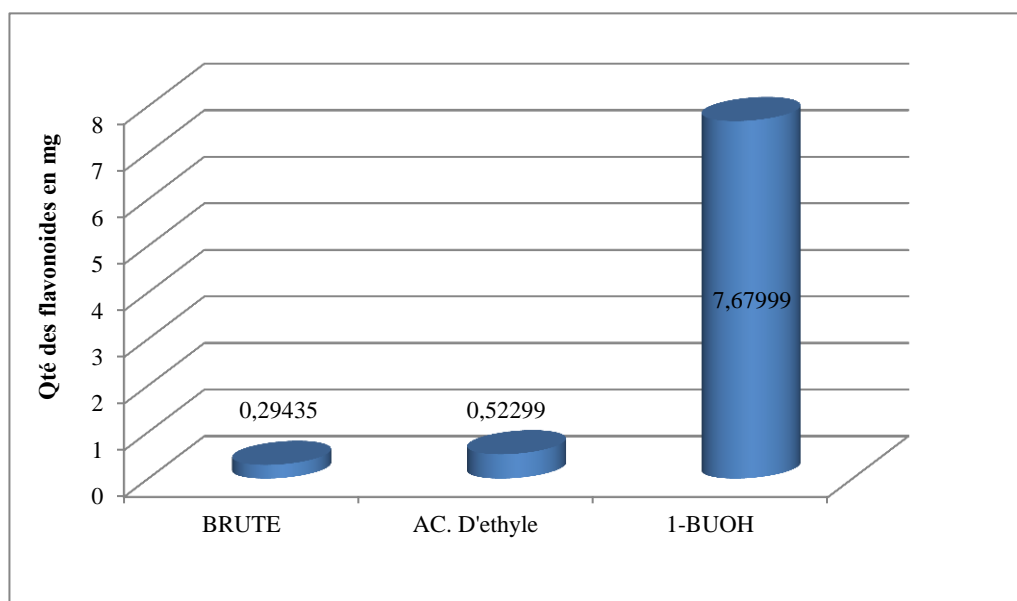


Figure 14: Teneur en flavonoïdes (g/100g de matière végétale)

Selon les figures ci-dessus, on remarque que l'extrait butanolique est plus riche en flavonoïdes hérésidique (7,67 %) que l'extrait d'acétate d'ethyle (0,52 %) et l'extrait brut (0,3 %).

II.5. Résultats des tests du pouvoir antioxydant

II.5.1. Méthode antiradicalaire au DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits de *Nepeta amythistina* 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 517nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires [93].

Afin de comparer cette activité antioxydante avec celle de l'acide ascorbique et BHT, des courbes d'étalonnage sont réalisées et tracer (**figure 15, 16**).

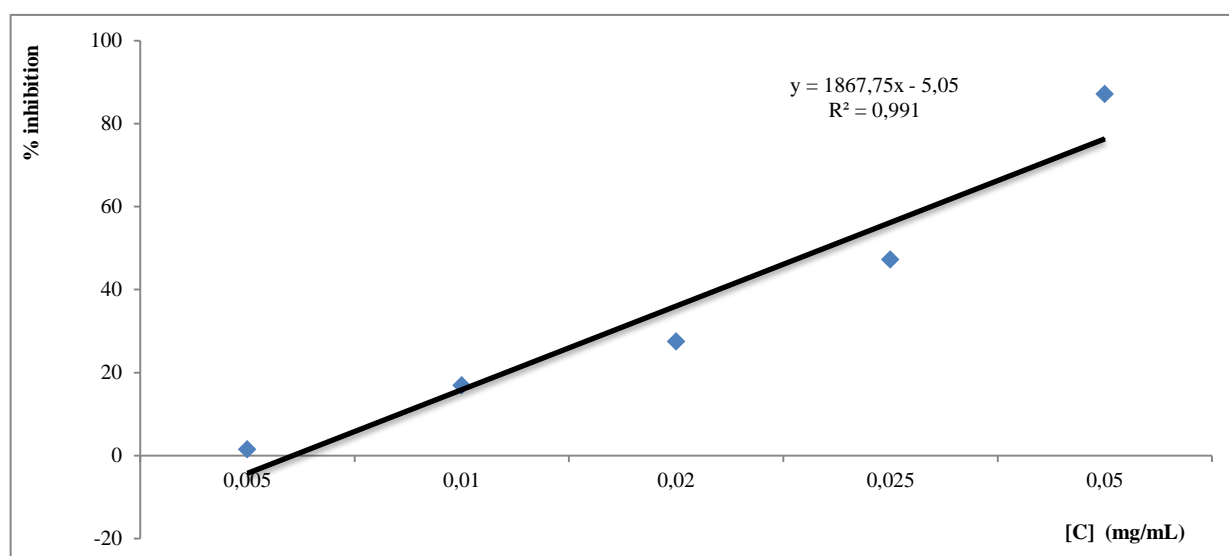


Figure 15: Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

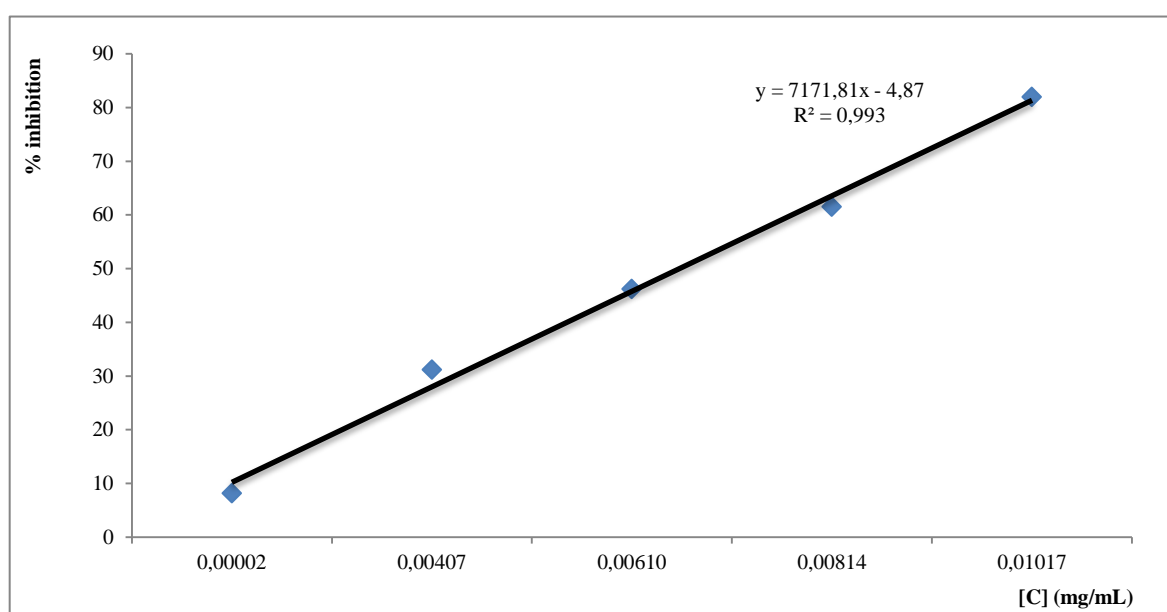


Figure 16: Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de BHT.

Les résultats au DPPH en fonction des concentrations d'HE, de l'extrait d'hydrolat, des extraits (aqueux, éthanolique) et des fractions flavonoïdiques (brute ; acétate d'éthyle ; 1-butanol) sont présentés par les figures 17, 18 et 19.

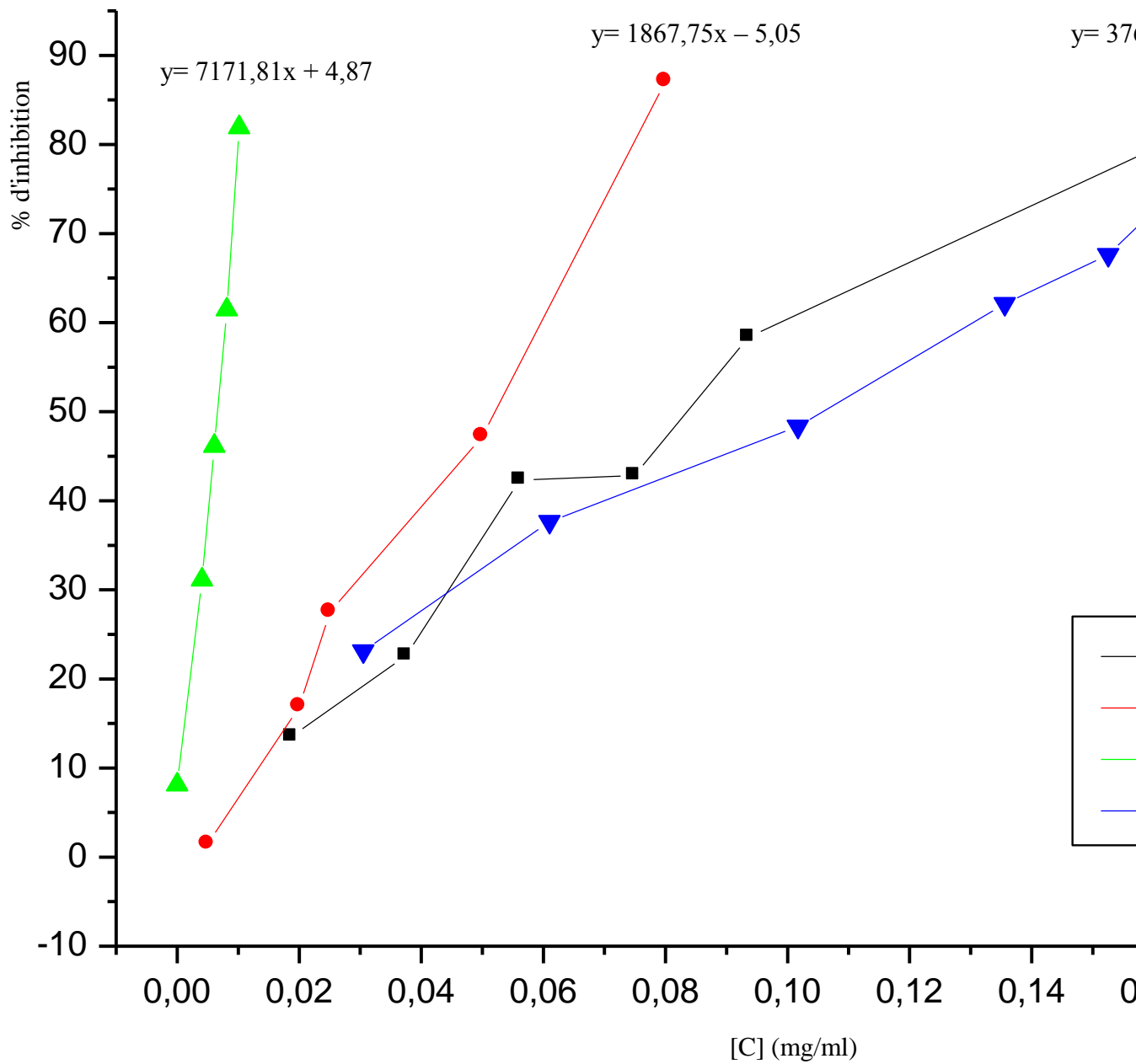


Figure 17: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations d'HE et l'extrait de l'hydrolat par rapport à l'acide ascorbique et BHT

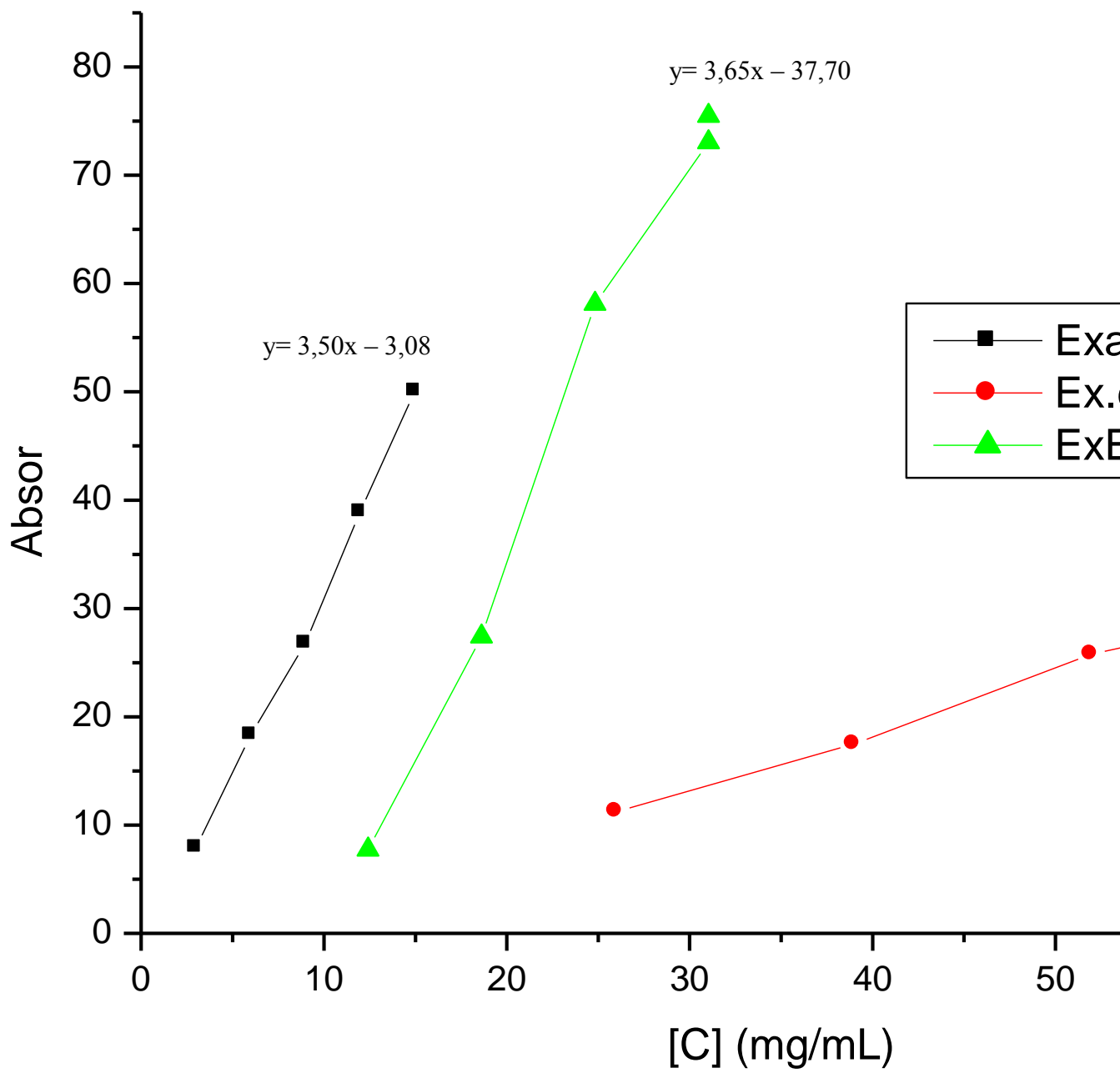


Figure 18: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits (aqueux, éthanolique, éthérique)

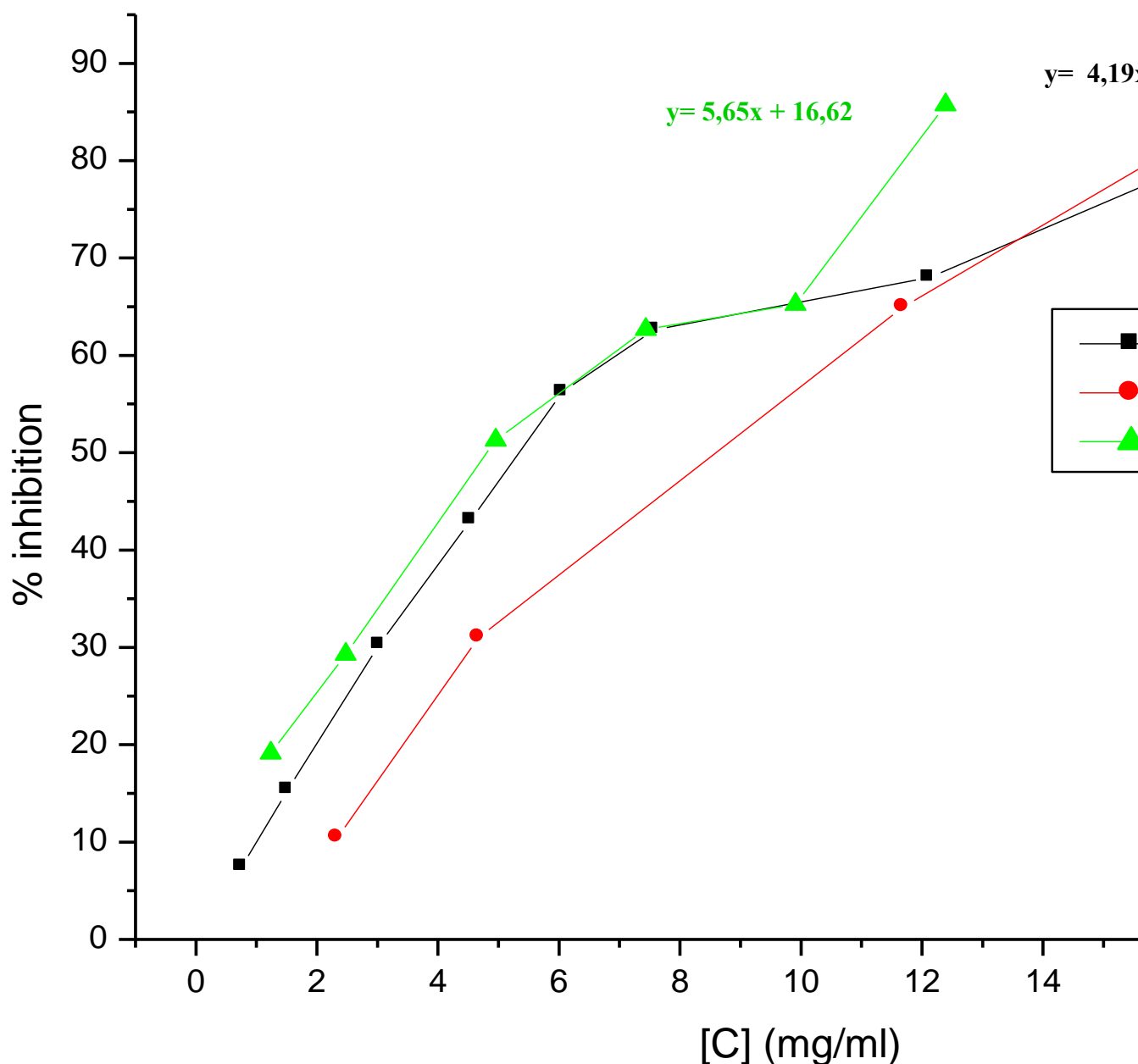


Figure 19: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations des fractions flavonoïdiques (brute ; acétate d'éthyle ; 1-butanol)

Les figures (17, 18, 19) rapportent tous les extraits testés ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 517nm selon leurs concentrations, sauf l'extrait éthérique qui s'est montré moins actif par rapport aux autres extraits.

L'activité antioxydante de nos extraits a été exprimée en IC_{50} (**tableau 4**). Cet indice introduit par **Brand-Williams et ses collaborateurs** définit la concentration efficace du substrat qui

cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur) [94]. Ces IC₅₀ sont déterminés graphiquement par plusieurs tests séparés dont l'abscisse représente les concentrations de l'extrait et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage (pourcentage d'inhibition). La valeur de chaque IC₅₀ exprime la concentration de l'extrait flavonoïdique exigée pour réduire le DPPH en solution de 50%.

Tableau 4: IC₅₀ des extraits naturels et des standards

Les extraits	IC₅₀ (mg/mL)
Ex Aqueux	56,9319
Ex Ethanolique	24,0301
EF Brute	7,7013
EF Ac. D'ethyle	9,7419
EF 1-buthanol	6,0009
Extrait de l'hydrolat	0,1006
H E	0,0916
Acide ascorbique	0,0295
BHT	0,0063

Comme figurant dans le tableau ci-dessus, l'HE, l'extrait d'hydrolat et les flavonoïdes sont des excellents antioxydants naturels. Les fractions buthanoliques possèdent de fortes capacités de neutralisation du radical libre DPPH, puisqu'elles agissent à de faibles doses. Tous les IC₅₀ sont très basses, comprises entre 0,0916 et 9,7419 mg/mL. Suivant ce paramètre, les capacités de balayage du radical sont classées dans l'ordre décroissant:

HE > Extrait de l'hydrolat > EF 1-buthanol > EF Brute > EF Ac. D'ethyle > Ex Ethanolique > Ex Aqueux.

Cependant, les substances de référence (molécules de synthèses pures) sont beaucoup plus puissantes que nos extraits.

Nos observations sur l'activité de piéger les radicaux libres par les extraits éthanolique et aqueux de *Nepeta amethystina* viennent renforcer ceux observées par **SELADJI et ses collaborateurs** [90].

II.5.2. Méthode de la réduction de fer

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 [95]. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux[96].

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 [75].

En d'autre terme, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi-quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox [98].

Les résultats sont illustrés par les figures 20 et 21.

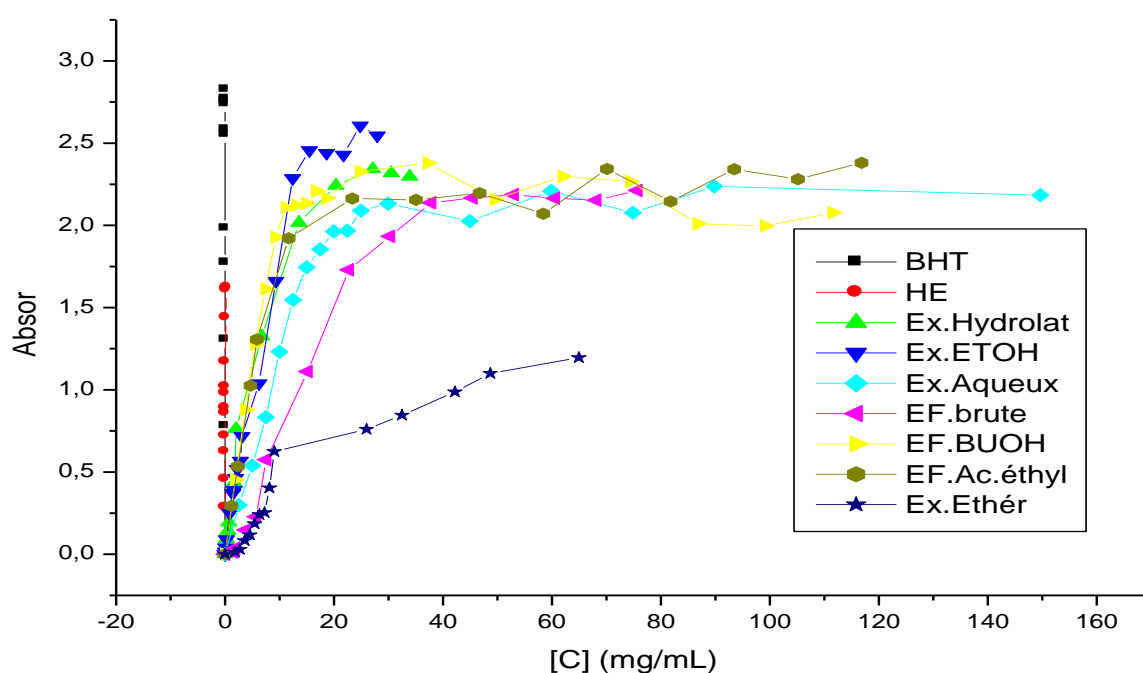
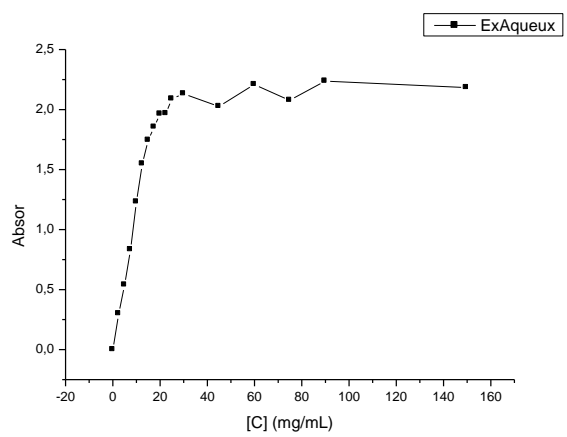
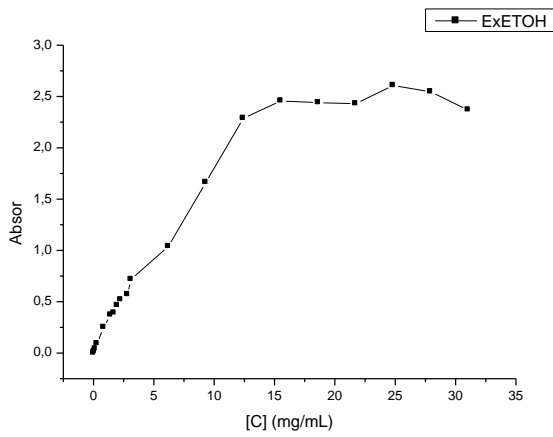
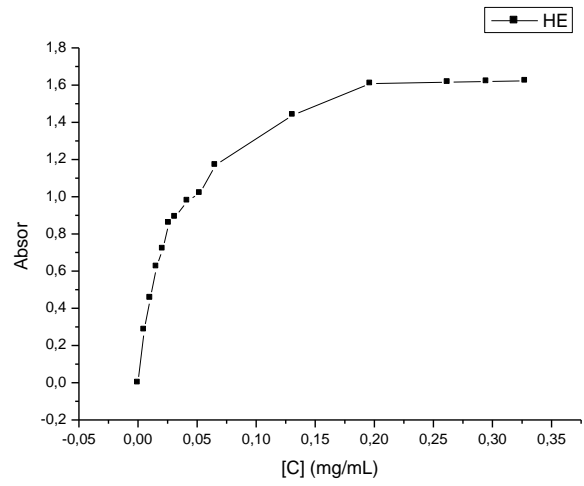
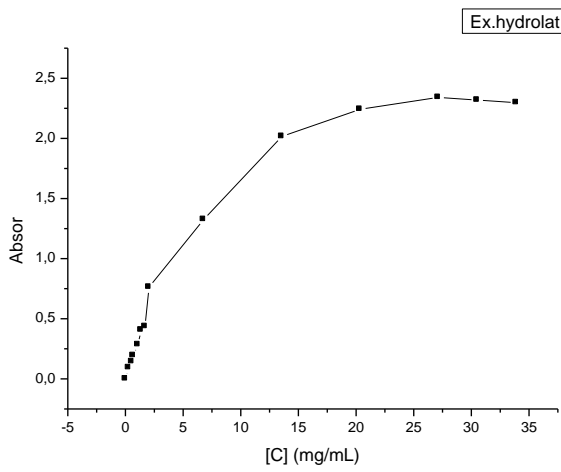
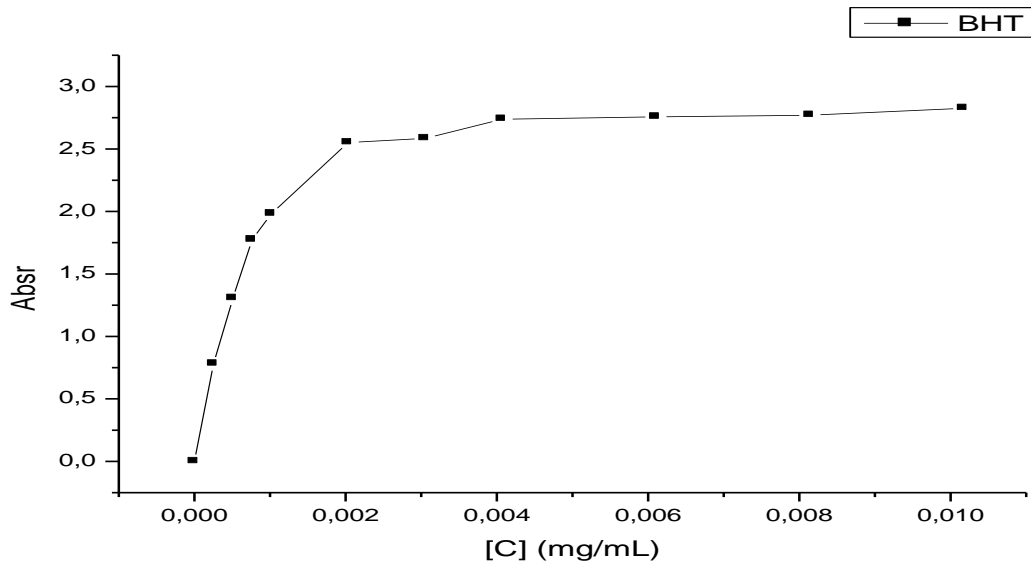


Figure 20: Pouvoir réducteur de l'huile essentielle; l'extrait l'hydrolat; les extraits; les fractions flavonoïdique et BHT



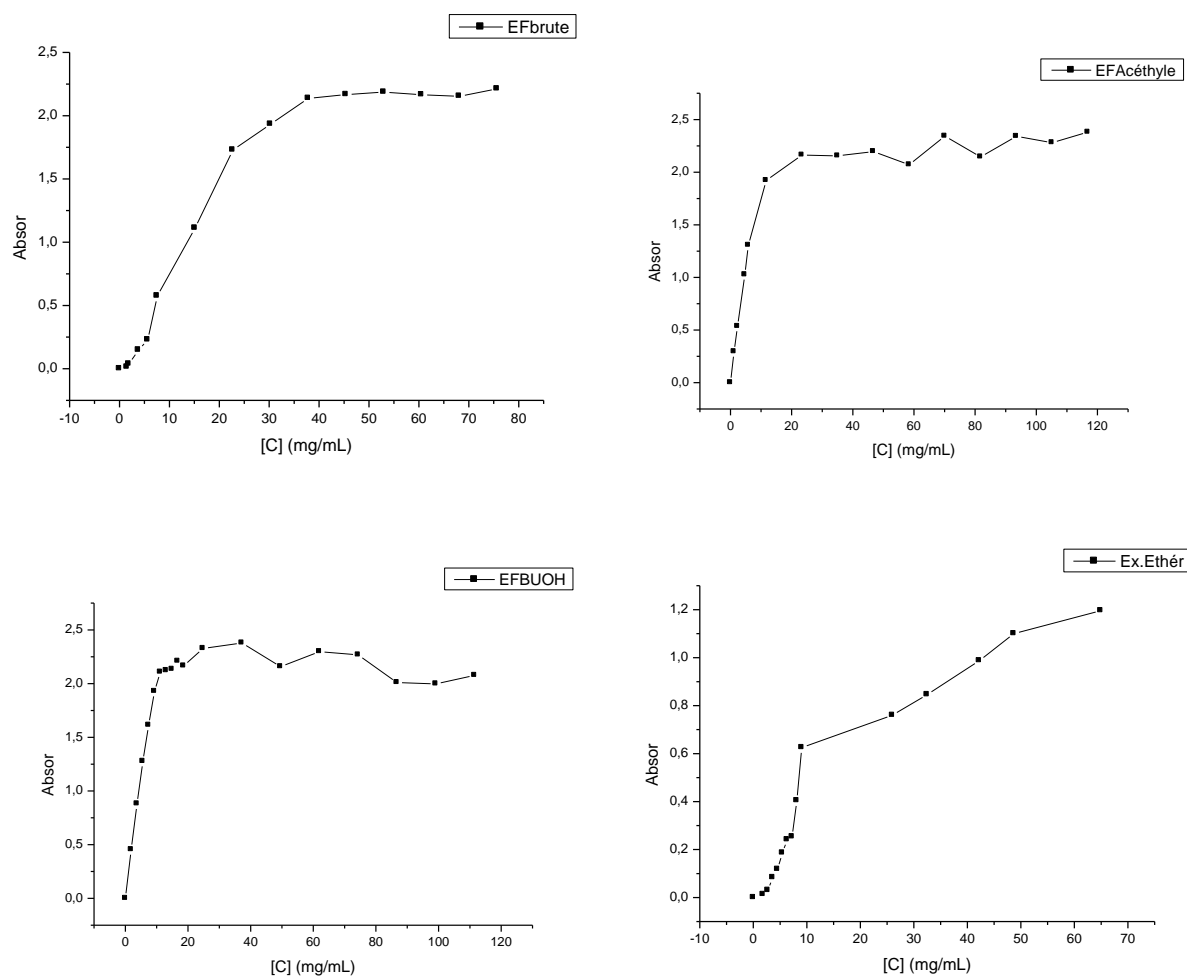


Figure 21: Pouvoir réducteur de fer de l'huile essentielle; et l'extrait de l'hydrolat et des extraits (éthanolique; étherique; aqueux); et des fractions flavonoïdiques (brute; acétate d'éthyle; 1-buthanol) et BHT

Les résultats obtenus par la méthode de FRAP confirment le potentiel antioxydant de l'huile essentielle, de l'extrait d'hydrolat, des extraits (aqueux, éthanolique, étherique) et des fractions flavonoïdiques (brute, acétate d'éthyle, 1-BUOH) de *N.amethystina*.

En effet, les tests montrent que nos extraits possèdent une bonne affinité avec les ions Fe^{3+} . Cette capacité de réduction des radicaux libres de *nepeta amethystina* est due, principalement, à leur profil chimique riche en composés phénoliques et les flavonoïdiques. Ces composés, grâce à leurs propriétés d'oxydo-réduction, agissent en tant qu'agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et d'oxygène singulier [99] [100] [101].

En général, la synergie des différents constituants d'une huile essentielle ou extraits est à l'origine du pouvoir antioxydant [102].

II.6. Résultats de l'activité anticandidose des extraits

II.6.1. Méthode de Vincent

D'après les résultats obtenus (tableau 5) et illustrés graphiquement par la figure 22, on remarque que l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat possèdent une forte activité contre *Candida albicans* avec des diamètres d'inhibitions oscillant entre 35 mm et 45mm. Par contre les autres fractions n'ont montré aucune activité sur candida.

Tableau 5 : Résultats du pouvoir anticandida par la méthode de Vincent

Les souches (<i>C. albicans</i>)	Diamètres d'inhibition Ø (mm)							
	Huile essentielle	Extrait de l'hydrolat	Extrait aqueux	Extrait éthanolique	Extrait étherique	Flavonoïdes brut	Fraction d'Acétate d'éthyle	Fraction 1-butanol Des flavonoïdes
ATTC 10231	45	37	-	-	-	-	11	7
ATCC 26790	40	41	-	-	-	-	-	7
IPP 444	37	35	-	-	-	-	-	-

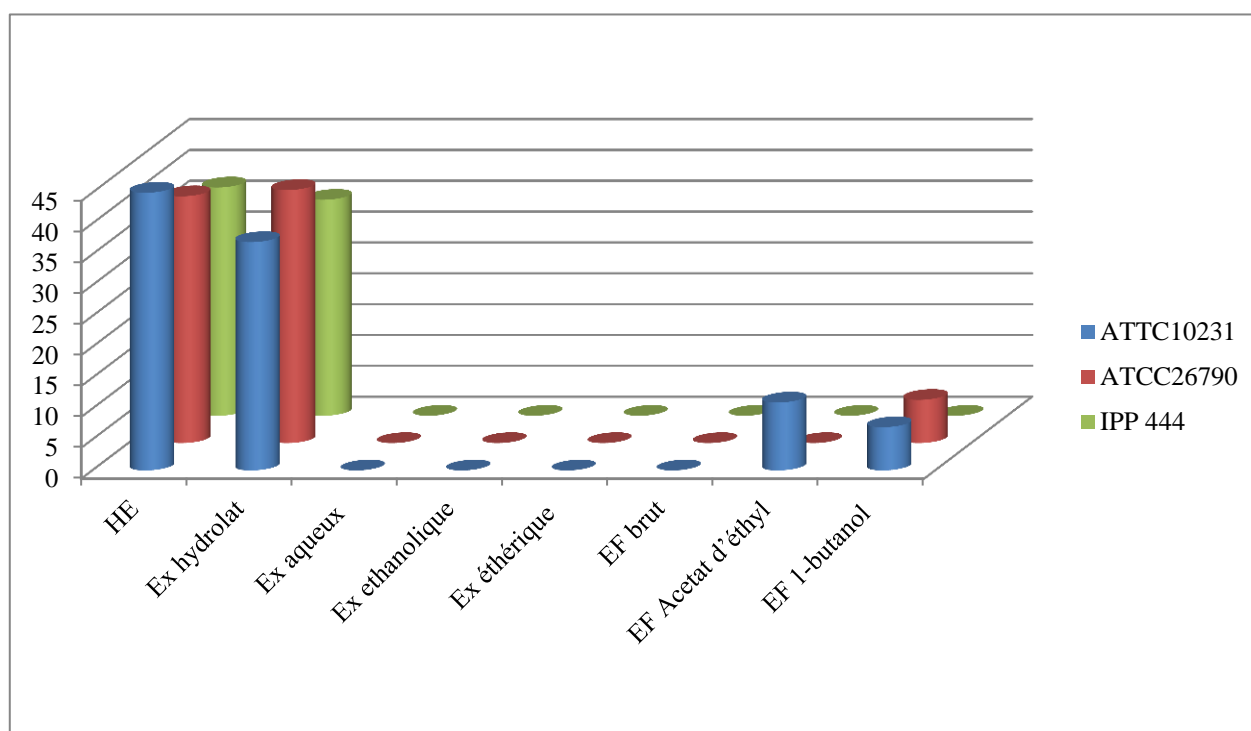


Figure 22: Diamètres des zones d'inhibition en millimètres (mm)

II.6.2. Détermination de la concentration inhibitrice de biofilm (CIB)

D'après le tableau 6, illustré graphiquement par la figure 23, on remarque que les fractions à l'acétate d'éthyle et au butanol sont plus actives sur *C. albicans* (CIB : 2,5 mg/ml et 1mg/ml) respectivement. Par contre, l'HE s'est révélé moins active que l'extrait d'hydrolat qui lui s'est montré plus actif vis-à-vis de *Candida albicans* à l'état biofilm. La souche 10231 a le pouvoir de former le biofilm plus que les autres souches.

La littérature n'apporte qu'une seule étude qui rapporte l'effet de l'huile essentielle de *Thymus capitata* sur la réduction du métabolisme du biofilm déjà formé par *C. albicans* à 62,71 % et sur la réduction de sa biomasse à 71,96 % [103].

Tableau 6: Résultats de la détermination de la concentration inhibitrice de biofilm

Les souches	CIB mg/ml			
	Huile essentielle	Extrait de l'hydrolat	Fraction Acétate d'éthyle	Fraction butanol
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	60	3,75	2,5	1
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	30	1,875	2,5	1
<i>C. albicans</i> IPP 444	30	1,875	5	1

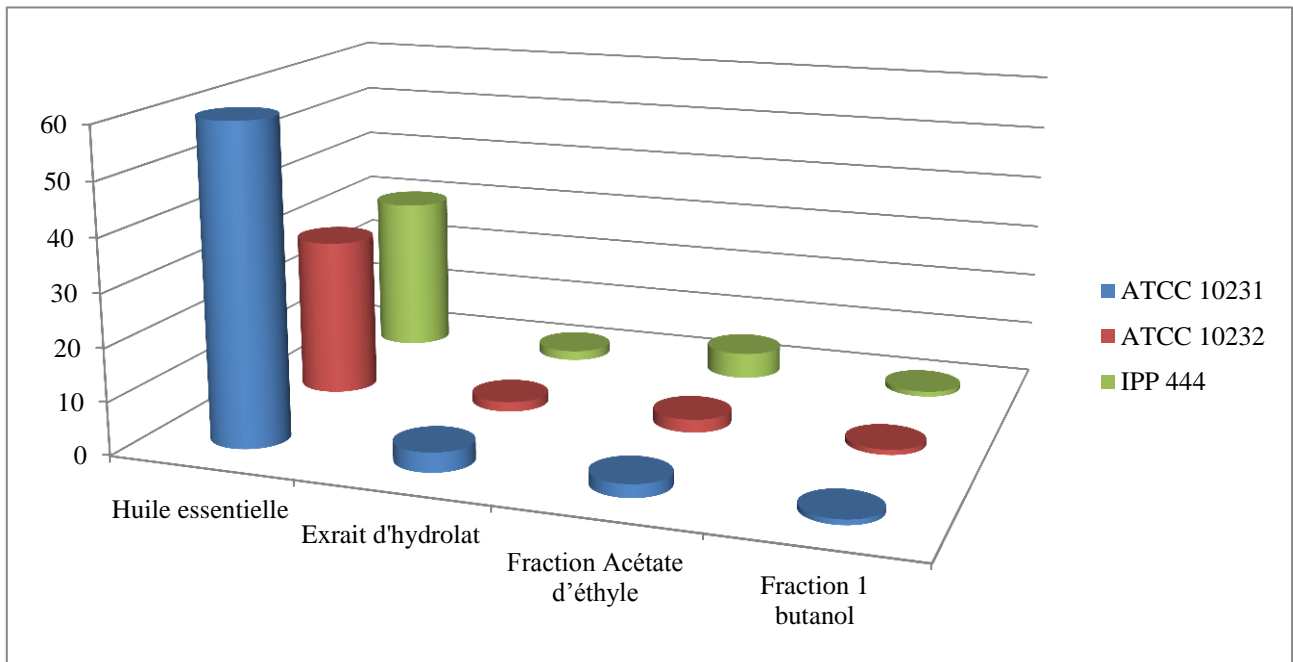


Figure 23: Résultats de la détermination de la concentration inhibitrice de biofilm

Conclusion générale

Conclusion générale

Les plantes restent la source prédominante de médicaments pour la majorité de la population mondiale en particulier dans les pays en voie de développements.

La nouvelle démarche consiste à s'intéresser à la recherche d'un principe actif dans les produits naturels d'origine végétal, plus particulièrement les métabolites secondaires à savoir les HE et les flavonoïdes, issus des plantes aromatiques et médicinales qui sont utilisées depuis longtemps pour traiter des maladies.

Le présent travail portant sur l'examen phytochimique et l'évaluation du pouvoir antioxydant et antifongique de quelques extraits de *Nepeta amethystina* nous a permis de conclure que :

- L'espèce *Nepeta amethystina* est riche en huile essentielle, en flavonoïdes et en tanins,
- Les flavonoïdes sont présents dans l'ordre de 7,68 % pour les flavonoïdes libres et 0,52% pour les flavonoïdes hétérosidiques,
- La plante avec un rendement en HE (0,37 %) et en extrait d'hydrolat (0,25 %) présente un profil terpénique riche en composés oxygénés en particulier le 4 α ,7 α ,7 α -Népétalactone et le 4 α ,7 α ,7 β -Népétalactone.
- L'activité antioxydante évaluée par deux méthodes (DPPH et FRAP) a révélé que l'huile essentielle, l'extrait d'hydrolat et les extraits flavonoïdiques de *Nepeta amethystina* ont un pouvoir anti-oxydant intéressant,
- Quant à l'activité anticandida, l'HE et l'extrait d'hydrolat se sont montrés très actifs sur *Candida albicans* par la méthode d'aromatogramme, alors que par la méthode de détermination des concentrations inhibitrices de biofilms, les fractions acétate d'éthyle et butanol sont plus inhibitrices de *Candida albicans* à l'état biofilm que les autres extraits.

L'aromathérapie et l'hydrolathérapie peuvent jouer un rôle important dans le traitement des infections systémiques et non systémiques. Ainsi, les eaux florales constituent un bon solvant pour les préparations pharmaceutiques, cosmétiques et culinaires.

Ce travail n'est qu'une initiation à la connaissance de la composition chimique et de l'activité biologique de *Nepeta amethystina* et mérite une continuation afin d'élucider la composition d'autres métabolites et d'approuver d'autres tests biologiques.

Références bibliographiques

Référence bibliographique :

- [1] A. Chevallier et P. Iserin, *Les plantes médicinales: identifications, préparations, soins*. Vevey: Ed. Mondo, 1998.
- [2] *LA PLANTE MEDICINALE. De la tradition à la science - C Duraffourd, Collectif, Jean-Claude Lapraz, R Chemli.* .
- [3] A. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, et N. Vidal, « Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds », *Food Chem.*, vol. 97, n° 4, p. 654-660, août 2006.
- [4] A. Velasco-Negueruela, M. Perez-Alonso, J, et A. B. Rodriguez, « Continuación del estudio químico de los aceites esenciales de nepetas ibéricas : *Nepeta nepetella* L. y *N. amethystina* Poiret », *An. Jardín Botánico Madr.*, vol. 47, n° 2, p. 395-400, 1989.
- [5] M. SELADJI, C. BEKHECHI, F. BEDDOU, H. DIB, et N. BENDIMERAD, « Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria », vol. 4, n° 02, p. 012-016, févr. 2014.
- [6] D. J. Mabberley, *The Plant-book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants Utilizing Kubitzki's The Families and Genera of Vascular Plants (1990-), Cronquist's An Integrated System of Classification of Flowering Plants (1981), and Current Botanical Literature, Arranged Largely on the Principles of Editions 1-6 (1896/97-1931) of Willis's A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns*. Cambridge University Press, 1997.
- [7] J. Coats, G. Schultz, et C. Peterson, « Botanical products as repellents against mosquitoes and cockroaches. Abstracts Of Papers American Chemical Society. », 2003.
- [8] E. Kalpoutzakis, N. Aligiannis, A. Mentis, S. Mitaku, et C. Charvala, « Composition of the Essential Oil of Two *Nepeta* Species and in vitro Evaluation of their Activity against *Helicobacter pylori* », *Planta Med.*, vol. 67, n° 9, p. 880-883, déc. 2001.
- [9] P. Quézel et S. Santa, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Éditions du Centre national de la Recherche scientifique, 1962.
- [10] G. Usher, *A dictionary of plants used by man*. Delhi - India, 1984.
- [11] G. Gkinis, O. Tzakou, D. Iliopoulou, et V. Roussis, « Chemical composition and biological activity of *Nepeta parnassica* oils and isolated nepetalactones », *Z. Für Naturforschung C J. Biosci.*, vol. 58, n° 9-10, p. 681-686, oct. 2003.
- [12] J. L. Uberta et B. Valdes, *Revisión del género Nepeta(Labiatae) en la Península Ibérica e Islas Baleares*. Sevilla, 1983.

- [13] B. Valdés, S. Talavera, E. Fernández-Galiano, et Fundación para la Ecología y la Protección del Medio Ambiente, *Flora vascular de Andalucía occidental*. Barcelona: Ketres Editora, 1987.
- [14] R. H. PDea Cantino, « Genera of Labiatae status and classification », 1992.
- [15] A. Velasco-Negueruela, M. Perez-Alonso, J, et A. Buades Rodriguez, « Continuación del estudio químico de los aceites esenciales de nepetas ibéricas : *Nepeta nepetella* L. y *N. amethystina* Poiret », *An. Jardín Botánico Madr.*, vol. 47, n° 2, p. 395-400, 1989.
- [16] A.Sanon, M.Garba, J. Auger, et J. Huiganrt, « Journal of Stored Products Research », p. 129, 2002.
- [17] F. Baghdad, « L'aromathérapie et citrus », Thèse de phamacie, Montpellier, France, 1988.
- [18] S. Cosentino, C. I. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi, et F. Palmas, « In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 29, n° 2, p. 130-135, août 1999.
- [19] N. T. Jou, R. B. Yoshimori, G. R. Mason, J. S. Louie, et M. R. Liebling, « Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, n° 5, p. 1161-1165, mai 1997.
- [20] M. . De Buochberg, S. Allegrini, C. Bessiere, M. Attisso, J. Passet, et R. Granger, « Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris linnaeus* », vol. 58, p. 527-536, 1976.
- [21] G. Jacques et S. . Paltz, « Le fascinant pouvoir des huiles essentielles. Fascicule du laboratoire "Jacque Paltz" », 1997.
- [22] R. Guy, *Les huiles essentielles pour votre sante*. France, 1992.
- [23] J. . Maruzzella, « The germicidal properties of perfume oils perfumery chemicals », vol. 77, p. 67-72, 1962.
- [24] I. Vargas, I. Sanz, et E. Prima-Yufera, « Antimicrobial and Antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed range essential oil », vol. 62, n° 8, p. 929-932.
- [25] M. Lis-Balchin, G. Buchbauer, T. Hirtenlehner, et M. Resch, « Antimicrobial activity of *Pelargonium* essential oils added to a quiche filling as a model food system », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 27, n° 4, p. 207-210, oct. 1998.
- [26] K. J. Lachowicz, G. P. Jones, D. R. Briggs, F. E. Bienvenu, J. Wan, A. Wilcock, et M. J. Coventry, « The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 26, n° 3, p. 209-214, mars 1998.

- [27] K. A. Hammer, C. F. Carson, et T. V. Riley, « Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 86, n° 6, p. 985-990, juin 1999.
- [28] G. E. B. Burdock, *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*, 3rd Edition edition. CRC Press.
- [29] K. S. Bilgrami, K. K. Sinha, et A. K. Sinha, « Inhibition of aflatoxin production & growth of *Aspergillus flavus* by eugenol & onion & garlic extracts », *Indian J. Med. Res.*, vol. 96, p. 171-175, juin 1992.
- [30] H. Hitokoto, S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai, et H. Kurata, « Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 39, n° 4, p. 818-822, avr. 1980.
- [31] « Trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention: first report--Tuberculosis Prevention Trial., Trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention: first report: Tuberculosis Prevention Trial*,1 », *Bull. World Health Organ. Bull. World Health Organ.*, vol. 57, 57, n° 5, 5, p. 819, 819-827, 1979.
- [32] L. Beraoud, J. M. Bessiere, et A. Tantaoui Elaraki, « Chemical composition of the essential oils of selected plant materials used in Moroccan cuisine », *Al-Biruniya*, vol. 7, n° 1, p. 49-69.
- [33] L. R. Beuchat, « SENSITIVITY OF *Vibrio parahaemolyticus* TO SPICES AND ORGANIC ACIDS », *J. Food Sci.*, vol. 41, n° 4, p. 899-902, 1976.
- [34] M. S. Madhyastha et R. V. Bhat, « *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production on black and white pepper and the inhibitory action of their chemical constituents. », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 48, n° 2, p. 376-379, août 1984.
- [35] J. Bruneton, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris; Cachan: Éd. Tec & doc ; Éd. médicales internationales, 2009.
- [36] J. Vercauteren, C. Chèze, et J. Triaud, *Polyphenols 96: 18th International Conference on Polyphenols, Bordeaux (France), July 15-18, 1996*. Editions Quae, 1998.
- [37] T. Hennebelle, S. Sahpaz, et F. Bailleul, « Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif », *Phytotherapie*, vol. 2, n° 1, p. 3-6, janv. 2004.
- [38] J. B. Harborne, *Introduction to Ecological Biochemistry*. Gulf Professional Publishing, 1993.
- [39] D. I. Tsimogiannis, « The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members ». .
- [40] S. N. Y. Mukohata, « Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. », *FEBS Lett.*, vol. 85, n° 2, p. 215-8, 1978.
- [41] B. H. Havsteen, « The biochemistry and medical significance of the flavonoids », *Pharmacol. Ther.*, vol. 96, n° 2-3, p. 67-202, déc. 2002.

- [42] R. Edenharder et D. Grünhage, « Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102 », *Mutat. Res.*, vol. 540, n° 1, p. 1-18, sept. 2003.
- [43] L. H. Yao, Y. M. Jiang, J. Shi, F. A. Tomás-Barberán, N. Datta, R. Singanusong, et S. S. Chen, « Flavonoids in food and their health benefits », *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.*, vol. 59, n° 3, p. 113-122, 2004.
- [44] R. B. Paulo Figueiredo, « Molecular Interactions of Phenolic Compounds and Colour of Fruit and Vegetables », 1995.
- [45] E. Haslam, « Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action », *J. Nat. Prod.*, vol. 59, n° 2, p. 205-215, févr. 1996.
- [46] M. M. Cowan, « Plant products as antimicrobial agents », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, n° 4, p. 564-582, oct. 1999.
- [47] A. Scalbert, « Antimicrobial properties of tannins », *Phytochemistry*, vol. 30, n° 12, p. 3875-3883, 1991.
- [48] « Coumarin's Biology: Biology, Applications and Mode of Action par O'Kennedy, R. (Editor)/ Thornes, R. Douglas (Editor): John Wiley & Sons Inc 9780471969976 Hardcover - Revaluation Books ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.abebooks.fr/Coumarins-Biology-Applications-Mode-Action-OKennedy/1113125135/bd>. [Consulté le: 15-mars-2014].
- [49] A. Crozier, M. N. Clifford, et H. Ashihara, *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Wiley, 2006.
- [50] E. Middleton Jr, C. Kandaswami, et T. C. Theoharides, « The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer », *Pharmacol. Rev.*, vol. 52, n° 4, p. 673-751, déc. 2000.
- [51] R. Ksouri, W. Megdiche, H. Falleh, N. Trabelsi, M. Boulaaba, A. Smaoui, et C. Abdelly, « Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes », *C. R. Biol.*, vol. 331, n° 11, p. 865-873, nov. 2008.
- [52] R. J. Nijveldt, E. van Nood, D. E. van Hoorn, P. G. Boelens, K. van Norren, et P. A. van Leeuwen, « Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 74, n° 4, p. 418-425, janv. 2001.
- [53] L. . Leong et G. Shui, « An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets », *Food Chem.*, vol. 76, n° 1, p. 69-75, janv. 2002.

- [54] P. Hodek, P. Trefil, et M. Stiborová, « Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450 », *Chem. Biol. Interact.*, vol. 139, n° 1, p. 1-21, janv. 2002.
- [55] S. A. van Acker, G. P. van Balen, D. J. van den Berg, A. Bast, et W. J. van der Vijgh, « Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 56, n° 8, p. 935-943, oct. 1998.
- [56] O. Benavente-García, J. Castillo, F. R. Marin, A. Ortuño, et J. A. Del Río, « Uses and Properties of Citrus Flavonoids », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, n° 12, p. 4505-4515, déc. 1997.
- [57] C. M. Andersson, A. Hallberg, et T. Hogberg, « Advances in the development of pharmaceutical antioxidants », *Adv. Drug Res.*, vol. 28, p. 65, 1996.
- [58] T. Hennebelle, S. Sahpaz, et F. Bailleul, « Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif », *Phytotherapie*, vol. 2, n° 1, p. 3-6, janv. 2004.
- [59] Y. Zhang, S. K. Vareed, et M. G. Nair, « Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables », *Life Sci.*, vol. 76, n° 13, p. 1465-1472, févr. 2005.
- [60] K. T. Chung, T. Y. Wong, C. I. Wei, Y. W. Huang, et Y. Lin, « Tannins and human health: a review », *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 38, n° 6, p. 421-464, août 1998.
- [61] I. Rahman, « Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets », *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, vol. 1, n° 3, p. 291-315, sept. 2002.
- [62] H. Yoshida, T. Ishikawa, H. Hosoi, M. Suzukawa, M. Ayaori, T. Hisada, S. Sawada, A. Yonemura, K. Higashi, T. Ito, K. Nakajima, T. Yamashita, K. Tomiyasu, M. Nishiwaki, F. Ohsuzu, et H. Nakamura, « Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 58, n° 11, p. 1695-1703, déc. 1999.
- [63] « Publication - Etude des activités biologiques de fagara zanthoxyloides Lam (Rutaceae) », *MaliSante*. [En ligne]. Disponible sur: <http://malisante.net/index.php/component/jresearch/?view=publication&task=show&id=3&Itemid=228>. [Consulté le: 20-mars-2014].
- [64] N. Rangkadilok, S. Sitthimonchai, L. Worasuttayangkurn, C. Mahidol, M. Ruchirawat, et J. Satayavivad, « Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract », *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 45, n° 2, p. 328-336, févr. 2007.

- [65] L. Price et S. Price, *Understanding hydrolats: the specific hydrosols for aromatherapy : a guide for health professionals*. Edinburgh; New York: Churchill Livingstone, 2004.
- [66] N. Fiberg, « Candidoses systémiques et technique d'antifongogramme, 2^{ème} années Master IMVI », 2^{ème} années Master IMVI Microbiologie, Mycologie fondamentale, Paris, Paris, France, 2004.
- [67] J. W. Costerton, P. S. Stewart, et E. P. Greenberg, « Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections », *Science*, vol. 284, n^o 5418, p. 1318-1322, mai 1999.
- [68] C. Beloin, A. Roux, et J. M. Ghigo, « Escherichia coli biofilms », *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 322, p. 249-289, 2008.
- [69] J. L. Guignard, *Abrégé de botanique*, 2^{ème} Edition. Paris: Masson, 1979.
- [70] J. Bruneton, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris; Cachan: Éd. Tec & doc ; Éd. médicales internationales, 2009.
- [71] W. C. Evans, D. Evans, et G. E. Trease, *Trease and Evans pharmacognosy*. Edinburgh; New York: Saunders/Elsevier, 2009.
- [72] J. Memelink, R. Verpoorte, et J. W. Kijne, « ORCANization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism », *Trends Plant Sci.*, vol. 6, n^o 5, p. 212-219, mai 2001.
- [73] B. R. Rajeswara Rao, P. N. Kaul, K. V. Syamasundar, et S. Ramesh, « Water soluble fractions of rose-scented geranium (Pelargonium species) essential oil », *Bioresour. Technol.*, vol. 84, n^o 3, p. 243-246, sept. 2002.
- [74] E. Kovats, « Gas Chromatographic characterisation of organic substances in the retention index system, in *Advances in Chromatography* », p. 229-247, 1965.
- [75] W. . Köning, D. . Hochmuth, et D. Joulain, « Terpenoids and related constituents of essential oils », University of Hambourg, Institute of Organic Chemistry, 2001.
- [76] N. US Department of Commerce, « All NIST News ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.nist.gov/allnews.cfm?s=10-01-1999&e=12-31-1999>. [Consulté le: 17-mai-2014].
- [77] F. . Mc Lafferty et D. . Stauffer, *Wiley Registry of Mass Spectra Data, 6th Ed. Mass spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM*, 3.10d éd. Palisade: Newfield, 1994.
- [78] R. P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. Allured Pub. Corporation, 2001.
- [79] Lasève, « Mass Spectra and Retention Indices Data Base », Université de Québec à Chicoutoumi (UQAC), Canada, 1996.
- [80] R. P. Adams, *Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy*. Academic Press, 1989.

- [81] V. L. Singleton, R. Orthofer, et R. M. Lamuela-Raventos, « ANALYSIS OF TOTAL PHENOLS AND OTHER OXIDATION SUBSTRATES AND ANTIOXIDANTS BY MEANS OF FOLIN-CIOCALTEU REAGENT », *Methods Enzymol.*, vol. 299, p. 152-178, 1999.
- [82] J. G. R. TM Upson, « Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. », *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 28, n° 10, p. 991-1007, 2001.
- [83] C. Sanchez-Moreno' et J. A. Larrauri, « Principales metodos para la determinacion de la oxidacion lipidica Main methods used in lipid oxidation determination », *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 4, n° 6, p. 391-399, 1998.
- [84] R. M. Samarth, M. Panwar, M. Kumar, A. Soni, M. Kumar, et A. Kumar, « Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts », *Food Chem.*, vol. 106, n° 2, p. 868-873, janv. 2008.
- [85] M. Oyaizu, « Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. », vol. 44, p. 307-315, 1986.
- [86] J. Hubert, « Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja :étude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines », phd, 2006.
- [87] F. Beylier-Maurel, « Activités bactériostatiques des matières premières de parfumerie », *Riv. Ital. EPPOS*, p. 58-280, 1976.
- [88] M. Lis-Balchin, G. Buchbauer, T. Hirtenlehner, et M. Resch, « Antimicrobial activity of Pelargonium essential oils added to a quiche filling as a model food system », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 27, n° 4, p. 207-210, oct. 1998.
- [89] A. Nostro, A. S. Roccaro, G. Bisignano, A. Marino, M. A. Cannatelli, F. C. Pizzimenti, P. L. Cioni, F. Procopio, et A. R. Blanco, « Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms », *J. Med. Microbiol.*, vol. 56, n° Pt 4, p. 519-523, avr. 2007.
- [90] M. SELADJI, C. BEKHECHI, F. BEDDOU, H. DIB, et N. BENDIMERAD, « Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria », vol. 4, n° 02, p. 012-016, févr. 2014.
- [91] O. Tzakou, C. Harvala, E. M. Galati, et R. Sanogo, « Essential oil composition of *Nepeta argolica* Bory et Chaub. subsp. *argolica* », *Flavour Fragr. J.*, vol. 15, n° 2, p. 115-118, mars 2000.
- [92] A. V. Negueruela, M. M. Rico, P. B. Benito, et M. J. Pérez-Alonso, « Composicion de los aceites esenciales de *Nepeta nepetella subsp. argolica*, *Nepeta coerulea subsp. coerulea* y *Nepeta cataria* », *G. Bot. Ital.*, vol. 122, n° 5-6, p. 295-302, 1988.

- [93] L. Majhenič, M. Škerget, et Ž. Knez, « Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts », *Food Chem.*, vol. 104, n° 3, p. 1258-1268, 2007.
- [94] P. Molyneux, « The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity », *Songklanakarin J Sci Technol*, vol. 26, n° 2, p. 211–219, 2004.
- [95] I. F. Benzie et J. J. Strain, « The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay », *Anal. Biochem.*, vol. 239, n° 1, p. 70-76, juill. 1996.
- [96] C. Li, C. D. Oldham, et S. W. May, « NN-dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine alpha-amidating mono-oxygenase catalysis », *Biochem. J.*, vol. 300 (Pt 1), p. 31-36, mai 1994.
- [97] Y.-C. Chung, C.-T. Chang, W.-W. Chao, C.-F. Lin, et S.-T. Chou, « Antioxidative Activity and Safety of the 50 Ethanolic Extract from Red Bean Fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1 », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n° 8, p. 2454-2458, avr. 2002.
- [98] R. Amarowicz, R. B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, et J. A. Weil, « Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies », *Food Chem.*, vol. 84, n° 4, p. 551-562, mars 2004.
- [99] B. Tepe, M. Sokmen, H. A. Akpulat, D. Daferera, M. Polissiou, et A. Sokmen, « Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans* », *J. Food Eng.*, vol. 66, n° 4, p. 447-454, févr. 2005.
- [100] B. Tepe, A. Sihoglu-Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, et A. Sokmen, « Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. », *Food Chem.*, vol. 103, n° 3, p. 766-770, 2007.
- [101] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, P. G. Bolwell, P. M. Bramley, et J. B. Pridham, « The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids », *Free Radic. Res.*, vol. 22, n° 4, p. 375-383, avr. 1995.
- [102] G. Vardar-Unlü, F. Candan, A. Sökmen, D. Daferera, M. Polissiou, M. Sökmen, E. Dönmez, et B. Tepe, « Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae) », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, n° 1, p. 63-67, janv. 2003.
- [103] A. Palmeira-de-Oliveira, C. Gaspar, R. Palmeira-de-Oliveira, A. Silva-Dias, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, C. Pina-Vaz, J. Martinez-de-Oliveira, J. A. Queiroz, et A. G. Rodrigues, « The anti-*Candida* activity of *Thymbra capitata* essential oil: effect upon pre-formed biofilm », *J. Ethnopharmacol.*, vol. 140, n° 2, p. 379-383, mars 2012.
- [104] AFNOR, *Huiles essentielles: Recueil, normes*. AFNOR, 2000.

Annexes :**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 2,5gd'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 substituant des quinones, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

La densité de l'huile essentielle et l'extrait de l'hydrolat :

La densité relative de l'huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à 20°C [104].

Les valeurs d_{20}^{20} de l'huile essentielle et l'extrait de l'hydrolat à 20°C

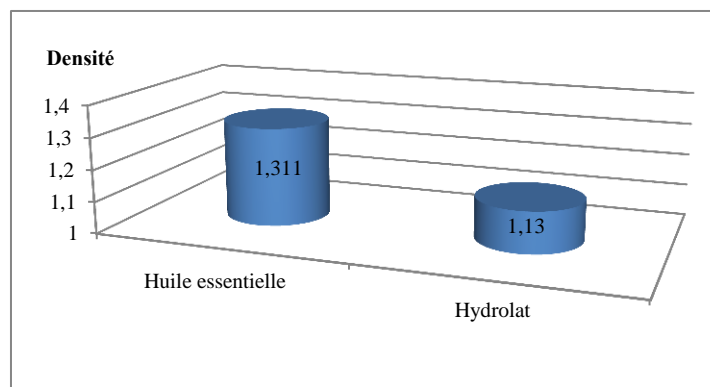
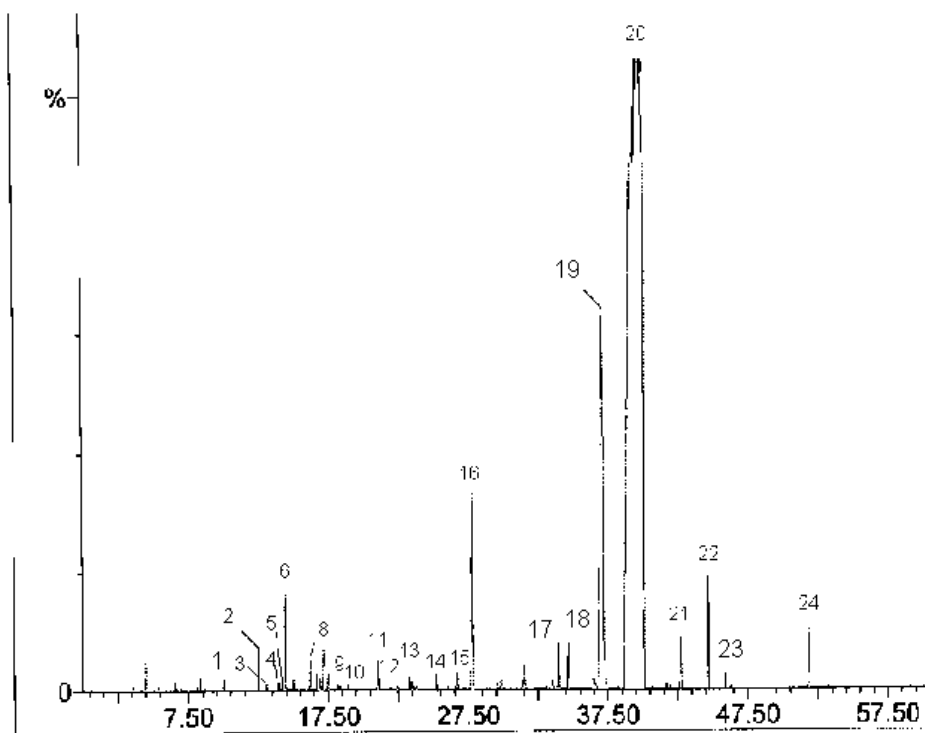
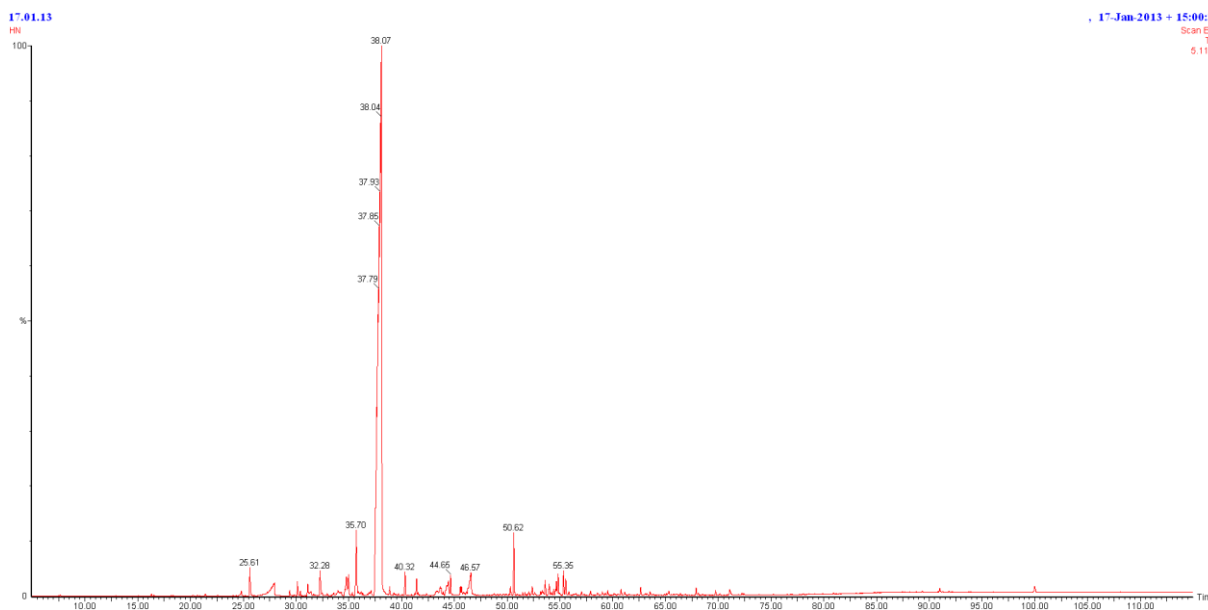


Figure 24: Densité de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat



Annexe 1: Chromatogramme CPG/SM de l'HE brute de *N. amethystina*

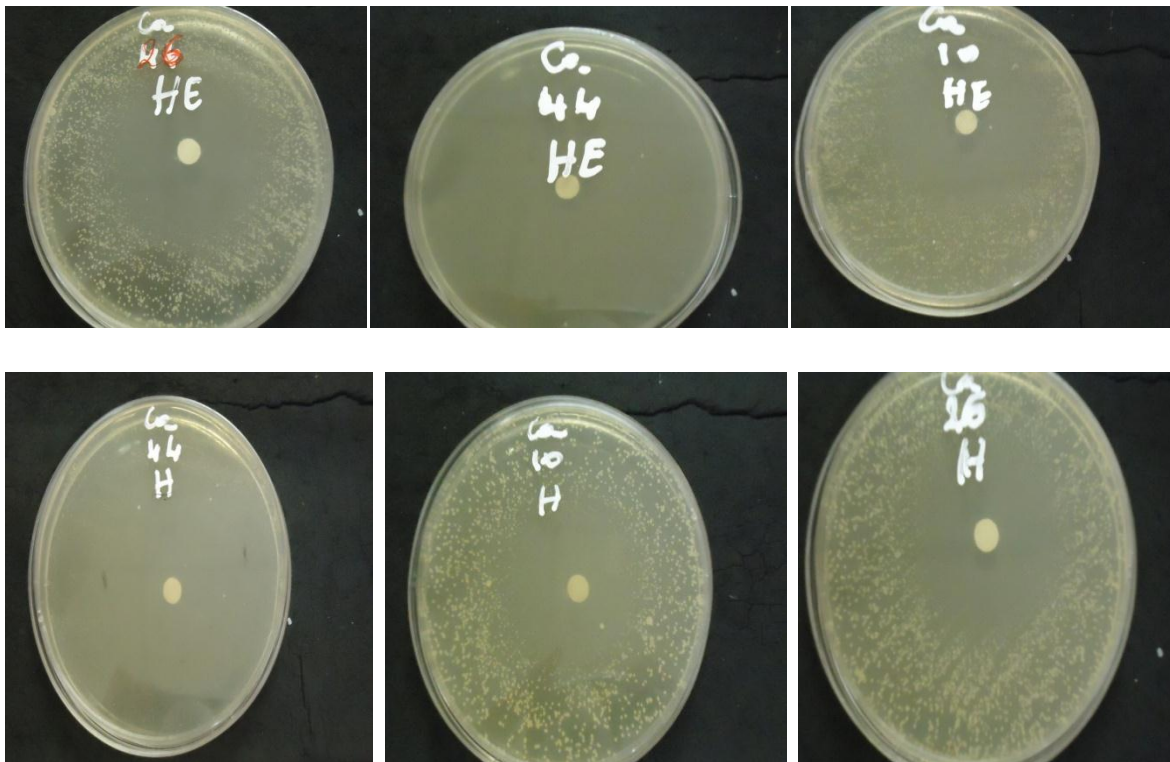


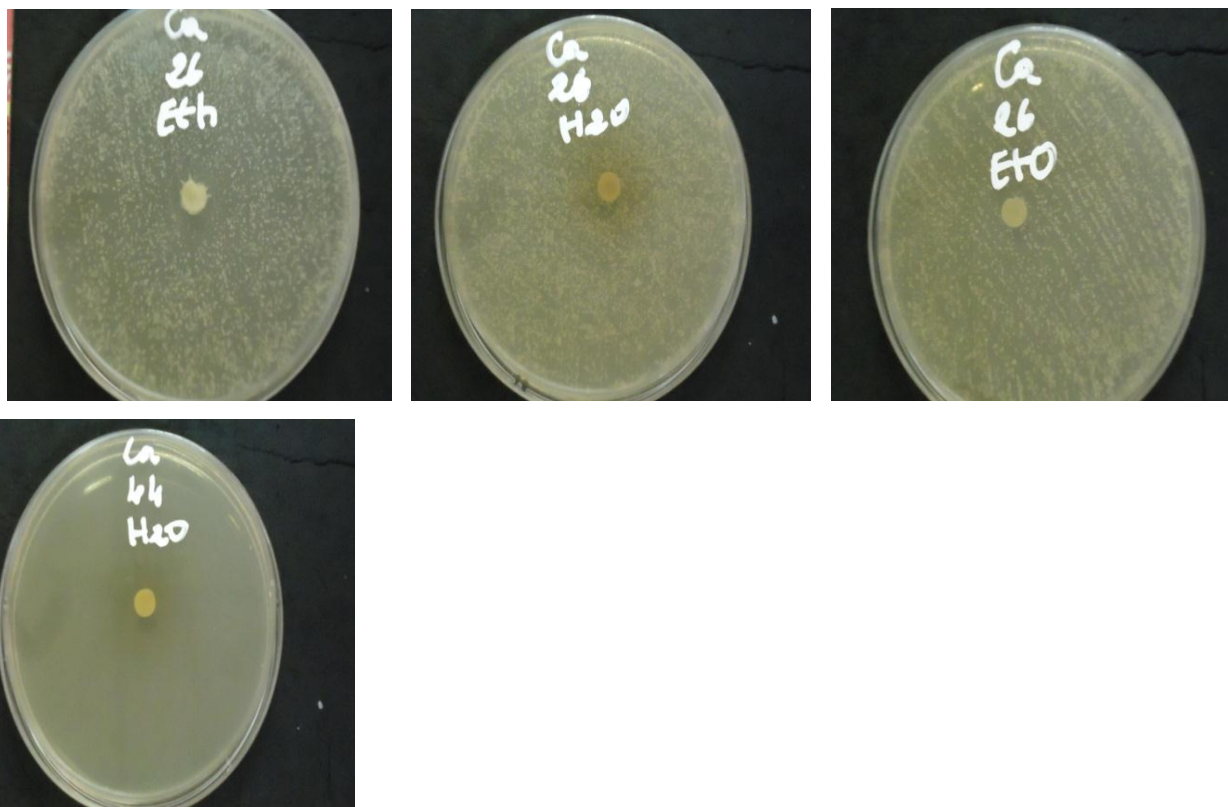
Annexe 2: Chromatogramme CPG/SM de l'extrait d'hydrolat de *N. amethystina*



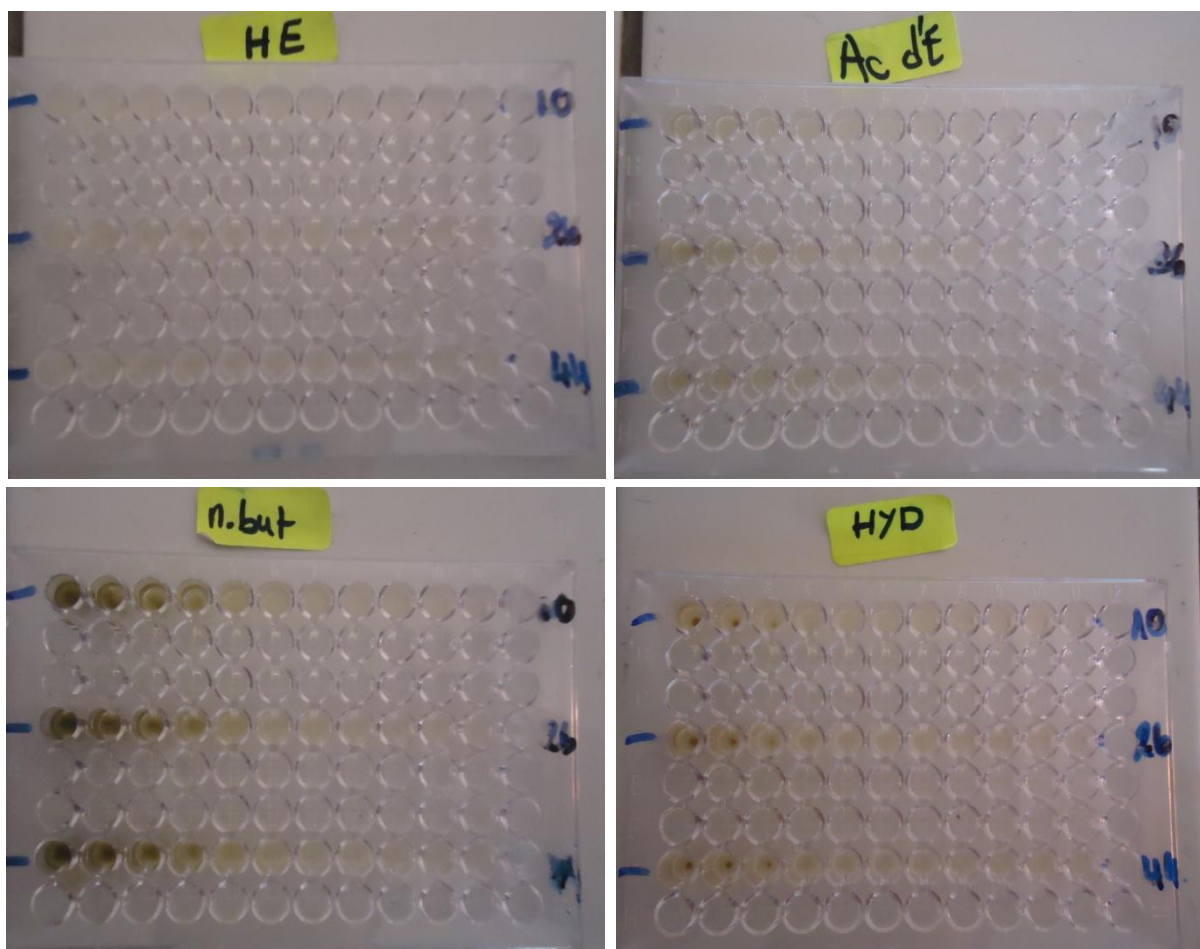
Annexe 3: Spectrophotomètre UV/Vis Optizen POP

Annexe 4: activité antifongique de *Nepeta amethystina* sur *Candida albicans* (Aromatogramme)





Annexe 5: Résultats de la détermination de la concentration inhibitrice de biofilm



Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes et des capacités antioxydantes.

L'huile essentielle et l'extrait de l'hydrolat de *N. amethystina* est analysée par CPG/CPG-SM.

Le dosage des phénols totaux effectués sur les extraits (aqueux ; étherique ; éthanolique) et le dosage des flavonoïdes effectués sur les fractions flavonoïdiques ont été déterminés à partir des courbes d'étalonnage d'acide gallique et catéchine respectivement.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) et celle du piégeage de radical libre DPPH de huile essentielle ; extrait de l'hydrolat et des extraits méthanolique; étherique et aqueux et des fractions brute; d'acétate d'éthyle et 1-butanol a montré que l'ensemble de nos extraits possèdent un pouvoir antioxydant modéré en particulier huile essentielle; extrait de l'hydrolat et les extraits méthanolique et la fraction d'acétate d'éthyle.

L'effet anticandidose de huile essentielle; extrait de l'hydrolat;et les fractions d'acétate d'éthyle et 1-butanol est plus important que celui de l'extrait aqueux; éthanolique et étherique.

Mots clés: Produits naturels, Huiles essentielles, CPG/SM, Activité antifongique, Activité antioxydante.

Abstract :

The natural extracts of plants contain a variety of phenolic compounds and essential oils, which are attributed to an inhibitor of microorganisms and antioxidant abilities.

The essential oil and extract hydrolate *N. amethystina* is analyzed by GC / GC-MS. The determination of total phenols performed on extracts (aqueous, etheric, ethanol) and the determination of flavonoids performed on flavonoid fractions were determined from gallic acid and catechin calibration curves respectively.

Evaluation of antioxidant activity by the method of reduction of iron (FRAP) and the trapping of free radical DPPH essential oil; hydrosol extract and methanol extracts; etheric and aqueous and crude fractions; of ethyl acetate and 1 -butanol has shown that all of our extracts in particular have a moderate antioxidant essential oil; hydrosol extract and methanol extracts and the ethyl acetate fraction.

Anticandidose The effect of essential oil; extract hydrosol, and the portions of ethyl acetate and 1-butanol is greater than that of the aqueous extract; ethanolic and etheric.

Keywords: natural products, essential oils, GC/MS, antifungal activity, antioxidant activity.