

**UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID-TLEMCCEN**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Science de la Terre et de l'Univers  
Département de Biologie

Présenté pour obtenir le grade

**DE MASTER ACADEMIQUE EN BIOLOGIE**

Option : Alimentation et Nutrition

Par

**Mr. SELADJI SIDI-MOHAMED CHAHR-EDDINE**

Soutenu le 11 Juillet 2013



Intitulé

**Étude phytochimique et activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne) des composés phénoliques des extraits de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus* (Guezzeh) de la région de Biskra**

Jury

<b>M<sup>me</sup>. BENDIMERAD N.</b>	<b>Professeur à l'Université de Tlemcen</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup>. ATIK BEKKARA F.</b>	<b>Professeur à l'Université de Tlemcen</b>	<b>Encadreur</b>
<b>M<sup>me</sup>. BELYAGOUBI N.</b>	<b>Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen</b>	<b>Examinatrice</b>



# UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID-TLEMCEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Science de la Terre et de l'Univers  
Département de Biologie

Présenté pour obtenir le grade

## DE MASTER ACADEMIQUE EN BIOLOGIE

Option : Alimentation et Nutrition

Par

**Mr. SELADJI SIDI-MOHAMED CHAHR-EDDINE**

Soutenu le 11 Juillet 2013

### Intitulé

**Étude phytochimique et activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne) des composés phénoliques des extraits de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus* (Guezzeh) de la région de Biskra**

### Jury

<b>M<sup>me</sup>. BENDIMERAD N.</b>	<b>Professeur à l'Université de Tlemcen</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup>. ATIK BEKKARA F.</b>	<b>Professeur à l'Université de Tlemcen</b>	<b>Encadreur</b>
<b>M<sup>me</sup>. BELYAGOUBI N.</b>	<b>Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>f</sup>. BELYAGOUBI L.</b>	<b>Maître assistant à l'Université de Tlemcen</b>	<b>Examineur</b>

## *Dédicaces*

*Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout puissant pour m'avoir donné la force, la volonté, et la patience pour atteindre mon objectif.*

*J'ai l'honneur de dédié ce mémoire a tout ceux qui sont proche à mes yeux :*

*A mes parents*

*A ma femme*

*A ma fille*

*A mes frères et sœurs neveux et nièces*

## *Remerciements*

Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) de l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, sous la direction de Mme Atik Bekkarafawzia.

Je tiens à remercier vivement Mme Atik Bekkara Fawzia Professeur à l'université de au département de biologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie et Sciences de la terre et de l'Univers, pour m'avoir fait l'honneur d'accepté la direction de mon mémoire. Sa disponibilité son dynamisme, son aide, ses précieux conseils m'ont ouvert les yeux pour mieux avancer dans mes recherches. Je la remercie particulièrement pour son soutien et ses qualités humaines.

A Mme Bendimerad Nassima, Professeur à l'université au département de biologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie et Sciences de la terre et de l'Univers, pour l'honneur qu'elle m'accorde de l'avoir comme présidente de jury pour l'enrichissement de nos connaissances.

Je remercie Mr Belyagoubi Larbi, Maître assistant à l'université au département de biologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie et Sciences de la terre et de l'Univers pour sa gentillesse et sa disponibilité et pour m'avoir fait l'honneur d'accepté d'examiner ce modeste travail.

Mme Belyagoubi Nabila, Maître de conférence à l'université au département de biologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie et Sciences de la terre et de l'Univers de Tlemcen, pour sa disponibilité et ses conseils précieux qu'elle nous a prodiguée au cours de notre recherche ainsi que pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire.

Nous tenons, de plus à exprimer notre profonde reconnaissance et nos chaleureux remerciements à Aissaoui G, Benmahjoub M, Kanoun K, Gambaza N, Seladji M, Bedou F, Toul F, Benabdelkader S.

À toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste mémoire, qu'ils reçoivent ici aussi mes sincères remerciements.

## Résumé

---

Notre étude sur *Pituranthus chloranthus* porte en premier lieu sur un screening phytochimique visant à caractériser les différentes familles de composés chimiques et en deuxième lieu l'évaluation des activités biologiques (antioxydantes et antimicrobienne) sur les parties aériennes de cette plante.

Les tests phytochimiques nous ont permis de mettre en évidence la présence de sept familles chimiques : les flavonoides, les tannins, les tannins catéchiques, les coumarines, les stérols et stéroïdes, les hétérosides et les saponosides.

Le rendement de l'extrait méthanolique le plus élevé est de 11.07%, suivi de l'extrait aqueux 8.23%, la fraction méthanolique 7.68% et la fraction aqueuse 2.63%.

Les teneurs en phénols totaux ont donné successivement  $15.905 \pm 2.38$  mg EAG/g de MS pour l'extrait méthanolique, la fraction aqueuse  $12.58 \pm 0.06$  mg EAG/g de MS, l'extrait brut aqueux  $4.089 \pm 0.38$  mg EAG/g de MS et la fraction méthanolique  $1.137 \pm 0.07$  mg EAG/g de MS.

Les propriétés antioxydantes des différents extraits de notre plante ont été évaluées par trois méthodes : la capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer (FRAP) et le piégeage du radical (DPPH). La meilleure CAT a été observée dans l'extrait méthanolique avec  $10.32 \pm 0.73$  EAA/g MS puis par ordre décroissant vient l'extrait aqueux de  $7.16 \pm 0.029$  EAA/g MS, la fraction aqueuse  $4.497 \pm 0.13$  EAA/g MS et la fraction méthanolique de  $1.414 \pm 0.14$  EAA/g MS.

Pour ce qui est du pouvoir réducteur (FRAP), c'est la fraction aqueuse qui a révélé un pouvoir modéré à réduire le fer avec un  $EC_{50}$  de l'ordre de  $0.83 \pm 0.03$  mg/ml.

Par ailleurs, nous avons enregistré une certaine activité anti radicalaire classée par ordre décroissant il s'agit de la fraction aqueuse, extrait aqueux, extrait brut méthanolique avec des valeurs de  $EC_{50}$  (mg/ml)  $1.407 \pm 0.054$ ,  $1.716 \pm 0.001$  et  $1.722 \pm 0.062$ .

Aucun pouvoir antimicrobien n'a été révélé de nos extraits à l'exception d'une très faible activité inhibitrice signalée vis-à-vis de la bactérie Gram positif *Staphylococcus aureus* concernant l'extrait brut méthanolique avec une zone d'inhibition de 7mm.

**Mots clés :** *Pituranthus chloranthus*, étude phytochimique, composés phénoliques, activité antioxydante CAT, FRAP, DPPH, pouvoir antimicrobien

## Abstract

Our study *Pituranthus cloranthus* door first on a phytochemical screening to characterize different families of chemical compounds and secondly the evaluation of biological activities (antioxidant and antimicrobial) on the aerial parts of this plant. The phytochemical tests allowed us to highlight the presence of seven chemical families: flavonoids, tannins, coumarins catechin tannins, sterols and steroids, glycosides and saponins. The performance of the methanol extract the highest is 11.07%, followed by the aqueous extract 8.23%, the methanol fraction 7.68% and 2.63% aqueous fraction. The contents of total phenols gave successively  $15.905 \pm \text{EAG } 2.38\text{mg} / \text{g DM}$  for the methanol extract, the aqueous fraction  $12.58 \pm 0.06 \text{ mg EAG} / \text{g DM}$ , the aqueous crude extract  $4089 \pm 0.38 \text{ mg} / \text{g DM}$  and méthalonique fraction  $1.137 \pm 0.07 \text{ mg EAG} / \text{g DM}$ .

The antioxidant properties of different extracts of our plant were evaluated by three methods: the total capacity antioxdante (CAT), the reduction of iron (FRAP) and free radical scavenging activity (DPPH). The best CAT was observed in the methanol extract with  $10.32 \pm 0.73 \text{ EAA} / \text{g DM}$  and descending is the aqueous extract of  $7.16 \pm 0.029 \text{ EAA} / \text{g DM}$ , the aqueous fraction  $4.497 \pm 0.13 \text{ EAA} / \text{g DM}$  and the fraction methanolic  $1.414 \pm 0.14 \text{ EAA} / \text{GMS}$ .

In terms of reducing power (FRAP) is the aqueous fraction revealed a moderate to reduce iron, with an EC50 of about  $0.830 \pm 0.03 \text{ mg} / \text{ml}$ .

Moreover, we have seen some anti-radical activity listed in descending order, is the aqueous fraction, aqueous, methanolic crude extract with EC 50 values (mg / ml)  $1.407 \pm 0.054$ ,  $1.716 \pm 0.001$  and  $1.722 \pm 0.062$ .

No antimicrobial capacity was found in our samples with the exception of a very weak inhibitory activity shown in the Gram positive bacterium *Staphylococcus aureus* on the methanolic crude extract.

**Keywords:** *Pituranthos cloranthus*, phytochemical study, phenolic compounds, antioxidant activity CAT, FRAP, DPPH, antimicrobial activity.

## الملخص

دراستنا على النبتة *Pituranthus chloranthus* تحمل في بابها الأول ما يتعلق بالفحص الفيتوكيميائية و هذا لتحديد مختلف العائلات الكيميائية الموجودة، وفي ثانياها تقييم الأنشطة البيولوجية (المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات) على الأجزاء الهوائية لهذه النبتة.

الفحص الفيتوكيميائي سمح لنا بتسليط الضوء على وجود سبع عائلات الكيميائية: مركبات الفلافونويد و التانان، التانان الكاتشينية، الكومارين، الستيغول و الستيغويدالاتيغوزيدات والصابونوزيد.

المستخلص الجاف الميثانولي ذو مردود عالي و يقدر ب 11.07٪، يليه المستخلص المائي 8.23٪، الكسر الميثانولي 7.68٪ ثم الكسر المائي 2.63٪.

كمية الفينول الكلي نقدمها بالترتيب : المستخلص الجاف الميثانولي  $15.90 \pm 2.38$  مغ EAG / غ المادة الجافة، الكسر المائي  $12.58 \pm 0.06$  مغ EAG / غ المادة الجافة ، المستخلص الجاف المائي  $4.089 \pm 0.038$  مغ EAG / غ المادة الجافة ، الكسر الميثانولي  $1.137 \pm 0.07$  مغ EAG / غ المادة الجافة .

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمختلف مستخلصات نبتتنا بثلاثة طرق: القدرة الكلية المضادة للأكسدة الكلية CAT، ارجاع الحديد FRAP، تثبيط الجذر الحر DPPH. افضل قدرة كلية مضادة للأكسدة لوحظت عند المستخلص الجاف الميثانولي  $10.32 \pm 0.73$  EAA / غ المادة الجافة ثم بالترتيب النزولي المستخلص المائي  $7.16 \pm 0.02$  EAA / غ المادة الجافة، الكسر المائي  $4.497 \pm 0.13$  EAA / غ المادة الجافة ثم الكسر الميثانولي  $1.414 \pm 0.14$  EAA / غ المادة الجافة .

فيما يخص ارجاع الحديد، الكسر المائي كشف قدرة معتلة في ارجاع الحديد حيث ان  $EC_{50}$  يقدر ب  $0.830 \pm 0.03$  ملغ / مل.

اضافة الى ذلك سجلت بعض النشاط المضاد للأكسدة للجذر الحر و هي بالترتيب التنازلي: الكسر المائي، المستخلص المائي، المستخلص الجاف الميثانولي حيث ان قيم  $EC_{50}$  (مغ/مل):  $1.407 \pm 0.054$ ،  $1.716 \pm 0.001$ ،  $1.722 \pm 0.062$ .

لم تسجل اي قدرة مضادة للميكروبات المستعملة باستثناء القدرة الجذ ضعيفة للمستخلص الخام الميثانولي ضد بكتيريا الجرام الموجبة *Staphylococcus aureus* .  
الكلمات المفتاحية: *Pituranthos chloranthus*، الدراسة الفيتوكيميائية ، المركبات الفينولية، المضادات للأكسدة CAT، FRAP، DPPH، القدرة المضادة للميكروبات.

## Abréviations

**UV** : ultraviolet

**ERO** : espèces réactives de l'oxygène

**ATP** : Adénosine triphosphate

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

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

**EAG** : équivalent d'acide gallique

**EPY** : équivalent en pyrogallol

**MS** : matière sèche

**EC** : équivalent de catéchine

**CAT** : capacité antioxydante totale

**EAA : équivalents d'acide ascorbique**

**EC<sub>50</sub>(IC<sub>50</sub>)** : concentration inhibitrice à 50 %

**T<sub>EC50</sub>** : temps nécessaire pour aboutir la concentration EC<sub>50</sub>

**P.** : *Pituranthos*

**%** : Pourcentage

**°C** : Degré Celsius

**µl** : Microlitre

**DMSO** : Diméthyle Sulfoxyde

**Fe** : Fer

**Fe<sup>2+</sup>** : Ions ferreux

**Fe<sup>3+</sup>** : Ions ferriques

**g** : Gramme

**h** : Heure

**l** : Litre

**mg** : Milligramme

**ml** : Millilitre

**nm** : Nanomètre

**PM** : poids moléculaire.

**v** : Volume

**ATCC** : American Type Culture Collection

## Liste des tableaux

<b>Tableau01</b> : Principales classes phénoliques de composés phénoliques .....	10
<b>Tableau 02</b> : Structure de base des différentes classes de flavonoides .....	15
<b>Tableau 03</b> : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques .....	19
<b>Tableau 04</b> :Les principaux nutriments antioxydants .....	21
<b>Tableau 05</b> : Les activités biologiques attribuées aux différentes classes de polyphénols.....	22
<b>Tableau 06</b> : Les souches utilisées dans les différents tests antimicrobiens.....	28
<b>Tableau07</b> :Les souches utilisées dans les différents tests antimicrobiens.....	38
<b>Tableau 08</b> :Liste des antibiogrammes testés sur les bactéries et la levure .....	39
<b>Tableau09</b> : Résultats des tests phytochimiques sur la partie aérienne de <i>P.chloranthus</i> .....	45
<b>Tableau10</b> : Les concentrationsEC <sub>50</sub> des différents extraits de <i>P.chlorantus</i> .....	50
<b>Tableau11</b> :Concentrations EC <sub>50</sub> des extraits de <i>P. chloranthus</i> .....	51
<b>Tableau 12</b> :Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Escherichia coli</i> .....	55
<b>Tableau13</b> :Interprétation des diamètres des zones d'inhibitionpour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	57
<b>Tableau 14</b> :Interprétation des diamètres des zones d'inhibitionpour <i>Klebsiellapneumonia</i> .....	58
<b>Tableau15</b> : Interprétation des diamètres des zones d'inhibitionpour <i>Staphylococcus aureus</i> ....	59
<b>Tableau16</b> : Interprétation des diamètres des zones d'inhibitionpour <i>Micrococcusluteus</i> .....	61
<b>Tableau 17</b> :Interprétation des diamètres des zones d'inhibitionpour <i>Listeria monocytogenes</i> ..	62
<b>Tableau 18</b> :Les diamètres des zones d'inhibition de <i>P.chloranthus</i> pour les six souches bactériennes.....	63
<b>Tableau 19</b> : Les diamètres des zones d'inhibition de <i>P.chloranthus</i> pour la levure testée en (millimètre).	

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Exemples d'acides phénoliques.....	10
<b>Figure 02</b> : Structure générale des flavonoïdes .....	11
<b>Figure 03</b> : Biosynthèse des composés phénoliques .....	16
<b>Figure 04</b> : Carte géographique de la station d'étude.....	26
<b>Figure 05</b> : Méthode de Boulekbache-Makhlouf.....	36
<b>Figure 06</b> : Rendement des extraits des composés phénoliques de <i>P.chloranthus</i> .....	39
<b>Figure 07</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux .....	40
<b>Figure 08</b> : Teneur en phénols totaux des extraits de <i>P.chloranthus</i> .....	41
<b>Figure 09</b> : La capacité antioxydante totale des extraits de <i>P. chloranthus</i> .....	42
<b>Figure 10</b> : La capacité antioxydante totale des extraits de <i>P. chloranthus</i> .....	43
<b>Figure 11</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH <sup>•</sup> en fonction des concentrations de l'extrait brut méthanolique, l'extrait aqueux, les fractions méthanolique et la fraction aqueuse de la partie aérienne de <i>P.chloranthus</i> .....	46
<b>Figure 12</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	47
<b>Figure 13</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	49
<b>Figure 14</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13047 .....	50
<b>Figure 15</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>S. aureus</i> ATCC 6538 .....	52
<b>Figure 16</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Micrococcu sluteus</i> ATCC 13047 .....	53
<b>Figure 17</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313 .....	55

# Liste des photos

<b>Photo01:</b> <i>Pituranthos chloranthus</i> (CossetDur) Benth et Houk .....	5
<b>Photo 02 :</b> Antibiogramme d' <i>Escherichia. coli</i> .....	55
<b>Photo 03 :</b> Antibiogramme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	58
<b>Photo 04 :</b> Antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
<b>Photo 05 :</b> Antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	61

# SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE .....	1
-----------------------------	---

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE 1: Présentation de la plante

1- Généralités .....	4
2- Description botanique .....	4
3- Position Systématique de <i>Pituranthos chloranthus</i> .....	5
4- Utilisations traditionnelles .....	5
5- Études chimiques antérieures.....	6
5-1. Étude phytochimique du genre <i>Pituranthos</i> .....	6

### CHAPITRE 2: Généralités sur les métabolites secondaires

1- Généralités .....	8
2- Classification des métabolites secondaires .....	8
2.1- Les composés phénoliques .....	8
2.1.1- Rôles des composés phénoliques.....	9
2.1.2- Structure.....	9
2.1.3-Localisation.....	9
2.1.4-Classification des composés phénoliques.....	9

### CHAPITRE 3: Activités biologiques

1- Introduction.....	18
2- Radicaux libres .....	18
3- Stress oxydant et ses conséquences biologiques.....	20
4- Les antioxydants .....	20
5- Activités biologiques des composés phénoliques .....	22
6- Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes in vitro .....	25

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

### **CHAPITRE 1 : Matériel végétal**

1- Choix du matériel végétal .....	28
2- Station d'étude .....	28
3- Préparation des échantillons .....	29

### **CHAPITRE 2 : Tests Phytochimiques**

1- Introduction.....	30
2- Tests phytochimiques .....	30
2.1- Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaude .....	30
2.1.1- Détection d'amidon .....	30
2.1.2- Détection des saponosides .....	30
2.1.3- Détection des tannins .....	31
2.2-Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol.....	31
2.2.1- Détection des flavonoïdes .....	31
2.2.2- Détection des tannins galliques et catéchiques .....	31
2.2.3- Détection des composés réducteurs .....	31
2.3-Macération du matériel végétal avec l'acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) .....	32
2.3.1- Détection des alcaloïdes .....	32
2.4- Détection des coumarines .....	32
2.5- Détection des stérols et triterpènes .....	32
2.6- Détection des anthocyanes .....	33

### **CHAPITRE 3 : Dosage des phénols totaux**

1- Extraction de l'extrait brut méthanolique et aqueux .....	34
2- Extraction de la fraction méthanolique et aqueux .....	34
3- Calcul du rendement en extrait sec .....	34
4- Dosage des phénols totaux .....	34

### **CHAPITRE 4 : Activités antioxydantes**

1-Activité antioxydante totale (CAT) .....	36
2- Réduction du fer (FRAP:Ferric reducing antidant power) .....	36

3- Piégeage du radical DPPH par les extraits de <i>Pithuranthos chloranthus</i> .....	37
---	----

## **Chapitre 5 : Activité antimicrobienne**

1- Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	38
1.1- Les souches testées .....	38
1.2- Conservation des souches .....	38
1.3- Les milieux utilisés .....	38
1.4- Les antibiotiques utilisés.....	39
1.4.1- Préparation de l'inoculum .....	39
1.4.2- Ensemencement .....	40
1.4.3- Application des disques d'antibiotiques .....	40
1.4.4- Incubation .....	40
1.4.5- Lecture .....	40
1.5- Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits de la plante .....	41
1.5.1- Préparation de l'extrait.....	41
1.5.2- Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits.....	41
1.6- Analyse statistique des résultats .....	42

## **PARTIE RESULTAT ET DISCUSSION**

### **Chapitre 1 : Tests phytochimiques**

1- Tests phytochimiques .....	44
-------------------------------	----

### **Chapitre 2 : Rendements des extraits et teneurs en phénols totaux**

1- Rendements des extraits .....	46
2- Teneurs en phénols totaux .....	46

### **Chapitre 3: Etude de l'activité antioxydante des différents extraits de *P. chloranthus***

1-Introduction.....	48
2- Capacité antioxydante totale (CAT).....	48
3- Réduction du fer (FRAP).....	48
4- Piégeage du radical libre DPPH' .....	51

#### **Chapitre 4: Etude de l'activité antimicrobienne des différents extraits de**

##### ***P. chloranthus***

1- Pouvoir antibactérien .....	54
1.1- Résultats de l'Antibiogramme .....	54
1.1.1- <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	54
1.1.2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	56
1.1.3- <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13047 .....	57
1.1.4- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 .....	58
1.1.5- <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 .....	60
1.1.6- <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313.....	62
2- Pouvoir antifongique.....	63
3- Pouvoir antimicrobien des différents extraits .....	63
CONCLUSION GENERALE.....	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	71
ANNEXE.....	83

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

## Introduction générale

---

Historiquement, les hommes ont toujours puisé dans la nature de quoi se nourrir, se vêtir et se soigner. L'utilisation des plantes est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent(Chaabi, 2008).

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs datant du XIX<sup>ème</sup> siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer à une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule type (Bahorun, 1997).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (Bahorun,1997).

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches in vivo comme in vitro, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques.

Récemment le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, et la toxicité des antioxydants synthétiques, a conduit à rechercher des substances naturelles dotées d'activités antimicrobiennes et antioxydantes.

Les radicaux libres (RL) en général et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) en particulier sont impliqués dans plusieurs pathologies humaines allant de l'inflammation au cancer tout en passant par les maladies cardio-vasculaires, l'arthrite rhumatoïde, le diabète et le processus d'apoptose ; en plus de leur action directe en réagissant avec la plupart des macromolécules(Djemai zoughlache,2009).

## Introduction générale

---

Notre laboratoire et particulièrement notre équipe s'intéresse à la phytochimie et aussi aux activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire) des extraits végétaux de plantes médicinales dans le but d'élargir les perspectives de valorisation de produits naturels (**AtikBekkara et al., 2008 ; Bendimered et al., 2007 ; Benhamou et al., 2008 ; Bekhechi et al., 2012 ; Belarbi et al., 2009**).

Déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes. Pourtant, moins de la moitié des plantes aujourd'hui ont été étudiées pour leurs propriétés thérapeutiques (**Chaabi et al., 2008**).

Dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail de recherche, dont le but principal est d'étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes des différents extraits bruts de *Pituranthos Chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Houk.

Notre travail est composé de trois parties :

La première partie concerne la synthèse bibliographique contenant les chapitres suivants :

- Description de la plante : *Pituranthos Chloranthus*
- Généralités sur les métabolites primaires et secondaires
- Les oxydants et les antioxydants

La deuxième partie est consacrée pour la description des protocoles expérimentaux de :

- tests phytochimiques
- dosage des phénols totaux
- l'activité antioxydante
- L'activité antimicrobienne

Dans la troisième partie nous allons essayer de discuter et interpréter les résultats. Et nous terminons le manuscrit par une conclusion générale.

SYNTHÈSE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## Chapitre 1 : Présentation de la plante

### 1. Généralités

La famille des Apiacées (anciennement Umbellifères), remarquable par son inflorescence en ombelle et par son caractère aromatique, a fourni un certain nombre d'espèces très connues utilisées dans l'alimentation comme condiments, épices ou légumes. Elles sont aussi traditionnellement utilisées en médecine, leurs intérêts reposant sur la présence d'huiles essentielles aux propriétés principalement carminatives et antioxydantes. Leurs études chimiques et pharmacologiques ont confirmé les utilisations ancestrales et mis en évidence leurs nombreuses vertus bénéfiques pour la santé. Les Umbellifères sahariennes sont différentes les unes des autres et leur détermination n'offre pas de grandes difficultés. Exclusivement, la distinction entre les espèces de *Pituranthos* est souvent difficile (**Ozenda, 1958**).

En effet, elles ne se distinguent les unes des autres que par la couleur des fleurs et la taille de leur pédoncule (**Haba, 2002**).

Le genre *Pituranthos* possède plus de vingt espèces, dont certaines sont spécifiques à l'Afrique du nord (**Quezel et Santa, 1962 ; Quezel et Santa, 1963**) et sont souvent rencontrées dans les régions arides ou désertiques.

*Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Houk, qui fait l'objet de notre travail est une espèce particulièrement moins présente que *Pituranthos scoparius* qui est plus abondante dans les Aurès et *Pituranthos battandieri* (Mair) est une plante endémique au Sahara marocain et l'Oranie (**Bellakhdar, 1997**).

### 2. Description botanique

L'espèce *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Houk, est une plante dont les tiges sont ramifiées dès la base, plus ou moins dichotomes et portant des ombelles longuement pédonculées; pétales verdâtres à nervures dorsales pubescentes et larges, fruits poilus. Elle est commune dans tout le Sahara septentrional et occidental jusqu'à EL Golea et au Tademaït au sud (**Ozenda, 1958**).



**Photo1 :*Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et**

**Houk**[http://www.florasilvestre.es/mediterranea/Umbelliferae/Pituranthos\\_chloranthus.htm](http://www.florasilvestre.es/mediterranea/Umbelliferae/Pituranthos_chloranthus.htm)

### **3. Position Systématique de *Pituranthos chloranthus***

L'espèce *Pituranthos chloranthus* est classée d'après (Quezel et santa, 1963) et (Dupont et Guignard, 2007) comme suit :

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicot

S/classe: Euastéridées II

Famille: Apiacées

Ordre : Apiale.

Genre : *Pituranthos*

Espèce : *Pituranthos chloranthus*(Coss et Dur) Benth et Houk

### **4.Utilisations traditionnelles**

L'espèce *Pituranthos chloranthus* connue sous le nom vernaculaire **Guezzeh**, est employée, en cataplasmes sur la tête, contre les céphalées (Bellakhdar, 1997). Les huiles

obtenues des tiges et des graines du *Pituranthos scoparius* sont largement utilisées comme remède contre le rhumatisme et la fièvre

Les espèces *P.triradiatus* et *P.tartuosus*, sont utilisées par la population bédouine contre les douleurs d'estomac, les parasites intestinaux ou comme agent régulateur de la menstruation chez les femmes (Novak *et al.*, 1966).

Les nomades connaissent le haut pouvoir allergisant des plantes du genre *Pituranthos* pour les animaux, en période de leur floraison (Bellakhdar, 1997).

## 5.Études chimiques antérieures

Une recherche bibliographique exhaustive faite sur les espèces du genre *Pituranthos*, nous a permis de constater que ces plantes sont peu étudiées et que leur composition chimique reste à déterminer.

### 5.1. Etude phytochimique du genre *Pituranthos*

Très peu d'études phytochimiques ont été réalisées sur le genre *Pituranthos*. Singabetal (1998) ont pu isoler un flavonoïde glucoside nouveau chez *Pituranthos tortuosus* : le glucopyranosyloxy-3-trihydroxy-4',5,7-méthoxy-3'-flavone, 2"-O-β-Dapiofuranosyl 6"-O-β-L-rhamnopyranosyl. Les composés isorhamnetine 3-O-glucoside, et isorhamnetine 3-O-rutinoside ont été isolés des espèces *Pituranthos triradiatus* et *Pituranthos tortuosus* (Singabetal, 1998 ; Shalaby, 1998).

Les composés apigénine-6,8-di-C-glucoside et tamarixétine-3-O-glucoside sont identifiés pour la première fois dans le genre *Pituranthos*. (Almaniet *et al.*, 1998; Benakcha, 2001).

Les huiles essentielles surtout les monoterpènes de *P. tortuosus* et *P. triradiatus* ont été analysées par CG-MS et RMN C13 (Halim *et al.*, 1995 ; Abdelwahad *et al.*, 2006).

Certains auteurs ont isolé sur les racines de *P. scoparius* des composés isocoumariniques (hydroxy-6-méthoxy-5-propyl-3-isocoumarine et diméthoxy-5,7-hydroxy-6-propyl-3-isocoumarine) (Haba *et al.*, 2004).

L'extrait n-butanolique a révélé quatre flavonoïdes glucidiques dans les parties aériennes de *P. chloranthus* collectée dans la région d'El Hoggar (Touiletal, 2006).

**Nait-Said (2007)** a isolé par CLHP et identifié par la RMN 1H et la spectrométrie de masse des coumarines dans les racines de *P. chloranthus*.

Le dosage des composés phénoliques et les activités (antioxydante et antimicrobienne) des extraits méthanoliques, aqueux, hexane et acétate d'éthyle ont été réalisés sur les parties aériennes de *P. chloranthus* (**Bouaziz et al., 2009**).

## Chapitre 2 : Généralités sur les métabolites secondaires

### 1. Généralités

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires (Kansole, 2009).

### 2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les cires, et les composés phénoliques (Cuendet, 1999; Vermerris, 2006).

#### 2.1. Les composés phénoliques

Le terme « polyphénols » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale « composés phénoliques » concerne à la fois les mono- di- et polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (BenarousK., 2009). Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Les composants phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois); et sont impliqués dans de nombreux processus

physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits.(**Boizot et Charpentier, 2006**)

### 2.1.1 Rôles des composés phénoliques

Comme la majorité des composés secondaires, les composés phénoliques sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires étant :

Les composés phénoliques ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries (**Makoi et Ndakidemi, 2007**). Les composés phénoliques sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton, 1999**).

### 2.1.2 Structure

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques.

L'élément fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique (aromatique), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, ou hétéroside. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 Dalton, comme les **tanins** (**Vernin., 1999**).

### 2.1.3 Localisation

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Ils sont présents aussi dans diverses substances naturelles comme les fruits rouges, le raisin. (**Zamkotsianet al., 1999**). Parmi les composés phénoliques, dont 8000 sont connus : les flavonoïdes, les quinones phénoliques, les xanthones, les coumarines et d'autres classes existent en nombre considérable. (**Vernin,1999**).

### 2.1.4 Classification des composés phénoliques

Les principales classes des composés phénoliques sont les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide ferulique, acide chlorogénique...), les flavonoïdes, les tanins et les coumarines (**King et Young, 1999 ; Tapiero et al., 2002**).

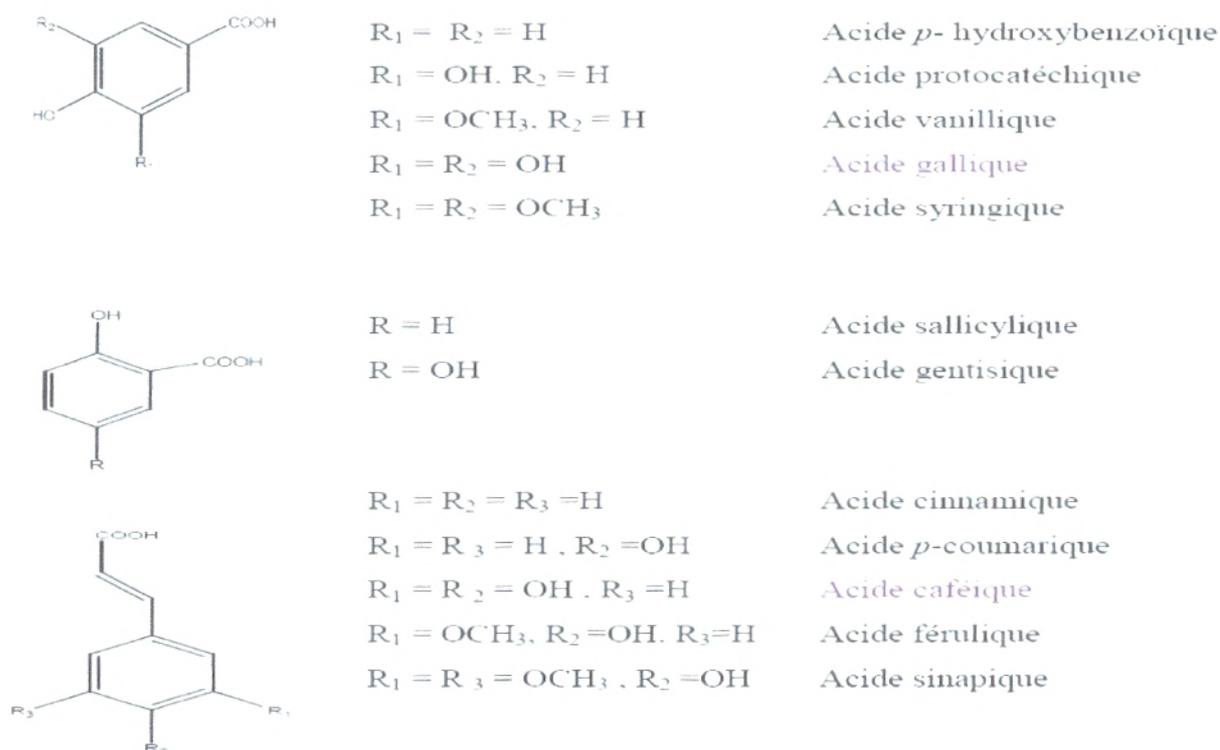
Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes. Ils ne possèdent pas de squelette flavane, deux sous-groupes peuvent être distingués :

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C<sub>6</sub> - C<sub>1</sub> (constitués d'un squelette à sept carbones). Ils sont particulièrement représentés chez les gymnospermes et les angiospermes.

- **Les acides hydroxybenzoïques** (p- hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, Gallique, syringique, salicyclique, gentisique), (Guignardet *al.*, 1985)

- **Acides hydroxycinnamiques**

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub>) dérive de celle de l'acide cinnamique grâce à des substitutions au niveau du cycle aromatique (Figure 1) (Richeter, 1993).



**Figure 1 : Exemples d'acides phénoliques (Guignardet *al.*, 1985)**

## b) Les flavonoïdes de structure C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub> – C<sub>6</sub>

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Marfak, 2003**).

Ces molécules sont considérées comme des pigments quasiment universels des végétaux ; ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**Bruneton, 1999**). Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides (**Ghestemet al., 2001**).

#### ❖ Structure chimique et classification :

Les flavonoïdes ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbone qui sont arrangés à une configuration C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane. Ils sont constitués de deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (**Dacosta, 2003**).

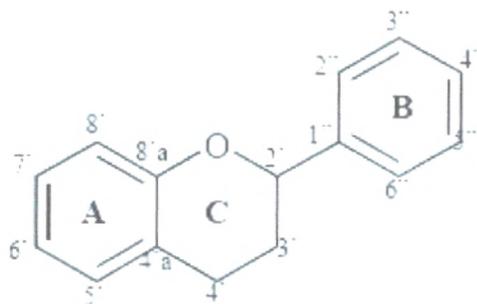


Figure 2. Structure générale des flavonoïdes (**Dacosta, 2003**)

La classe des flavonoïdes comporte à elle seule plus de 4000 substances qui ont été isolées et identifiées à partir des milliers de plantes (**Forkmann et Martens, 2001**), qu'on divise en plusieurs catégories : Les flavones, les flavonols et les dihydroflavonols, les isoflavonoïdes, les biflavonoïdes, les flavanones, les flavanols, les anthocyanidines, les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones et les tannins (**Tableau 2**) (**Dacosta, 2003**).

#### ❖ Les différentes classes de flavonoïdes

##### Les différentes classes

- **les flavones:** dérivent des flavanones par une oxydation qui introduit une seconde double liaison dans l'hétérocycle. Dans plus de 90%, le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et C7 (**Bruneton, 1999**).
- **Les flavanones:** dérivent des précédentes par une cyclisation au centre du squelette, d'où un hétérocycle. Ils se caractérisent par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 par la présence des centres d'asymétrie.
- **Les flavonols:** se différencient des flavones par la présence d'un OH en C3 (**Heller et al., 1998**).
- **les isoflavones:** dérivent aussi des flavanones mais outre une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C2 au C4 de l'hétérocycle (**Heller et al., 1998**).
- **les anthocyanes:** le terme « anthocyanes » a une valeur générale désignant, soit les formes naturelles glycosylées, soit les molécules non glycosylées (**Macheix, 2005**).

Ce sont des pigments rouges en milieu acide, virant au bleu en milieu alcalin ; ils sont très répandus dans les fleurs et les fruits. Dans la nature, ces pigments n'existent pas sous forme aglycone, mais sous forme d'hétérosides.

- **Chalcones et aurones :** Les chalcones sont différentes des autres types des flavonoïdes cités ci-dessus. De par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique,  $\alpha,\beta$ -insaturée . Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont identiques à celles des autres flavonoïdes.  
Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone. Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes décrits précédemment. Ces composés sont extrêmement fréquents dans les fleurs sous forme de pigments contribuant à la couleur jaune.
- **Les coumarines :** Elles sont parmi les composés phénoliques les plus connus, elles sont substituées en C-7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue

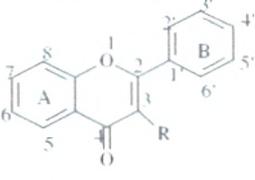
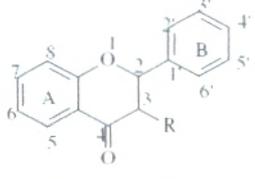
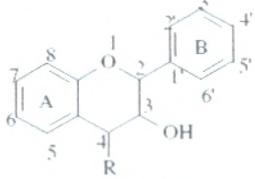
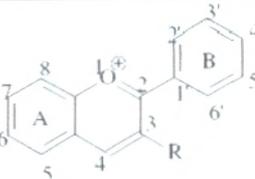
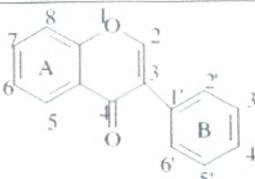
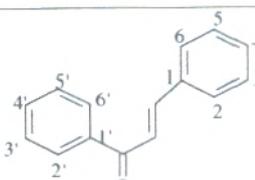
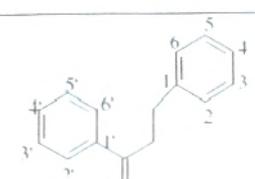
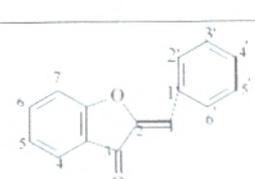
sous le nom d'ombelliférone. Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales.

➤ **Les quinones :**

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les quinones sont utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides (**Kansole, 2009**).

➤ **Les tannins :** les flavan-3-ols sont à l'origine des tannins condensés ou proanthocyanides, qui correspondent à des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols dérivés de la (+)-catéchine (**Benakcha, 2001**).

**Tableau 2 : Structure de base des différentes classes de flavonoïdes (Bruneton, 1999)**

Structure	Type de flavonoïdes	Exemples de molécules	
	R=H Flavone	5, 7, 4'-OH	Apigénine
	R=OH Flavonol	5, 7, 3, 4'-OH	Lutéoline
	R=H Flavanone (Dihydroflavone)	5, 7, 4'-OH	Naringénine
	R=OH Flavanonol (Dihydroflavonol)	7, 3', 4'-OH	Fustine
	R=H Catechine (Flavan-3-ol)	5, 7, 3, 4, 5'-OH	Collocatchine
	R=OH Leucoanthocyanidine (Flavan-3,4-diol)	5, 7, 3, 4'-OH	Catechine
	R=OH Flavylum (Anthocyan)	5, 7, 3, 4, 5'-OH	Luteolidine
	R=OH Anthocyanidine	5, 7, 3, 4'-OH	Cyanidine
	Isoflavone	5, 7, 4'-OH	Génisteine
		7, 4'-OH	Daidzeine
	Chalcone	2', 4', 3, 4-OH	Buteine
		2', 3', 4', 3, 4-OH	Okonine
	Dihydrochalcone	4, 2', 4', 6'-OH	Phlorétine
		3, 4, 2', 4', 6'-OH	Hydroxyphlorétine
	Aurone	6, 3', 4'-OH	Sulphurétine
		6, 7, 3', 4'-OH	Maritimétine

## ❖ Biosynthèse des composés phénoliques :

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont :

**\*La voie de l'acide shikimique**

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés (**Haslam 1994, Dewick 1995**)

**\*La voie de l'acide malonique**

La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétylCoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Fleeger et Flipse 1964, Richter, 1993**) (**Figure 3**).

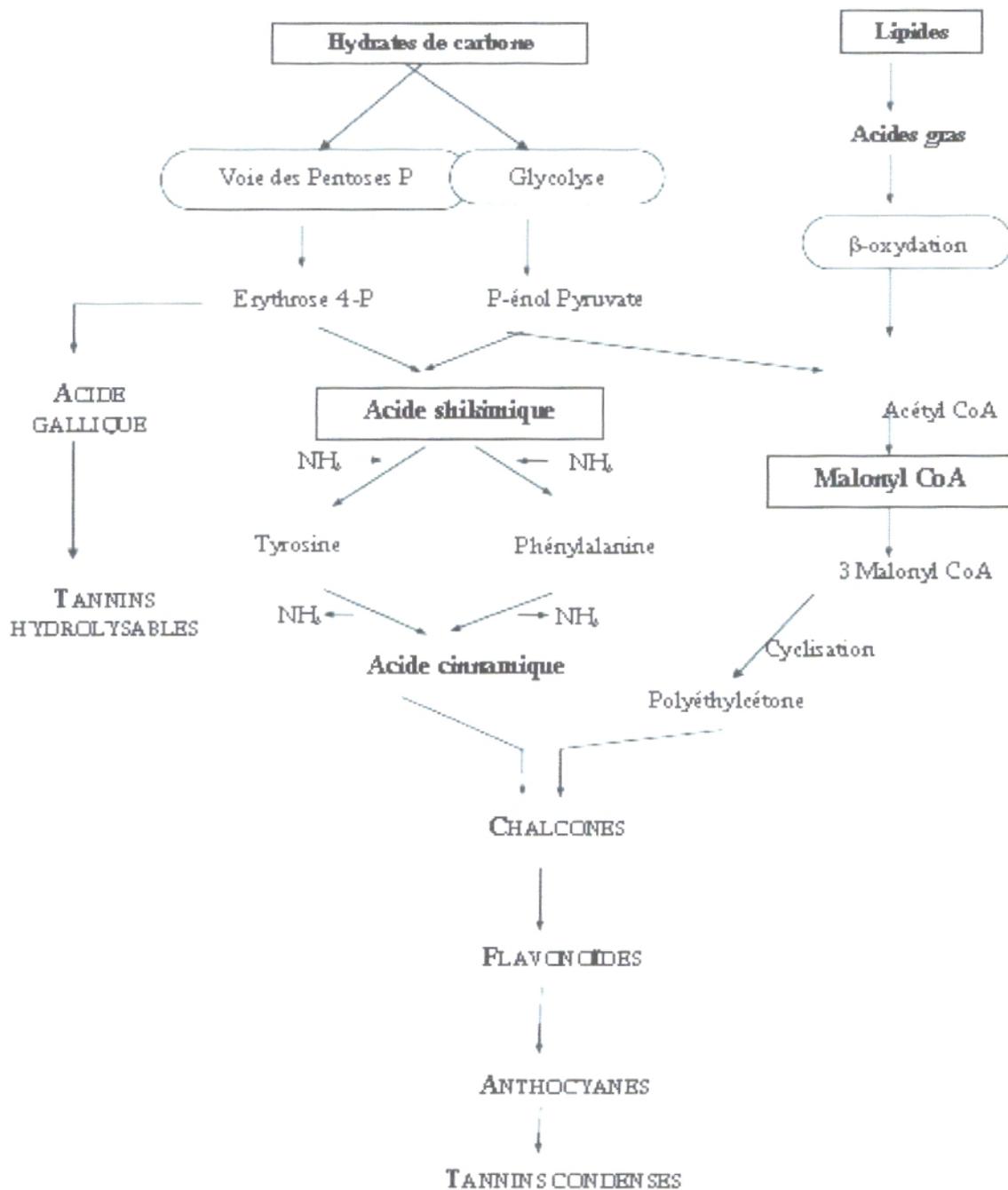


Figure3 : Biosynthèse des composés phénoliques (Richter, 1993)

## Chapitre 3 : Activités biologiques

### 1. Introduction

Pour mieux comprendre l'activité de nos plantes, nous nous sommes intéressés aux propriétés antioxydantes de leurs extraits. En effet, l'activité antioxydante semble être le principe d'action d'un certain nombre de produits pharmaceutiques. Au cours de ce processus, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) libérées par l'organisme humain au cours des diverses attaques sont éliminées ou piégées ; les dommages causés sont réparés. Les molécules douées de telles propriétés sont les antioxydants dont le rôle dépasse de loin celui d'un simple piègeur ou de suppresseur de radicaux libres. Ils sont efficaces dans la prévention et ou dans le traitement des affections parasitaires et non parasitaires.

Les antioxydants existent dans les plantes médicinales et alimentaires tels que les composés phénoliques, manifestent un spectre de propriétés pharmacologiques telles que : antibactériennes, anti-inflammatoires, vasodilatatoires, anti cancérogènes, antithrombotique anti-atherogéniques et analgésique parmi tant d'autres. Ils exercent ces propriétés en tant qu'antioxydants (Wollgast et Anklam, 2000; Gómez-Caravaca *et al.*, 2006 ).

### 2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical (Tableau3) (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobies, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR). Aux doses faibles, les EOR sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tel que la transduction du signal. La surproduction des EOR au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement.

**Tableau 3 : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (Bartosz, 2003).**

Nom	Symbole
Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2\bullet^-$
Radical hydroxyle	$OH\bullet$
Monoxyde d'azote	$NO\bullet$
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier	$^1O_2$
Peroxynitrite	$ONOO^-$

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé.

Les risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ont été questionnés au cours des dernières années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est apparente. Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées.

### 3. Stress oxydant et ses conséquences biologiques

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes (**Sorg, 2004**). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (**Pincemail et al., 2002 ; Sorg, 2004 ; Kocchilin-Ramonatxo, 2006**). L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (**Halliwell et Whiteman 2004; Valko et al., 2006**).

### 4. Les antioxydants

On peut envisager sous le titre « antioxydants » au sens large toute substance présente à une concentration inférieure à celle de la substance oxydable susceptible d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces actives de l'oxygène (**Sies, 1997 ; Halliwell et Gutteridge 1999**). Ils peuvent agir en réduisant ou ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable (**Favier, 2003**). L'apport d'antioxydants pourra être utile pour éviter les récurrences. Il permettra aussi de stabiliser la tolérance à l'insuline, d'améliorer l'immunité. Enfin, les antioxydants pourront être utilisés pour diminuer la toxicité des médicaments (**Favier, 2003**).

Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec des radicaux libres bien déterminés, et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources antioxydantes (**Benarous, 2007**).

Ces antioxydants constituent deux voies de défense défenses endogènes (antioxydants enzymatiques) et les défenses exogènes (antioxydantes non enzymatiques).

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (**Marc et Huang et al., 2005**).

Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et superoxydes (Bartosz, 2003).

Les antioxydants d'origines naturelles sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures et sont en générales des composés phénoliques. Ils agissent par la désactivation des radicaux par création d'addition covalente, la réduction des métaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition et le captage de l'oxygène singulet (Timbo, 2003), (Tableau 4)

**Tableau 4** : Les principaux nutriments antioxydants

Principaux nutriments antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix
$\beta$ -carotène	Légumes et fruits
Sélénium	Poisson, œufs, viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tannins	Lentilles, thé, raisins

### 5. Activités biologiques des composés phénoliques

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

Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, antioxydants et anti-radicalaires, antimicrobiens. (**Tableau 5**).

**Tableau 5: Les activités biologiques attribuées aux différentes classes de polyphénols (Macheix *et al.*, 2005).**

Polyphénols	Activités	Auteurs
<b>Acides Phénols</b> (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants	(Didry <i>et al.</i> , 1982) (Ravn <i>et al.</i> , 1984) (Hayase et Kato, 1984)
<b>Coumarines</b>	vasoprotectrices et antioedémateuses	(Mabry et Ulubelen, 1980)
<b>Flavonoïdes</b>	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants	(Stavric et Matula, 1992) (Das <i>et al.</i> , 1994) (Bidet <i>et al.</i> , 1987) (Bruneton, 1993) (Aruoma <i>et al.</i> , 1995)
<b>Anthocyanes</b>	Protection des veines et capillaires	(Bruneton, 1993)
<b>Proanthocyanidines</b>	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires	(Masquelier <i>et al.</i> , 1979) (Bahorun <i>et al.</i> , 1996) (De Oliveira <i>et al.</i> , 1972) (Brownlee <i>et al.</i> , 1992) (Kreofsky <i>et al.</i> , 1992)
<b>Tannins galliques et catéchiques</b>	Antioxydants	(Okuda <i>et al.</i> , 1983) (Okamura <i>et al.</i> , 1993)

Les flavonoïdes sont des composants naturels hautement actifs. Plusieurs études ont démontré une large gamme des effets biochimiques et pharmacologiques de ces molécules.

#### a) **Activité anti-inflammatoire des flavonoïdes :**

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires (**Milane, 2004**). Ils ont un effet palliatif sur l'inflammation dû à ses effets inhibiteurs sur la synthèse des leucotriènes et la libération de l'histamine, et ses activités comme piègeurs de superoxyde (**Formica et Regelson, 1995**).

#### b) **Flavonoïdes comme inhibiteurs enzymatiques**

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques, ils inhibent plusieurs enzymes intervenant dans divers mécanismes biologique.

Il inhibe l'histidine décarboxylase, l'élastase, la hyaluronidase ce qui permettrait de conserver l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine.

En plus, les flavonoïdes inhibent la phosphodiesterase de l'AMPCc ce qui pourrait expliquer leur activité anti-agrégant plaquettaire; aussi, ils inhibent l'aldose réductase qu'est impliquée dans la pathogénie de la cataracte (**Bruneton, 1999**).

Par ailleurs, les flavonoïdes peuvent inhiber la promotion de tumeur à travers un effet inhibiteur sur la phosphoxylase C et la protéine kinase (**Formica et Regelson, 1995**).

Par ailleurs, l'inhibition des enzymes présente un autre mécanisme de l'activité antioxydante, les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celle du radical superoxyde dans les tissus humains.

#### c) **Flavonoïdes et les maladies cardiovasculaires**

Les flavonoïdes sont des composés veinoactifs, ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance. Cette action est appelée « vitaminique P » (**Bruneton, 1999**).

D'ailleurs, ils ont un effet protecteur des maladies cardiovasculaires. Ils induisent la vasodilatation et provoquent la relaxation des muscles lisses cardiovasculaires ce qui engendre une activité anti-hypertensive et des effets antiarrhythmiques. En plus les flavonoïdes

protègent LDL de l'oxydation et par conséquent empêchent la formation des plaques athérosclérotiques, aussi, ils ont des effets antithrombotiques à travers l'empêchement de l'agrégation plaquettaire (**Formica et Regelson, 1995**).

#### d) **Activité antioxydante des flavonoïdes :**

Les flavonoïdes possèdent une forte activité antioxydante qu'est le principe de plusieurs activités biologiques douées par ces molécules (**Saija et al., 1995**).

L'activité du piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante, pour les flavonoïdes, ce mécanisme est lié à leur structure et de l'arrangement des groupements hydroxyles (**Sokol-Letowska et al., 2007**).

Des études faites sur la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres ont montré que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- La structure ortho dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
  - La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo
  - La présence du groupe 3OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.
- A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (**Marfak, 2003**).

#### e) **Effet anticancéreux des flavonoïdes**

Présente dans tous les types de thé et en particulier le thé vert la catéchine a montré une activité anti-tumorale, une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde à inactiver l'action de la P-glycoprotéine qui est impliquée dans la résistance phénotypique des cellules cancéreuses, (**Jodoin et al., 2002**)

#### f) **Effet anti-ulcère :**

Il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques chez les rats (**Mascolo, N., Izzo, A.A., 1999**).

### g) **Activité antimicrobienne des flavonoïdes**

Les flavonoïdes possèdent des propriétés antimicrobiennes (**Petit et al., 2007**). Ils sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales. **Mucsi et Pragai** en 1985 ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus d'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPC dans les cellules infectées.

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase. D'autre part, une étude a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *Staphylococcus aureus*.

L'activité antifongique des flavonoïdes est aussi établie, une étude faite sur *Dianthus caryophyllus* a montré l'efficacité de ses flavonoïdes sur des souches fongiques (**Galeotti et al., 2008**).

### h) **Autres activités des flavonoïdes**

A côté des activités citées précédemment, les flavonoïdes possèdent d'autres activités : activité antiallergique, anti hépatotoxique, anti-ostéoporotique (**Ielpo et al., 2000**), activité hypocholestérolémiant (**Formica et Regelson, 1995**), activité antidiabétique (**Marfak, 2003**), activité antimutotique, antiprotozoaires et activité anxiolytique (**Cabrera et al., 2007**).

## **6. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes in vitro**

Actuellement, une grande diversité des méthodes analytiques pour la détermination de la capacité antioxydante est disponible. Ces analyses diffèrent entre eux en termes de mécanismes de réaction (**Magalhaes et al., 2008**).

La comparaison des données de différentes études est difficile. Il est également d'une grande importance de choisir des méthodes acceptées, validées et normalisées, avec des données, à la fois, comparables et disponibles dans la littérature, pour cela nous citons les méthodes suivantes :

- la méthode d'ABTS ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) (**Miller et al., 1993 et modifiée par Reet et al., 1999**) ;
- la méthode FRAP (capacités réductrices ferriques d'antioxydants) (**Benzie et Strain, 1999**) ;
- la méthode du radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) (**Brand-Williams et al., 1995**) ; la méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- diméthyl- $\rho$ -phenylenediamine) (**Li et al., 1994**)
- La méthode photochimiluminescence (PCL) (**Popov et al., 1987**).
- la méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (**Cao et al., 1993**).
- la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) (**Winston et al., 1998**) ;
  
- La méthode CAT (capacité antioxydante totale)(**Prieto et al.,1999**)

En fin, la méthode d'hémolyse permet de contrôler l'homéostasie des défenses antiradicalaires, ou en d'autre termes, l'équilibre qui doit exister entre la production des radicaux et la défense antiradicalaire globale (**Charfi, 1995**).

MATÉRIELS  
ET  
MÉTHODES

## Chapitre 1 : Matériel végétal

### 1. Choix du matériel végétal

Les parties aériennes de *P. chloranthus* ont été récoltées durant le mois d'octobre 2012 dans la région d'El Kantara à 50 Km au nord-est de Biskra. Le choix de cette plante a été appuyé sur une enquête auprès de la population pour ses vertus médicales comme étant un produit hypoglycémiant et un anti-inflammatoire reconnu.

### 2. Station d'étude

Les paramètres géographiques de notre station d'étude sont représentés dans le **tableau(6)**.

**Tableau6 :** Caractéristiques géographiques de la station d'étude

Station	Longitudes Est	Latitudes Nord	Etage bioclimatique
El Kantara	5°42	35°13	Aride



Figure4 : Carte géographique de la station d'étude (Encarta 2008).

### 3. Préparation des échantillons

Le matériel végétal des parties aériennes a été séché à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant quelques jours. Une fois séché, celle-ci ont été réduites en poudre à l'aide d'un moulin électrique au fur et à mesure des manipulations. Puis conservée dans des flacons en verre hermétiques fermés pour des utilisations ultérieures.

## Chapitre 2 : Tests Phytochimiques

### 1. Introduction

L'examen phytochimique est un premier pas dans la recherche des molécules à activités thérapeutiques dans les plantes. Il permet la détection des classes de composés chimiques essentiellement les composés phénoliques, les saponosides, les alcaloïdes, les isoprénolides qui renferme les terpénoïdes, l'amidon et les composés réducteurs.

Ces tests phytochimiques sont représentés par :

- Des réactions de coloration et de précipitation ;
- Des essais de solubilités des constituants présents dans la plantes vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente ;
- Des examens sous la lumière ultraviolette.

### 2. Tests phytochimiques

La détection des principaux constituants chimiques est réalisée sur les différents extraits obtenus par épuisement avec de l'eau, avec de l'éthanol et macération par  $H_2SO_4$  des parties aériennes de *Pithurantus chloranthus*.

#### 2.1-Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaude

Dans un ballon monocol surmonter d'un réfrigérant, 50g du matériel végétal est mis en présence de 300ml d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux tests suivants :

##### 2.1.1-Détection d'amidon

Chauffer 5ml de la solution à tester avec 10ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition. Ajouté le réactif d'amidon (Annexe 1)

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-violacé (**Bruneton, 1999**).

##### 2.1.2-Détection des saponosides

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est abandonné pendant 20min et la teneur en saponosides est évaluée :

- ☞ Pas de mousse : test faiblement positif.
- ☞ Mousse moins de 1 cm = test positif.
- ☞ Mousse de 1-2 cm = test positif.
- ☞ Mousse plus de 2cm = test très positif (**Trease et Evans, 1987**).

### 2.1.3-Détection des tannins

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

## 2.2-Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol

Dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant, 50g du matériel végétal est mis en présence de 300ml d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux tests suivants :

### 2.2.1-Détection des flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5ml de l'extrait éthanolique avec 1ml de HCl concentré et 0.5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3min (**Earnsworth, 1974**).

### 2.2.2-Détection des tannins galliques et cathéchiques

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de l'extrait éthanolique, 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  diluée (1%).

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (tannins galliques) ; verte ou bleu verte (tannins cathéchiques) (**Trease et Evans, 1987**).

### 2.2.3-Détection des composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer.

Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (**Trease et Evans, 1987**).

### 2.3-Macération du matériel végétal avec l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Ajouter 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué (1/10) à 10 g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml. Laisser agiter et macérer pendant 24 h à la température ambiante du laboratoire. Après filtrer sur papier lavé à l'eau distillé de manière à obtenir environ 10 ml de filtrat.

#### 2.3.1-Détection des alcaloïdes

- 1 ml de filtrat + 5 goutte du réactif de Mayer, s'il apparaît un précipité blanc-jaunâtre c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes.
- 1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de Wagner s'il apparaît un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (**Paris et al, 1969**) (Annex1).

#### 2.4-Détection des coumarines

Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et le placer dans un bain marie pendant quelques minutes. Ajouter 0.5 ml de NH<sub>4</sub>OH (10 %). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**RizK, 1982**).

#### 2.5-Détection des stérols et triterpènes

Deux essais ont été effectués :

➤ Essai 1 : Test pour les stérols et stéroïdes :

10ml de l'extrait éthanolique est placé dans un erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10ml du chloroforme anhydre. Ensuite mélanger 5ml de la solution chloroformique avec 5ml d'anhydre acétique, ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, agiter puis laisser la solution se reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 min à 21°C) (**Trease et Evans, 1987**).

➤ Essai 2 : Test pour les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques :

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10ml. Ensuite dissoudre le résidu obtenu dans le mélange d'anhydre acétique /chloroforme (5/5 : V/V). Puis, filtrer et traiter le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (la réaction de Liebermann-Burchardt). Si, cette réaction donne des colorations verte-bleue et vertes-violettes, elle indique la présence des hétérosides stériques et triterpéniques respectivement (**Trease et Evans, 1987**).

**2.6- Détection des anthocyanes**

Leur présence est révélée en traitant 2 ml d'infusé aqueux avec 2ml de HCl (2N) ensuite ajoutant quelques gouttes de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . un test positif est révélé par une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacée (**Debrayb *et al.*, 1971 ;Paris *et al.*,1969**)

## Chapitre 3 : Dosage des phénols totaux

### 1. Extraction de l'extrait brut méthanolique et aqueux

La poudre (1g) de la partie aérienne de *P. chloranthus* est placée dans un erlenmeyer dans 20 ml du solvant adéquat (méthanol, eau) pendant 24 h. Après la filtration, les solutions récupérées sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type HAHNVAPOR R-200 à 60°C. Les résidus secs obtenus pesés sont repris par quelques ml du méthanol.

### 2. Extraction de la fraction méthanolique et aqueux

La poudre (1 g) de la partie aérienne de *Pituranthos chlorantus* est placée dans un erlenmeyer dans 20 ml (méthanol/eau) pendant 24 h. Après la filtration, les solutions méthanolique sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type HAHNVAPOR R-200 à 60°C. Les résidus secs pesés sont repris à la fois par le méthanol pour avoir la fraction méthanolique puis récupérer par l'eau distillée la fraction aqueuse.

### 3. Calcul du rendement en extrait sec

Nous pouvons déterminer le rendement de la plante en extrait sec en calculant le rapport suivant :

$$R(\%) = (P_1 - P_2 / P_3) \times 100$$

**R** : Rendement en pourcentage.

**P<sub>1</sub>** : Poids du ballon après évaporation.

**P<sub>2</sub>** : Poids du ballon avant évaporation.

**P<sub>3</sub>** : Poids de la matière végétale de départ.

### 4. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux dans les extraits méthanolique de *Pithuranthus chlorantus* a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Rossi (1965) avec le réactif du Folin-Ciocalteu.

Une quantité de 200 µl pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1ml du Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8ml de carbonate de sodium à 7.5%) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min.

L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre Specord<sup>R</sup> 200 plus.

Une courbe d'étalonnage à différente concentration d'acide gallique a été préparée. Les teneurs exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche végétale (mg EAG/g MS) en appliquant la formule suivante :

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

C : La teneur en phénols totaux en mg d'acide gallique/g de la matière sèche.

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

m : le poids pur de l'extrait méthanolique.

**Remarque :** Chaque échantillon est répété deux fois.

## Chapitre 4 : Activités antioxydantes

### 1. Activité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de (Prieto *et al.*, 1999). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  à molybdate Mo (V)  $\text{MoO}_2^+$  en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate /Mo(V) à pH acide .

Un volume de 0.3ml de chaque extrait méthanolique est mélangé avec 3ml de solution de réactif (acide sulfurique 0.6M, phosphate de sodium 28mM et molybdate d'ammonium 4mM). Les tubes sont visés et incubés à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695nm contre le blanc qui contient 3ml de la solution du réactif et 0.3ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon . La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS). Les expériences sont répétées deux fois .

### 2. Réduction du fer (FRAP : *Ferric reducing antioxidant power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par Oyaizu (1986). En effet, 1 ml de différentes concentrations de chaque extrait (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 mg) dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. En suite, 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml de l'eau distillée et 0,5 ml  $\text{FeCl}_3$  (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Specord<sup>R</sup> 200.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

L'acide ascorbique est utilisé comme un contrôle positif. Les expériences sont répétées deux fois.

La concentration EC<sub>50</sub>, qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaires pour réduire 50% de la concentration initiale du ferricyanure de potassium, est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives.

### 3. Piégeage du radical DPPH par les extraits de *Pithurantus chloranthus*

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>) est un radical stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (**Bandoniene et al., 2002 ; Pavlov et al., 2002 ; Gazi et al., 2004**). Le DPPH, initialement violet, est décoloré lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité de l'extrait à piéger ce radical libre indépendamment de toutes activités enzymatiques (**Djeridane et al., 2006**).

L'effet des extraits de *Pithurantus chloranthus* sur le (DPPH<sup>•</sup>) est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez- Moreno et al (1998)**. Un volume de 50 µl de différentes concentrations de l'extrait exprimées en mg/ml est ajouté à 1.950 µl de la solution méthanolique du DPPH (0.025 g/l) fraîchement préparée. L'absorbance est mesurée à 515 nm après 30 min d'incubation à la température ambiante. Les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH sont calculés à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{échantillon}}) / DO_{\text{témoin}}] * 100$$

Où : DO<sub>témoin</sub> : représente l'absorbance du contrôle sans extrait après 30 min.

DO<sub>échantillon</sub> : représente l'absorbance en présence d'extrait après 30 min.

La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait nous a permis de calculer la concentration efficace (efficace concentration value : EC<sub>50</sub>). Cette dernière est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du DPPH à 50%.

## Chapitre 5 :L'activité antimicrobienne

### 1. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les tests antibactériens et antifongiques ont pour but de rechercher l'activité biologique de l'extrait brut de *Pituranthos chloranthus* vis-à-vis des différents microorganismes.

#### 1.1. Les souches testées

Les microorganismes utilisés dans notre étude sont mentionnés dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7** : Les souches utilisées dans les différents tests antimicrobiens

Microorganismes	Gram	Code	ORIGINE
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538	MNHN
<i>Micrococcus luteus</i>		ATCC 9341	
<i>Listeria monocytogenes</i>		ATCC 15313	LAPRONA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	négatif	ATCC 27853	MNHN
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 8739	
<i>Klebsiella pneumonia</i>		ATCC 13047	LAPRONA
<i>Candida albicans</i>		ATCC 10231	LAPSAB

**MNHN** : Museum National d'Histoire Naturel, Paris.

**LAPRONA** : Laboratoire des Produits Naturels.

**LAPSAB** : Laboratoire antibiotiques antifongiques, physico chimique, synthèse et activités biologiques

**ATCC** : American Type Culture Collection

#### 1.2. Conservation des souches

Elle a été réalisée par ensemencement des souches isolées sur gélose nutritive inclinée en tubes à essais, les cultures pures sont conservées à + 4°C à l'obscurité.

#### 1.3. Les milieux de culture utilisés

Suivant les méthodes employées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisés les milieux de culture suivants :

- Bouillon et Gélose Mueller Hinton pour les bactéries(Sigma-Aldrich).
- Bouillon et Gélose Sabouraud pour la levure (Sigma-Aldrich).

#### 1.4. Les antibiotiques utilisés

Nous avons utilisé des disques de 6 mm de diamètre imprégné des antibiotiques à différentes concentrations conditionnés par le fabricant (Institut Pasteur, Alger) par paquets de 50 disques(**Tableau 8**).

**Tableau 8** :Liste des antibiotiques testés sur les bactéries et la levure

Antibiotiques	Code	Charge
Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	20-10 µg
Gentamicine	GEN	10 µg
Acide nalidixique	NAL	30 µg
Oxacilline	OXA	1 µg
Bacitracine	B	10 UI
Spiramicine	SPI	10 µg
Cefalexine	LEX	30 µg
Colistine	COL	50 µg
Lincomycine	L	15 µg
Cotrimoxazole	SXT	25 µg
Doxycycline	DOX	30 µg
Ampiciline	AMP	10 µg
Neomicyne	NEO	30 UI
Nystatine	-	30 µg

##### 1.4.1.Préparation del'inoculum

Pour la fixation de l'inoculum de départ on a employé une méthode photométrique (**Atwal, 2003**).

A partir d'une préculture (pendant 20 h /37°C sur bouillon Mueller Hinton pour les bactéries, et 48h /30°C sur bouillon Sabouraud pour la levure) préparer une suspension bactérienne dans le bouillon et l'homogénéisé, la densité optique doit être de 0,08 à 0,1 mesuré à 625nm ( $10^8$

UFC/ml) (**Rahal et al., 2011**). La suspension d'inoculum a été diluée 1/10 à une concentration finale de  $1 \times 10^7$  UFC/ml.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

#### 1.4.2. Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.

- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en striesserrées.

- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de  $60^\circ$  à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (**Rahal et al., 2011**).

#### 1.4.3. Application des disques d'antibiotiques

- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.

- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé (**Rahal et al., 2011**).

#### 1.4.4. Incubation

Les boîtes sont incubées pendant 24 h à  $37^\circ\text{C}$  pour les bactéries et 48h à  $30^\circ\text{C}$  pour la levure.

#### 1.4.5. Lecture

- On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle sur le fond de la boîte

- On compare les résultats aux valeurs critiques **CASFM (2012)**

- Selon le diamètre d'inhibition, on classe la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire, ou Résistante (**Rahal et al., 2011**).

## **1.5 Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits de la plante**

### **1.5.1 Préparation de l'extrait**

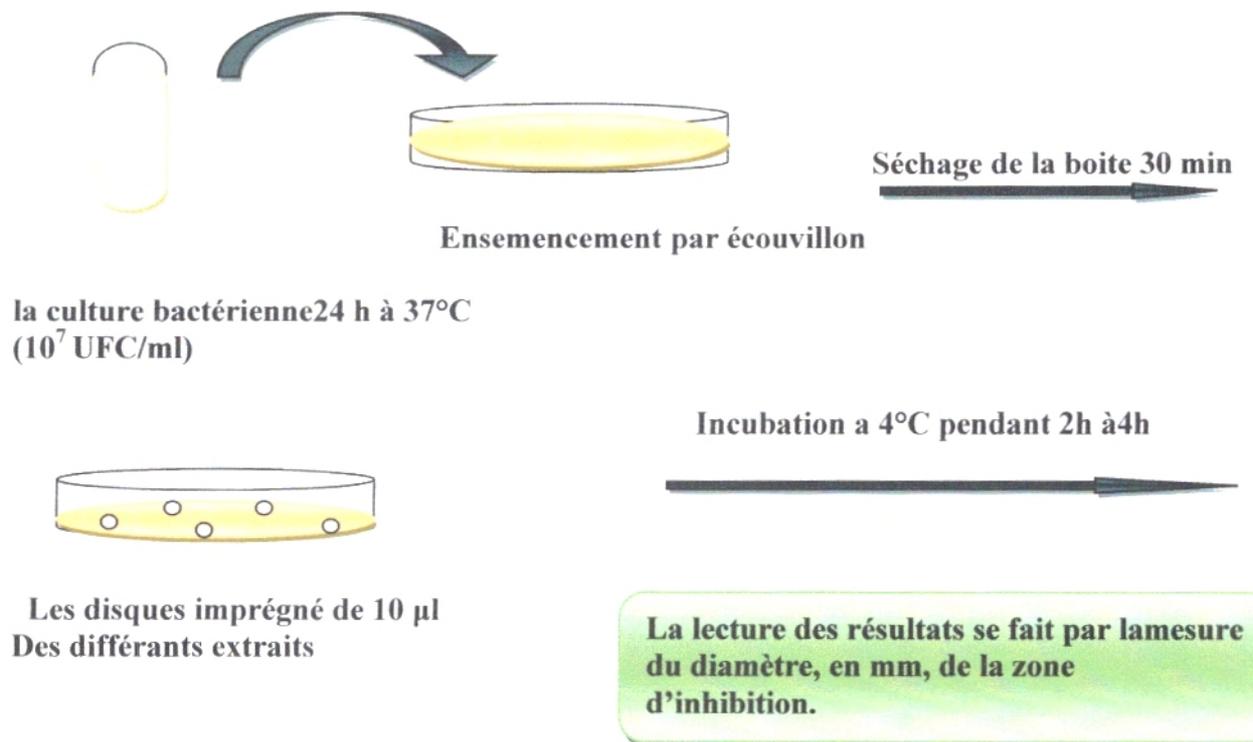
Les différents extraits secs sont récupérés dans le DMSO (Sigma Aldrich) avec une concentration de 250 mg/ml pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux tandis que la fraction méthanolique sa concentration était de 300mg/ml.

### **1.5.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits**

La méthode de diffusion est très utilisée en microbiologie, repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance des microorganismes et la diffusion du produit à tester (**Broadsky et al., 1976**).

#### **➤ Méthode de diffusion sur agar (méthode des disques)**

L'activité antimicrobienne a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion sur agar. Des boîtes de Pétri stériles préalablement coulées par des milieux (Müller Hinton pour les bactéries, et Sabouraud pour la levure), ont étéensemencées à l'aide d'un écouvillon stérile à partir d'une suspension microbienne ( $10^7$  cellule/ml). Puis, des disques de papier filtre stérile de 6 mm de diamètre, imbibé de 10 µl de différents extraits, ont été déposés stérilement sur la surface des milieux. Après incubation de 24h à 37 °C pour les bactéries et 48h à 30°C pour la levure, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition. Toutes les expériences ont été répétées deux fois, (**Lesueur et al., 2007 ; Boulekbache-Makhlouf et al., 2012**).



**Figure 5 :** Méthode des disques Boulekbache-Makhlouf *et al* (2012).

### 1.6 Analyse statistique des résultats

Dans toutes les expériences du dosage et d'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne, les données expérimentales obtenues ont été exprimées en tant que la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de l'activité antioxydante a été déterminé en utilisant les programmes Origin 6 et l'Excel 2003.

RÉSULTATS  
ET  
DISCUSSION

## Chapitre 1 : Tests phytochimiques

### 1-Tests phytochimiques

La mise en évidence des différentes familles de composés chimiques qui se trouvent dans les parties aériennes de *P.chloranthus* a été réalisée grâce aux tests phytochimiques en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation.

La détection de ces composés est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la partie aérienne de *P. chloranthus* sont résumés dans le **tableau 9**.

L'analyse phytochimique nous a permis de constater la présence de six groupes chimiques : flavonoïdes, des tannins, des tannins catéchiques, des hétérosides, des stérols et stéroïdes, des saponosides et des coumarines. En ce qui concerne les autres classes (amidon, alcaloïdes, tanins galliques et anthocyanes) sont totalement absentes.

**Tableau 9:**Résultats des tests phytochimiques sur la partie aérienne de *P.chloranthus*

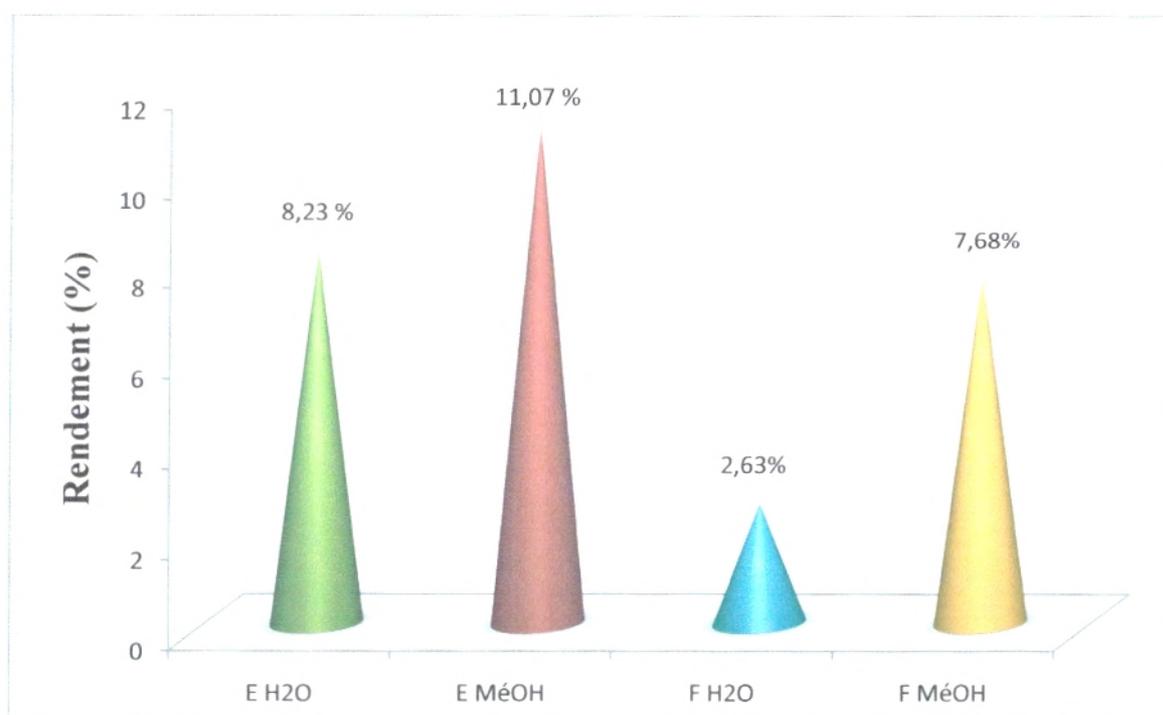
		Familles chimiques	Partieaérienne de la plante
Extrait aqueux	Amidon		-
	Saponosides		+
	Tannins		++
	Flavonoïdes		++
	Anthocyanes		-
Extrait méthanolique	Tannins galliques		-
	Tannins catéchiques		+
	Flavonoïdes		-
	Composés réducteurs		-
	Alcaloïdes		-
	Poudre végétale	Coumarines	+
	Macération avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Stérols et stéroïdes	+
	Hétérosides	+	

(+)présent en faible quantité ;(++) présent en quantité moyen ;(+++)présent en forte quantité ;(-)absence

## Chapitre2 : Rendements des extraits et teneurs en phénols totaux

## 1. Rendements des extraits

Les résultats obtenus (**figure6, annexe 2**) montrent que le rendement le plus important s'est révélé dans l'extrait méthanolique avec un pourcentage de 11.07%, suivi de l'extrait aqueux avec 8.23%, la fraction méthanolique de 7.68% alors que la fraction aqueuse reste faible de l'ordre 2.63%. Nos rendements sont supérieurs à ceux trouvés par certains auteurs de l'ordre de 3,10 % dans l'extrait méthanolique et 5% dans l'extrait aqueux (**Bouaziz et al, 2009**).

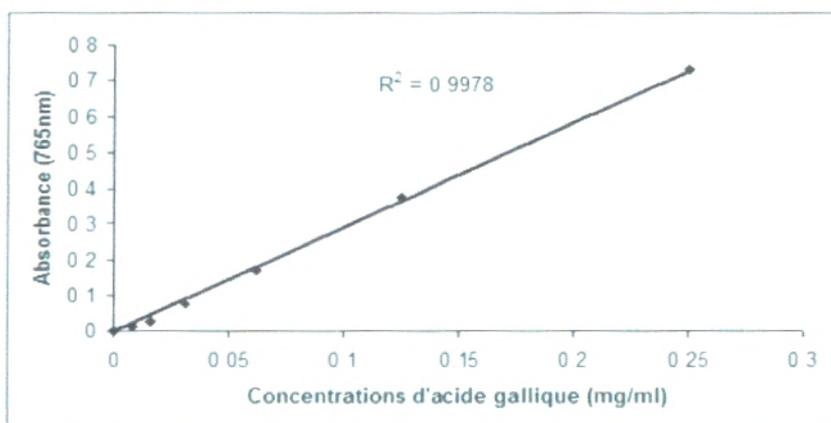


**Figure6 :** Rendement des extraits des composés phénoliques de *P.chloranthus* exprimés en pourcentage.

EH<sub>2</sub>O : Extrait aqueux, E MeOH: Extrait méthanolique, F H<sub>2</sub>O : Fraction aqueuse, FMeOH : Fraction méthanolique.

## 2. Teneurs en phénols totaux

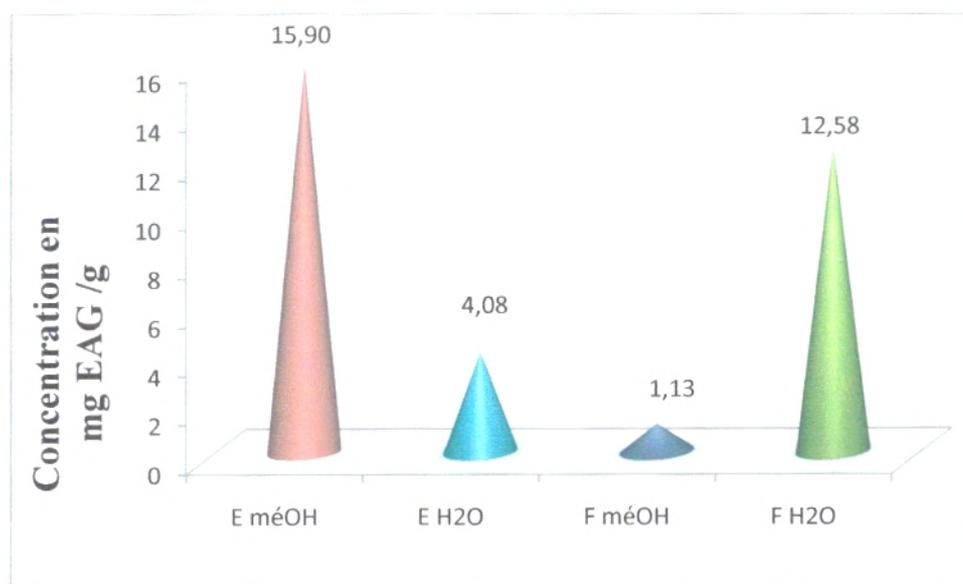
Les teneurs en phénols totaux sont déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimée successivement en mg équivalent d'acide gallique (mg EAG) par g de la matière sèche (MS) (**Figure7**).



**Figure7** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

La **figure 8** résume les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux dans les extraits et les fractions de la partie aérienne de *P.chloranthus*.

Ces résultats nous révèlent une teneur élevée de l'ordre de  $15.90 \pm 2.38$  mg EAG/g de MS pour l'extrait méthanolique suivi de la fraction aqueuse avec  $12.58 \pm 0.06$  mg EAG/g de MS. L'extrait brut aqueux et la fraction méthanolique présentent des teneurs les plus faibles ( $4.089 \pm 0.38$  et  $1.137 \pm 0.07$  mg EAG/g de MS) respectivement. Les quantités trouvées par certains auteurs de l'ordre de  $3.14 \pm 38$  mg EPY/g (extrait méthanol) par contre celle de l'extrait aqueux est de l'ordre de  $3.72 \pm 48$  mg EPY/g (**Bouaziz et al., 2009**) (Annexe 2).



**Figure8** : Teneur en phénols totaux des extraits de *P.chloranthus*

EH2O : Extrait aqueux, E MeOH: Extrait méthanolique, F H2O : Fraction aqueuse, FMeOH : Fraction méthanolique.

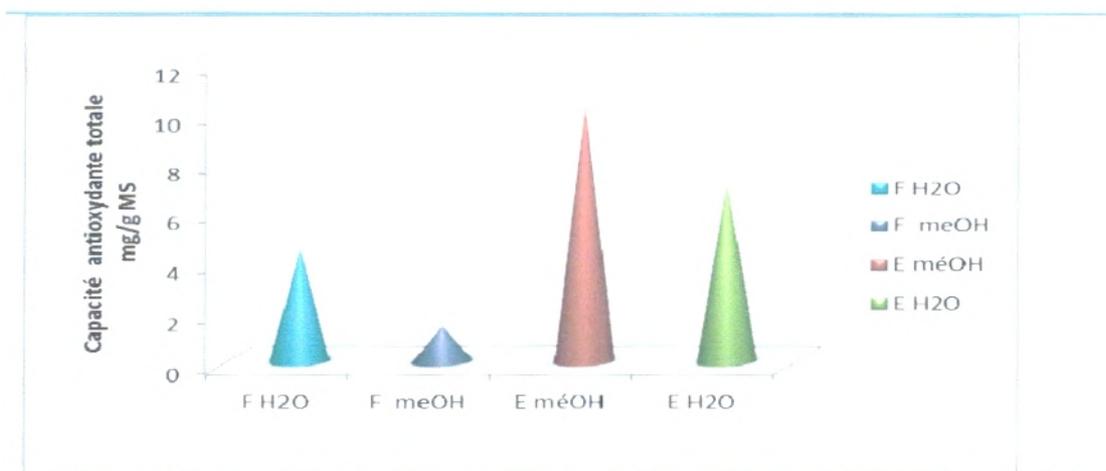
### Chapitre 3: Etude de l'activité antioxydante des différents extraits de *P. chloranthus*

#### 1. Introduction

L'activité antioxydante des extraits de *P. chloranthus* est évaluée par trois méthodes qui sont l'activité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer (FRAP) et le piégeage du radical libre (DPPH).

#### 2. Capacité antioxydante totale (CAT) :

Les résultats obtenus illustrés dans la figure 9 nous montrent que tous nos extraits présentent des capacités antioxydantes totales différentes.



**Figure 9:** La capacité antioxydante totale des extraits de *P. chloranthus*

EH<sub>2</sub>O : Extrait aqueux, E MeOH: Extrait méthanolique, F H<sub>2</sub>O : Fraction aqueuse, FMeOH : Fraction méthanolique.

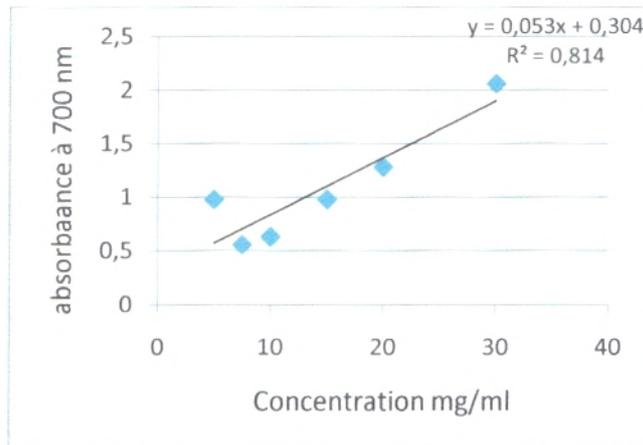
Nous constatons que l'extrait méthanolique possède la meilleure capacité antioxydante avec  $10.32 \pm 0.73$  EAA/gMS suivi de l'extrait aqueux de  $7.16 \pm 0.029$  EAA/gMS tandis que la capacité antioxydante de la fraction aqueuse et la fraction méthanolique reste faible de l'ordre de  $4.497 \pm 0.13$  EAA/gMS et de  $1.414 \pm 0.14$  EAA/gMS respectivement (Annexe 3).

#### 3. Réduction du fer (FRAP)

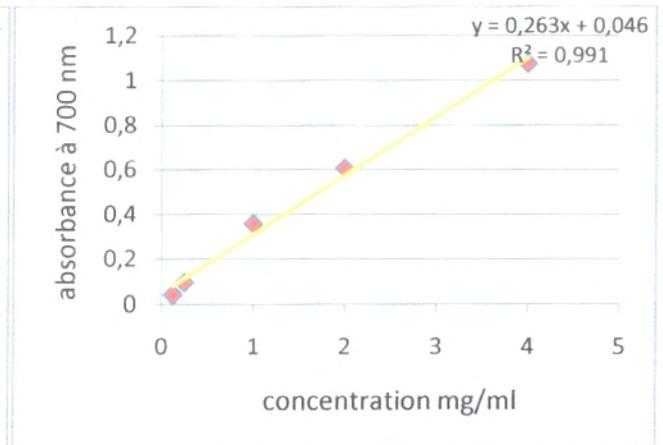
Certaines études rapportent que la capacité réductrice d'un composé sert comme un indicateur significatif de son potentielle d'activité antioxydante (Jeong *et al.*, 2004). L'analyse de l'activité antioxydante est rapide et facile à exécuter, de plus ce test peut servir comme un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle d'un composé (yang *et al.*, 2008). Il est basé sur

la capacité des composés phénoliques à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ )(karagozler *et al*,2008). La figure10 représente le pouvoir réducteur des extraits de la plante étudiée.Comme règle générale, la capacité réductrice augmente avec l'augmentation de la concentration et c'est la plus faible concentration qui peut entrainer la valeur maximale de la densité optique (DO) donc qui révèle ainsi le plus fort pouvoir réducteur du fer.

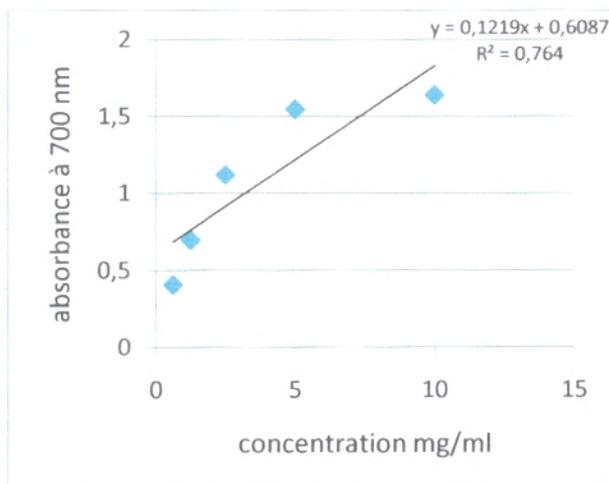
Extrait aqueux



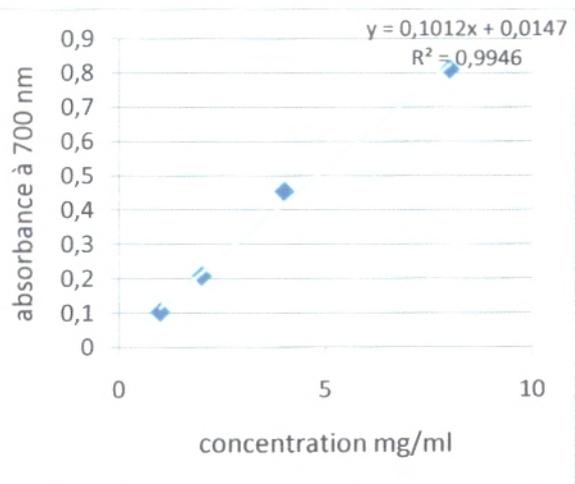
Extrait méthanolique



Fraction aqueuse



Fraction méthanolique



**Figure10:**Pouvoir réducteur exprimé en valeurs moyenne de l'absorbance des extraits des parties aérienne de *P. Chloranthus*.

La fraction aqueuse qui détient le plus fort pouvoir puisque à une concentration de 5mg/ml on a une DO de 1.546 alors que celle de l'extrait méthanolique est légèrement plus faible du moment à la concentration de 5mg/ml on a obtenu une DO de 1.075nm. La fraction méthanolique et l'extrait aqueux ont un faible pouvoir de réduction du fer avec des DO de 0.454et 0.378respectueusement avec des concentrations de 4 et 5 mg/ml (Annexe5).

#### ✓ Calcul des EC<sub>50</sub>

Afin de pouvoir classer l'efficacité des extraits à céder un électron dans cette méthode, nous avons calculé la concentration EC<sub>50</sub> qui est définie comme étant la concentration nécessaire pour réduire de 50 % du ferricyanure de potassium. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 10**.

**Tableau10:** Les concentrations EC<sub>50</sub> des différents extraits de *P. chloranthus*

Extraits	EC <sub>50</sub> (mg/ml)
Extrait brut méthanolique	1.66 ± 0.04
Extrait brut aqueux	7.32 ± 0.69
<b>Fraction aqueuse</b>	<b>0.83 ± 0.03</b>
Fraction méthanolique	4.80 ± 0.24
Acide ascorbique	0,063 ± 0,002

Les résultats révèlent que c'est la fraction aqueuse qui possède un fort pouvoir à réduire le fer avec un (EC<sub>50</sub>=0.83± 0.03 mg /ml) suivi de l'extrait brut méthanolique de l'ordre (EC<sub>50</sub>= 1.66 ± 0.04 mg/ml), alors que les EC<sub>50</sub> sont faibles pour la fraction méthanolique et l'extrait brut aqueux (4.80 ± 0.24 et 7.32 ± 0.69) respectivement. L'efficacité de la réduction du fer est inversement proportionnelle à la valeur EC<sub>50</sub>, donc le classement de nos extraits par ordre croissant est le suivant :

Acide ascorbique > fraction aqueuse > extrait brut méthanolique > la fraction méthanolique > extrait brut aqueux.

4. Piégeage du radical libre DPPH<sup>·</sup>

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicalaire et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al*,2008).

L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH<sup>·</sup> à 515 nm qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes suivant l'équation suivante (Maisuthisakul *et al* (2007).



Avec : A H représente les antioxydants

Dans notre travail, les résultats de la capacité des extraits à piéger le radical DPPH sont exprimés en pourcentage d'inhibition sont représentés dans la (figure 11 annexe 4). Les valeurs obtenues de ce test exprimées en pourcentages d'inhibition (%) en fonction des concentrations nous ont permis de tracer les courbes ayant une allure exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire. C'est la fraction aqueuse qui enregistre une forte concentration de 1.562mg/ml avec un pourcentage d'inhibition de 51.82 %. Chez les autres extraits il reste inférieur que ce soit pour l'extrait brut aqueux avec 46.03 % ou l'extrait brut méthanolique avec 41.55% avec la concentration de 1.5 mg/ml enfin la fraction méthanolique reste très faible avec un pourcentage d'inhibition de 16.97 % à concentration de 1.56mg/ml (Annexe 4).

L'efficacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir de la concentration EC50 (Tableau 11). Plus la valeur de EC50 est faible plus l'activité des extraits est grande.

**Tableau 11:** Concentrations EC50 des extraits de *P. chloranthus*

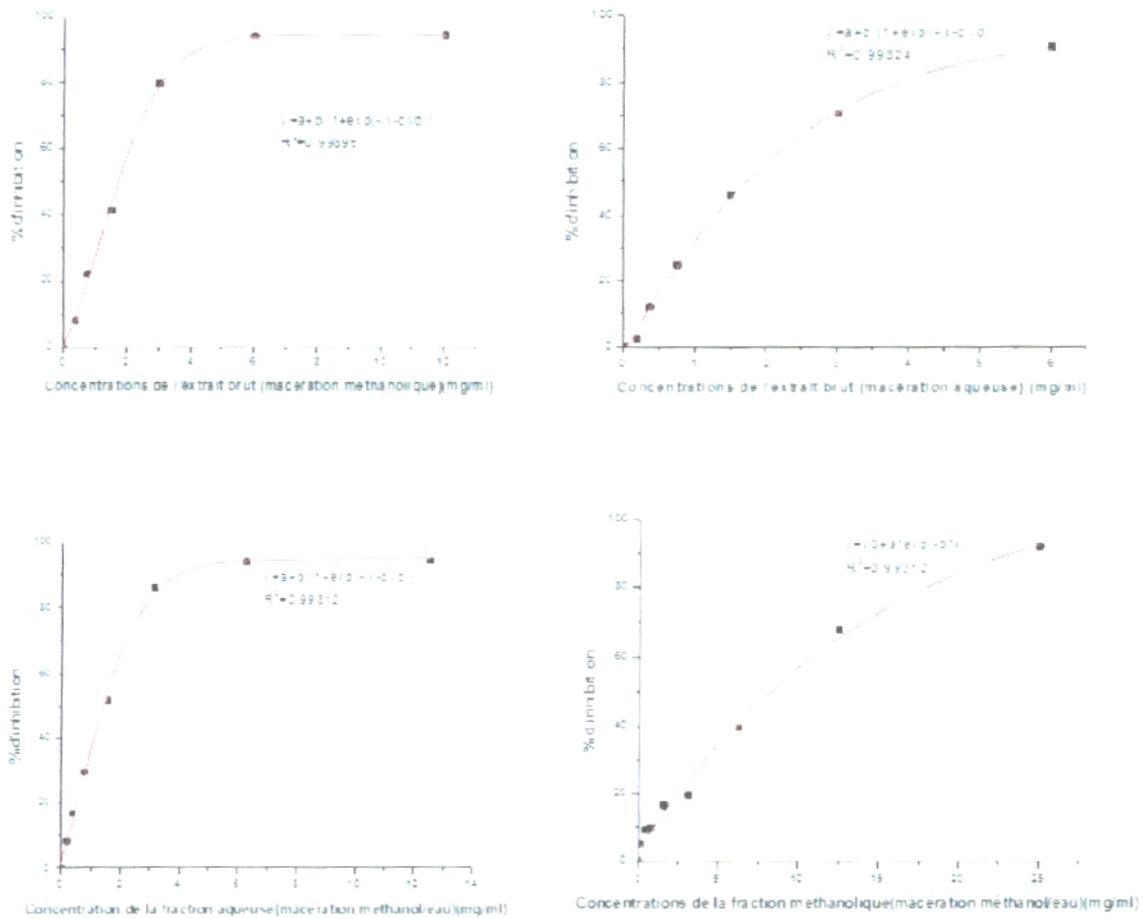
Extraits	EC50 (mg/ml)
Extrait brut méthanolique	1.722 ±0.062
Extrait aqueux	1.716 ± 0.001
Fraction aqueuse	<b>1.407 ± 0.054</b>
Fraction méthanolique	8.320 ±0.295
Acide ascorbique	0.12mg/ml

Au vu des résultats recueillis sur le tableau les extraits brut aqueux et l'extrait brut méthanolique possèdent des activités anti radicalaires forte à piéger le radical DPPH avec des concentrations EC 50 (mg /ml) presque identique de l'ordre de  $1.716 \pm 0.001$  et  $1.722 \pm 0.062$ , tandis que l'activité antioxydante est nettement plus faible rapport aux autres fractions de l'ordre de  $8.32 \pm 0.295$ . La meilleure activité a été obtenu dans la fraction aqueuse de l'ordre  $1.407 \pm 0.054$ .

D'après les valeurs de la concentration EC50, le classement de l'efficacité des extraits par ordre décroissant est le suivant :

Acide ascorbique > fraction aqueuse > extrait aqueux > extrait brut méthanolique > fraction méthanolique.

**Bouaziz et al(2009)**, ont révélé une activité antioxydante très faible par rapport à nos résultats de l'ordre de  $2,01 \pm 0.34$  et  $4.59 \pm 0.78$  respectivement dans l'extrait méthanol et l'extrait aqueux.



**Figure 11 :** Pourcentage d'inhibition du DPPH (%) en fonction des concentrations de l'extrait brut méthanolique, l'extrait aqueux, les fractions méthanolique et la fraction aqueuse des parties aérienne de *P. chloranthus*.

## Chapitre4 : Etude de l'activité antimicrobiennedes différents extraits de

### *P. chloranthus*

#### 1. Pouvoir antibactérien

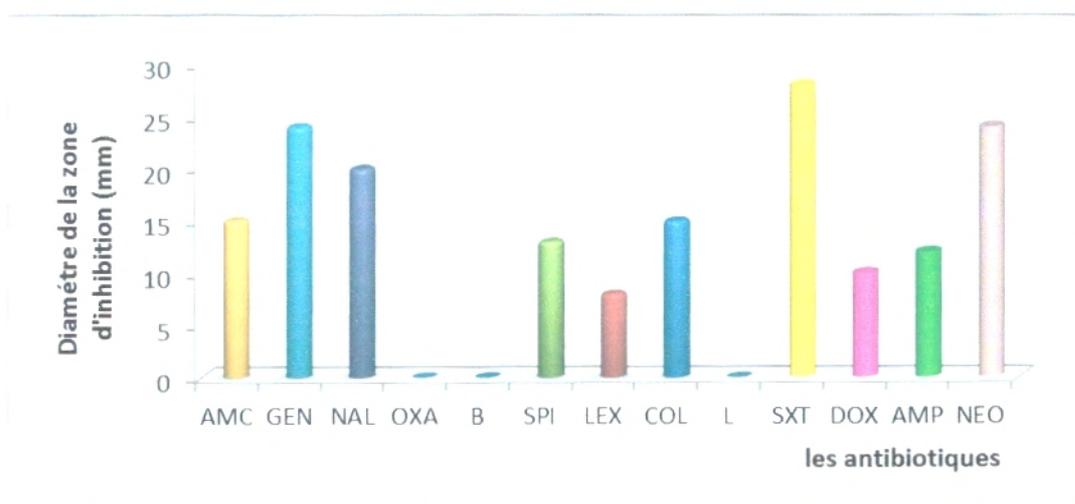
Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien de l'extrait sélectif des tannins de *Pituranthos chloranthus*, on a préféré de les tester contre plusieurs cibles, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

#### 1.1 Résultats de l'Antibiogramme

Les diamètres des zones d'inhibitions nous ont permis de classer les souches testées suivant leur sensibilité vis-à-vis les antibiotiques utilisés.

##### 1.1.1 *Escherichia coli* ATCC 8739

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans la **figure12** et le **tableau 12** (**Annexe 7**), les antibiotiques :cotrimoxazole, neomycine, gentamicine, acide nalidixique et colistine sont les plus efficaces sur *Escherichia coli* avec des zones d'inhibition de 28, 24, 24, 20 et 15mm, respectivement.



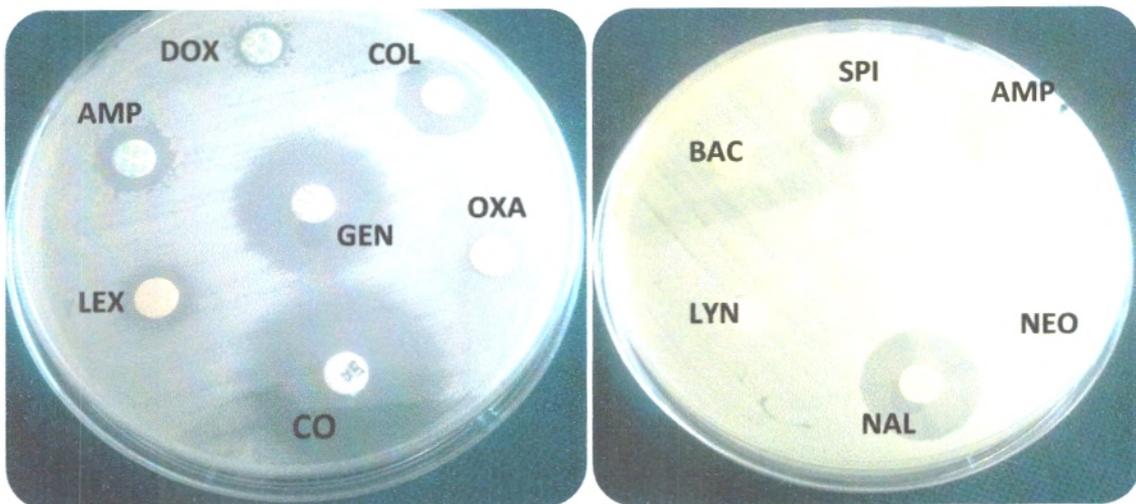
**Figure 12:** Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Escherichia coli* ATCC 8739.

Le tableau 12 et la figure 12 résument les interprétations des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques où cette souche est résistante à la plupart de ces antibiotiques.

**Tableau 12 :** Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Escherichia coli* (CASFM, 2012).

Antibiotiques	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline + acide Clavulanique	R
Gentamicine	S
Acide nalidixique	S
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	R
Ampicilline	R
Neomicyne	S

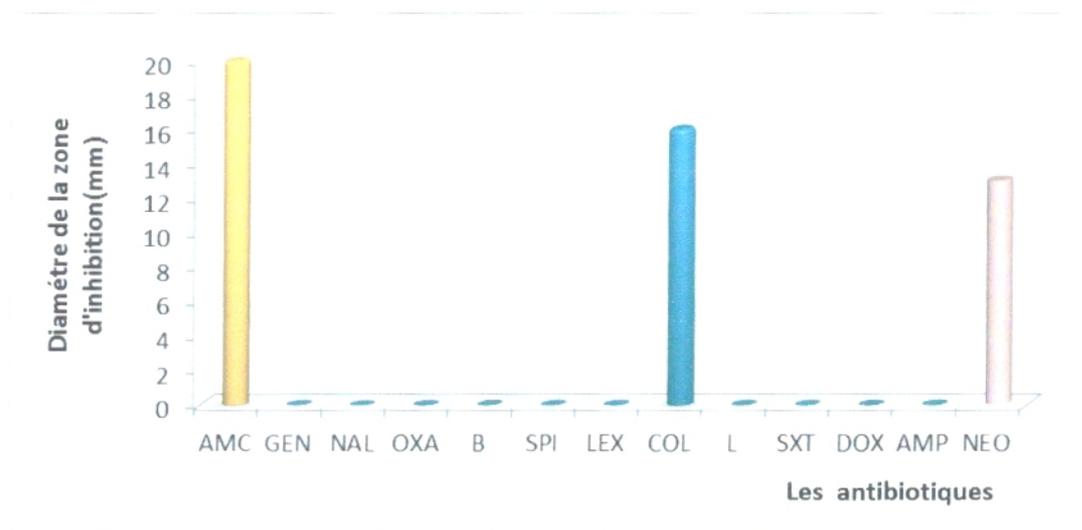
S : Sensible, R : Résistante.



**Photos2 :** Antibiogramme d'*Escherichia. coli*.

### 1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Cette souche à Gram négatif est résistante à tous les antibiotiques à l'exception des deux antibiotiques qui sont inhibiteurs de la croissance, amoxicilline + acide clavulanique, colistine, possèdent des zones d'inhibition 20 et 16 mm (**figure 13 et annexe8, tableau 13**).



**Figure 13 :** Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Nous constatons une sensibilité de la souche *Pseudomonas aeruginosa* testée vis-à-vis de la colistine et l'amoxicilline + acide clavulanique), ainsi qu'une résistance totale contre le reste des antibiotiques (**tableau 13**).

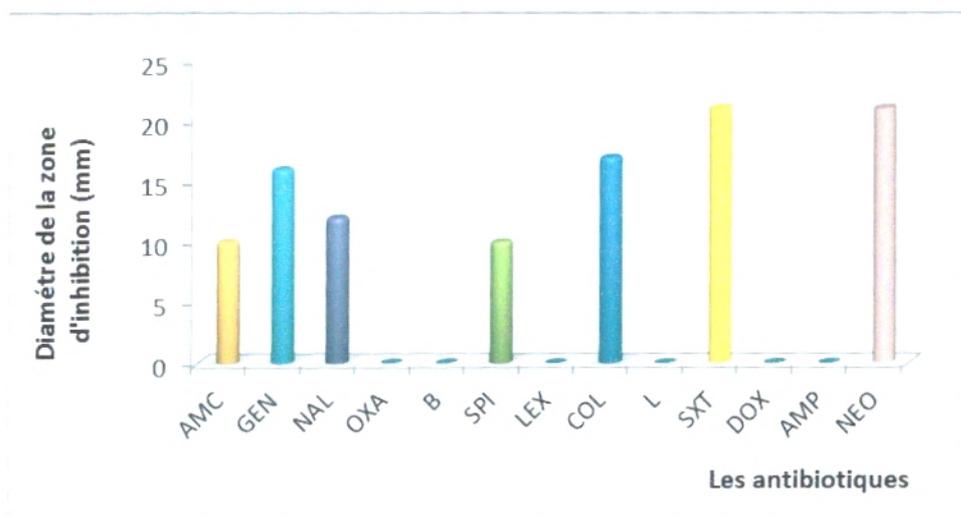
**Tableau 13:** Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Pseudomonas aeruginosa*(CASFM, 2012).

Antibiotiques	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	I
gentamicine	R
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	R
Doxycycline	R
Ampicilline	R
Neomicyne	R

S : Sensible, I : Intermédiaire, R : Résistante.

**1.1.3 *Klebsiellapneumoniae* ATCC 13047**

Nous avons constaté une sensibilité de la souche *K.pneumoniae* testée vis-à-vis de neomycine , cotrimoxazole, colistine et gentamicine avec des zones d'inhibitions de l'ordre de 21, 21, 17 et 16mm respectivement et une résistante pour les autres antibiotiques (**figure 14, annexe 9, tableau 14**).



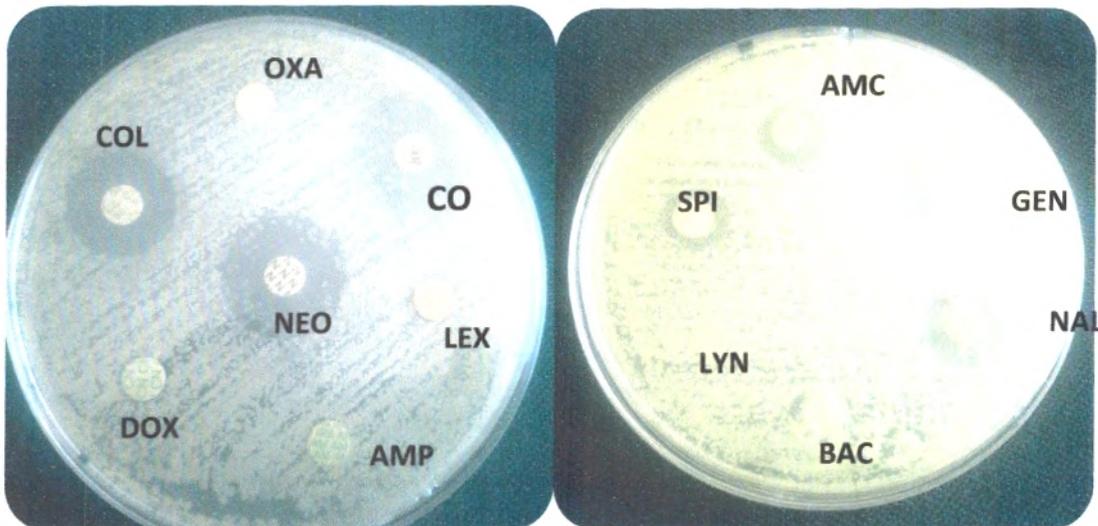
**Figure 14:** Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Klebsiella,pneumoniae* ATCC 13047.

D'après le tableau 14 et la figure 14, *Klebsiella pneumoniae* est sensible aux quatre antibiotiques (neomycine, cotrimoxazole, colistine et gentamicine) et résistante par rapport aux autres.

**Tableau 14:** Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Klebsiella pneumoniae* (CASFM, 2012).

Antibiotiques	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	R
Gentamicine	I
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	R
Ampicilline	R
Neomicyne	S

S : Sensible, I : Intermédiaire, R : Résistante.

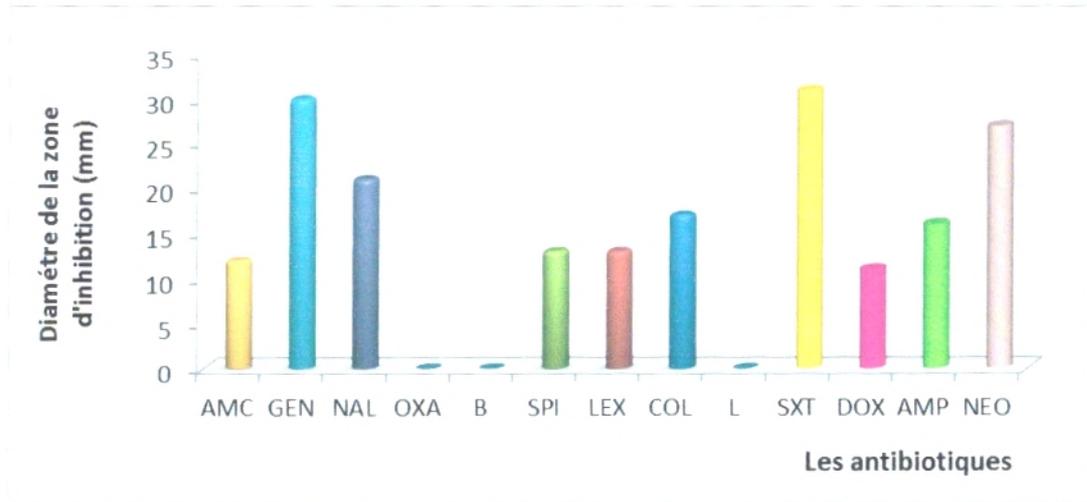


**Photos3:** Antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*.

#### 1.1.4 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Concernant la souche *S. aureus*, nous avons vu qu'il y a une inhibition par la gentamicine, acide nalidixique, colistine, cotrimoxazole, la neomycine, cefalexine et l'ampicilline (figure 15, annexe 10, tableau 15).

**Figure 15:** Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

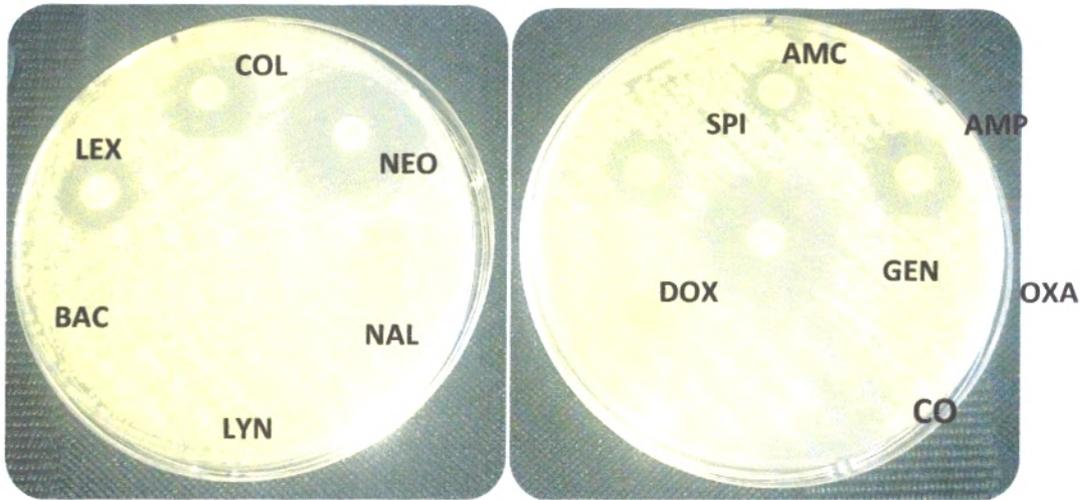


Selon le tableau 15 et la figure 15, *S.aureus* est sensible presque à la moitié des antibiotiques testés et résistante aux restes.

**Tableau 15 :** Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* (CASFM, 2012).

Antibiotiques	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	R
Gentamicine	S
Acide nalidixique	S
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	I
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	R
Ampicilline	I
Neomicyne	S

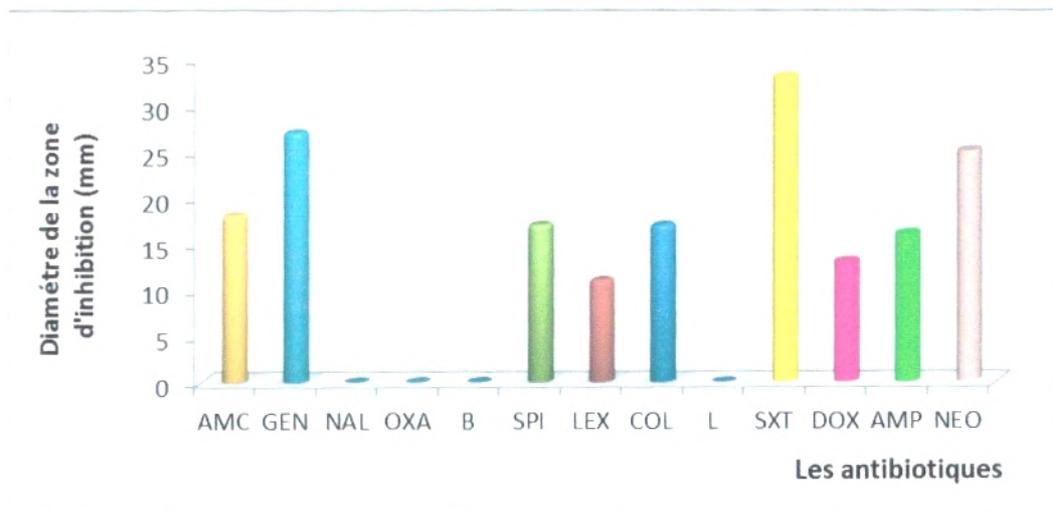
S : Sensible, I : Intermédiaire, R : Résistante.



**Photos4:** Antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

**1.1.5 *Micrococcus luteus* ATCC 9341**

D’après la figure 16 et l’annexe 11 (tableau 16), *M. luteus* est sensible aux cotrimoxazole, gentamycine, neomycine, l’amoxicilline + acide clavulanique, colistine , spiramicine et l’ampicilline avec des zones d’inhibitions de 33, 27, 25,18,17,17 et 16mm respectivement et résistante pour les autres antibiotiques.



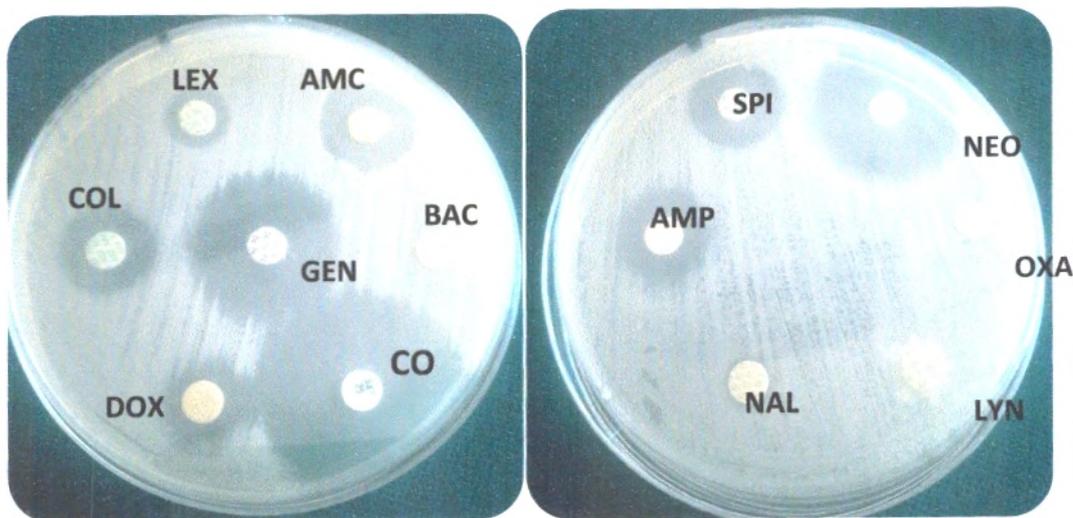
**Figure 16 :** Distribution des diamètres des zones d’inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Micrococcus luteus* ATCC 9341

De même que *M.luteus* est sensible aux antibiotiques gentamycine, colistine ,cotrimoxazole et la neomycine et présente une inhibition intermédiaire pour l’amoxicilline + acide clavulanique, spyramicine et ampicilline et une résistante pour les autres antibiotiques (Tableau16, Figure 16 ).

**Tableau 16:** Interprétation des diamètres des zones d’inhibitionpour *Micrococcusluteus*. (CASFM, 2012).

Antibiotiques	Lecture de l’antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	I
Gentamicine	S
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	R
Ampicilline	I
Neomicyne	S

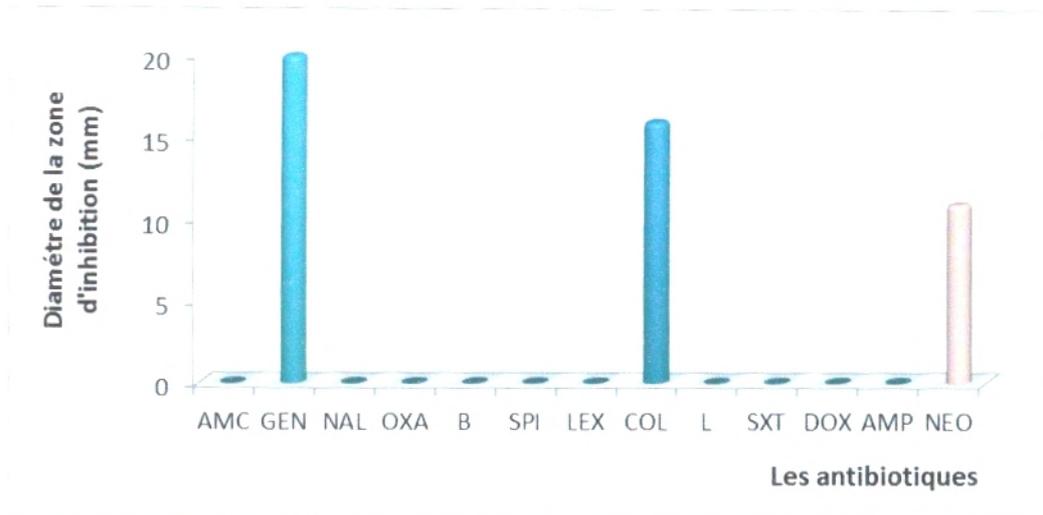
S : Sensible, I : Intermédiaire, R : Résistante.



**Photos5 :** Antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosae*.

**1.1.6 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313**

La figure 17 et l'annexe 11(tableau 17)ont montré que la souche *L.monocytogenes* est sensible à la gentamicine et la colistine avec les diamètres 20 et 16mm respectivement et résistante aux autres antibiotiques.



**Figure 17:** Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

Le tableau 17 révéla une résistance de *L.monocytogenes* vis-à-vis de tous antibiotiques à l'exception de leur sensibilité aux gentamicines et la colistine.

**Tableau 17 :** Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Listeria monocytogenes*(CASFM, 2012).

Antibiotiques	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	R
Gentamicine	S
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Céfalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	R
Ampicilline	R
Neomicyne	R

S : Sensible, I : Intermédiaire, R : Résistante.

## 2. Pouvoir antifongique

Afin de tester le pouvoir antifongique de la levure *Candida albicans*, nous avons mis en présence de la nystatine à 30 µg ou elle a révélé une résistance totale par rapport à celle-ci.

## 3. Pouvoir antimicrobien des différents extraits :

Nous rapportons sur **tableau 18** les diamètres des zones d'inhibition (mm) des différents extraits de *P. chloranthus* relatifs aux souches bactériennes testées.

**Tableau 18** : Les diamètres des zones d'inhibition de *P. chloranthus* pour les six souches bactériennes

Les souches testées	Diamètre en mm	
	Extrait brut méthanolique (C) = 300mg/ml	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	7.0	00
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	00	00
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	00	00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	00	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	00	00
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13047	00	00

L'extrait brut méthanolique de *P. Chloranthus* dont la concentration est égale à 300 mg/ml n'a pas bloqué la croissance bactériennes testées, à l'exception d'une faible inhibition de l'ordre de 7mm a été démontrée sur *Staphylococcus aureus*, bactérie Gram positif. L'hyper résistance de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et à l'absence de la membrane externe (Balentine et al., 2006).

Les autres extraits (l'extrait aqueux, la fraction aqueuse, la fraction méthanolique) nous a révélée une inefficacité sur toutes les souches bactérienne qu'on a étudiées.

La levure *Candida albicans* apparue plus résistante vis-à-vis de notre extrait, donc ce dernier est sans effet sur la croissance de cette levure (**Tableau 19**).

**Tableau 19** : Les diamètres des zones d'inhibition de *P. chloranthus* pour la levure testée (en mm).

Les souches testées	Extrait méthanolique	Fraction méthanolique	Fraction méthanolique	<b>DMSO</b>
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	00	00	00	00

Il a été rapporté par (**Bouaziz et al., 2009**) que les extraits obtenus par l'hexane et l'eau de *Pituranthos chloranthus* ont révélé une activité inhibitrice sur *P. aeruginosae* et *E. coli* avec des zones d'inhibition 14 et 12mm.

D'après les travaux de (**Athamena et al., 2010**), *Staphylococcus aureus* ATCC une bactérie Gram (+), s'est révélée sensible à l'extrait hydro-méthanolique de *Cuminum cyminum* L. (famille des Apiacées) avec des zones d'inhibition de  $16.33 \pm 0.58$  mm avec 10µl par disque.

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et à l'absence de la membrane externe (**Balentine et al., 2006**). Les polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes comme l'épigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine (**Shan et al., 2007**) et lutéoline (**Askunet et al., 2009**) sont des substances antibactériennes importantes, l'inefficacité des extraits de notre plante nous laisse supposer que les polyphénols à pouvoir antimicrobien sont totalement absents, cette hypothèse pourrait être confirmée par des analyses chromatographiques HPLC /SM.

Selon les travaux de (**Benmekhbi et al., 2008**), l'extrait butanolique de *Pituranthos scoparius* (128µg/ml), suivant la méthode de diffusion de disque a montré une bonne activité antibactérienne contre les microorganismes *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aerogénosa* ATCC27853, et *Staphylococcus* doré avec des zones d'inhibition de l'ordre de 30mm.

Les résultats de l'activité antifongique obtenue par (**Athamena et al., 2010**) ont montré l'inefficacité de l'extrait brut hydro-méthanolique du *Cuminumcyminum L.* contre l'ensemble des souches testées (*Candida albicans* et *Candida kefyr* et *Aspergillus niger*. Par conséquent, les résultats de (**Ertürk, 2006**), ont démontré des zones d'inhibition de 14 mm de l'extrait éthanolique du Cumin vis-à-vis de *Candida albicans*, ce qui peut expliquer que l'activité antifongique dépend du solvant utilisé pour l'extraction, cela nous laisse penser que chaque solvant est sélectif pour une famille de polyphénol, donc il réagit différemment avec tel ou tel type de famille de polyphénols en mettant en évidence tel type de polyphénols et pas d'autre.

Nous pouvons conclure que nos extraits n'ont aucune activité antimicrobienne malgré l'utilisation de forte concentration de l'ordre du milligramme par rapport aux autres travaux réalisés, avec des concentrations très faibles de l'ordre du microgramme, on pourra émettre l'hypothèse que notre plante ne renferme pas de polyphénols à fort pouvoir antimicrobien comme la quercétine et de la catéchine deux flavonoïdes doués d'activité antibactérienne, (**Shan et al., 2007**), ou bien la méthode que nous avons utilisée n'est pas bien adaptée pour ce type d'activité antimicrobienne.

CONCLUSION  
GÉNÉRALE

## Conclusion générale

---

La valorisation des espèces endémiques sahariennes en dehors des plantes médicinales classiques, souvent officinales, connues sont utilisées depuis plus ou moins longtemps, il reste encore beaucoup à faire pour dresser l'inventaire complet des espèces susceptibles d'application thérapeutique, il faudra étudier toutes les plantes utilisées en médecine populaire indigène. Pour cela, nous sommes intéressés à l'étude de *Pithurantos chloranthus* qui est une plante très utilisée par la population saharienne contre les céphalées et comme anti-inflammatoire.

Ce travail rentre dans le programme de recherche de notre laboratoire (substances naturelles), c'est un axe qui s'intéresse à la valorisation des plantes sahariennes à caractère médicinal. Nous nous sommes proposé de caractériser qualitativement et quantitativement les métabolites bioactifs, dont les composés phénoliques restent une famille importante. Dans un premier temps, notre étude a été axé sur le côté phytochimique de la plante et le dosage des composés phénoliques, en second lieu on a évalué l'activité anti oxydante et enfin l'activité anti- microbienne des extraits de la partie aérienne de la plante.

La synthèse de nos résultats nous a permis de conclure :

- ❖ La présence des flavonoïdes, des saponosides, des tannins, des hétérosides, des stérols des stéroïdes et des coumarines.
- ❖ Le rendement le plus important se retrouve au niveau de l'extrait méthanolique avec une valeur de 11.07%.
- ❖ La quantification des composés phénoliques, nous montre que la plus forte teneur en phénols totaux est de  $15.905 \pm 2.38$  mg EAG/g de MS pour l'extrait méthanolique, alors que pour les différents autres extraits, sont classés comme suit : la fraction aqueuse  $12.58 \pm 0.06$  mg EAG/g de MS, l'extrait brut aqueux  $4.089 \pm 0.38$  (mg EAG/g de MS et la fraction méthalonique  $1.137 \pm 0.07$  mg EAG/g de MS.
- ❖ Les pouvoirs antioxydants par les trois tests CAT, FRAP et DPPH révèlent que :
  - Une capacité antioxydante totale la plus élevée est enregistrée avec l'extrait méthanolique de  $10.32 \pm 0.73$  EAA/g de MS puis par ordre décroissant vient l'extrait aqueux de  $7.16 \pm 0.029$  EAA/g de MS, la fraction aqueuse  $4.497 \pm 0.13$  EAA/g de MS et la fraction méthanolique de  $1.414 \pm 0.14$  EAA/g de MS.

## Conclusion générale

---

- Le pouvoir réducteur utilisant la méthode (FRAP) des différents extraits montre que c'est la fraction aqueuse qui possède un pouvoir modéré à réduire le fer avec un  $EC_{50}$  de l'ordre de  $0.830 \pm 0.03$  mg/ml comparé à l'antioxydant standard utilisé dans notre cas l'acide ascorbique avec une valeur de  $0.063 \pm 0.002$ .
- Pour ce qui est du piégeage du radical DPPH, nous avons constaté une certaine activité anti radicalaire classé par ordre décroissant, il s'agit de la fraction aqueuse, extrait aqueux, extrait brut méthanolique avec des valeurs de  $EC_{50}$  de l'ordre de  $1.407 \pm 0.054$ ,  $1.716 \pm 0.001$  et  $1.722 \pm 0.062$  (mg/ml) qui sont inférieurs à l'acide ascorbique avec 0.11.
- 
- L'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion de disque de nos extraits de *P. chloranthus*, nous a révélé que toutes les souches bactériennes testées sont résistantes. Nous pouvons déduire que nos extraits sont faiblement actifs sur ces souches.

Tous ces résultats obtenus in vitro ne sont qu'un début dans la recherche des molécules bioactives de notre plante *P. chloranthus* pour cela on pourra envisager d'autres perspectives, à savoir :

- Elargir le panel des activités antioxydantes et antimicrobienne in vitro et in vivo.
- D'exploiter ces molécules en biotechnologie, et plus spécialement dans l'industrie agro-alimentaire en substituant les antioxydants synthétiques du fait de leur toxicité sur la santé humaine.
- Enfin isoler et caractériser les principes actifs par les méthodes d'analyses (CLHP/SM et RMN) responsables des propriétés pharmacologiques.
- Essayer d'autres méthodes pour tester le pouvoir antimicrobien.

RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

**Abdelwahed A, Hayder N., Kilani S., Mahmoud A., Chibani J., Hammami M., Chekir-Gherdira L. and K. Ghedira K., 2006.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tortuosa* (Coss.) Maire. *Flavour Fragr. J.* 21, 129-133.

**Almani, G S., Benayache S, Benayache F, H., Dendougui, et M., Jay., 1998.** Métabolisme flavonique de *Centaureanicaensis* All, *J.Soc. Alg. Chim*, 8, 29.

**Askun, T., Tumen, G., Satil, F., & Ates, M., 2009.** In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chemistry*, 116 (1), 289–294.

**Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S; 2010.** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminumcyminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11(1), 69.

**AtikBekkara, F., Benhammou, N., Panovska, K.T; 2008.** Biological activity of essential oil of the extract of the phenolic compounds of *Inulaviscosa* of the area of Tlemcen (Algeria). *Advances in Food Science*, 30(3), 132-139.

**Atwal, R., 2003.** In vitro Antimicrobial Activity Assessment of *ZymoxOtic* Solution against a Broad Range of Microbial Organisms. *Int. J. Res. Vet Med*, 1(3), 240-252.

**Bahorun, T., 1997.** Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.

**Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W., 2006.** The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73, 413-421.

**Bandoniene, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P.R., Gruzdiene, D., 2002.** Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and online HPLC-DPPH methods. *Eur Food Res Technol*, 214, 143-147.

**Bartosz, G., 2003.** Generation of reactive oxygen species in biological systems Comments on toxicology, 9, 5-21.

**Bekhechi, C., AtikBekkara, F., Consiglio D, AngeBighellib A., Tomi, F., 2012.** Chemical Variability of the Essential Oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, (9), 2743-2753.

**Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R., Rome S., 1998.** Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cv's differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil*, 203, 27-36.

**Belarbi-Benmahdi, M., Khaldi, D., Beghdad, C., Gouzi, H., Bendimerad, N., Hammouti, B., 2009.** Physicochemical and nutritional study of Argan oil (*Argania spinosa* L.) in south western Algeria. *Pigment & Resin Technology*, 38 (2), 96–99.

**Bellakhdar, J., 1997.** Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires. La pharmacopée marocaine traditionnelle, IbsPress, 341.

**Benakcha R. 2001.** Thèse de magister chimie- Université de Constantine. In thèse de magister en chimie organique. Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes : « *Pituranthos chloranthus* et *Marrubium vulgare* ». Université Batna, 2007.

**Benarous, K. 2010.** Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes: a-amylase, trypsine et lipase Mémoire d'Ingénieur d'Etat Université de Laghouat. 39-41.

**Bendimerad, N., TalebBendiab, S.A., Breme, K., Fernandez, X., (2007).** Essential oil composition of aerial parts of *Sinapis arvensis* L. from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 19, 206-208.

**Benhammou, N., AtikBekkara, F., Panovska, K.T., 2008.** Antioxidant and antimicrobial activities of the and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2), 22-28.

**Benmekhbi, L., Kabouche, A., Kabouche, Z., Ait-Kaki, B., Touzani, R., Bruneau, C., 2008.** Five glycosylated flavonoids from the antibacterial butanolic extract of *Pituranthos scoparius*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44 (5), 639-641.

**Benzie, I. F. F., & Strain, J. J., 1999.** Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration.

*Methods. Enzymol*, 299, 15–27.

**Boizot N et Charpentier J-P. 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des Techniques de l'Inra*. 79-82.

**Bouaziz, M., Dhouib, A., Loukil, S., Boukhris, M. ; and Sayadi, S., 2009.** Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 8 (24), 7017-7027.

**Boulekbache-Makhlouf, L., Slimani, S., Madani, K. , 2012.** Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 41 (2013) :85– 89

**Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M, Costa MM, Figueiredo AC, Barroso JG and Pedro LG ., 2007.** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem.*, 105, 146-155

**Bozin, B.; Mimica-Duric, N.; Samojlic, I.; Goran, A.; Igic, R., 2008.** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae), *Food Chemistry*, 111, 925-929.

**Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. 1999.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol*, 28, 25–30.

**Broadsky T.F. , Lewis, C., Eble T.E., 1976.** Bio autographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal Clindamycin in the rat. *J.Chromatograph.*, (123), 33-44.

**Bruneton, J.,1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition.,Paris, Editions TEC & DOC Lavoisier, 1120-1127 ,

**Cabrera M .,Simoens M ., Falchi G ., LauraLavaggi M ., Piro O –E. ., Castellano E –E .,**

**Vidal A .,Azqueta A ., Monge A ., Lopez de Cerain A ., Sagrera G I ., Seoane G .,**

**Cerecetto H., Gonzalez M., 2007.** Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral biological evaluation and structure activity relationships.*Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15, 3356-3367.

**Cao, G.H., Alessio, H.M., Cutler, R.G., 1993.** Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 14: 303-311.

**CASFM, 2012.**Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2012 (Edition de Janvier 2012). Pr C.J. Soussy, R. Bonnet, F. Caron, P. Weber.

**Chaabi,M, 2008,** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines *Euphorbiastenoclaada*Baill.(Euphorbiaceae), *Anogeissusléocarpus*Guill.&Perr. (Combretaceae), *Limoniastrumfeeii* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse deMagister ; spécialité phytochimie ; UniversitéMentouri de Constantine.

**Charfi D., 1995.** Effet des eaux usées traités sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'El-Hajeb (Sfax). Thèse de doctorat en écologie végétale, Fac. Sci. de Sfax.

**Cuendet, M. , 1999.** Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraeablumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude *Bartsiaalpina* (Scrophulariaceae),*Loiseleuriaprocumbens* (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, 24.

**Dacosta, Y.,2003.**Les phytonutriments bioactifs.Ed Yves Dacosta. Paris. 317 .

**DebraybetM ; Jacquemin H ; Razafindraambo, R., 1971.** Travaux et documents de l'Orstom. Paris, 8.

**Dewick PM. 1995.**The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod.*, 12, 579-607.

**Djemai zoughlache, S., 2009.** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. mémoire de magister en Biologie option biochimie appliqué, université de Batna.

**Djeridane, M., Yousfi, B., Nadjemi, D., Boutassouna, P., Stocker, N. Vidal. 2006.** Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing Phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97 (4), 654-660.

**Dupon et Guignard, J.L., 2007.** Abrèges botanique systématique moléculaire. 14<sup>ème</sup> édition révisée, Masson.

**Earnsworth, N.R., Berderka, J.P., Moses, M., 1974.** Screening of Medicinal plant flavonoïdes. *Med. Nut.* 32, 17-27

**Ertürk, 2006.** Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven species plants. *Biologia Bratislava*, 61, 275-278.

**Favier, A., 2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115

**Fleeger JL, Flipse IJ., 1964.** Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 1964, 47 (5): 535-8

**Forkmann G et Martens S., 2001.** Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current opinion in biotechnology*, 12, 155-160

**Formica J-V et Regelson W., 1995.** Review of the Biology of quercetin and related Bioflavonoids. *FdChem. Toxic*, 33, 1061-1080.

**Galeotti F., Barile E., Curir P., Dolci M., Lanzotti V., 2008.** Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Photochemistry Letters*, 1, 44-48

**Ghestem A., Segun E., Paris M., Orecchioni A-M., 2001.** Le préparateur en pharmacie : Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie - Homéopathie. Lavoisier Tec et Doc, Paris, 273.

**Gómez – Caravaca A.M., Gómez – Romero M., Segura-Carretero A., Fernandez Gutiérrez A., 2006.** Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis* 41, 1220 – 34.

**Guignard J. L., Cosson L., Henri M. 1985.** A Bridged of Phytochimie. 1st Masson edition, Paris 224.978

**Haba ,H. Benkhaled,M. Massiot,G.2004.**Log, C. Lavaud, C.Natural Product research, 18(5), 409-413.

**Halim, A.F. ;Saad, H. –E.A ; Lahloub, M.F. et Ahmed, A.F.Phytochemistry, 1995.** Vol.40 (30), 927-929.

**Halliwell et Gutteridge., 1999.**Free radicals (Chemistry); Superoxide; Pathology, Molecular; Biology; Physiological effect.3rd edition. 936.

**Halliwell, B., Whiteman, M. 2004.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *British journal of pharmacology*. 142: 31-2.

**Haslam E., 1994.**Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.*, 11,41-66.

**Heller, F., Pusic, E., Strauss, G. and Wilpert, B. 1998.**Organisational Participation: Myth and Reality, Oxford University Press.

**Ielpo M-T-L ., Bosile A ., Miranda R ., Moscatiello V., Nappo C ., Sorbio S ., Laghi E ., Ricciardi M-M ., Ricciardi L ., Vuotto M-L.,2000.**Immunopharmacological properties of flavonoids. *Fitoterapian*,71,101-109

**In KarumiY,Onyeyili PA et Ogugduaja VO., 2004.** Identification des principaux actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume de pomme). *Journal of Medicine and scientific*. 4(3), 179-182.

**Izzo.A.A, Capasso.F.,1999.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Review.Life.Sci*. 65, 337-53.

**Jeong, S. M., Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S. C., Nam, K. C., Ahn, D. U., et al.,2004.**Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels.*J. Agric. Food Chem*, 52, 3389–3393.

**Jodoin J., Demeule M., Béliveau R., 2002.** *J. Biochem. Biophys.Acta*, 1542, 149-159.

- Julkunen-Titto, R., 1985.** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food.Chem.* 33, 213-217.
- Kansole, M.M.R.,2009.** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucasmartinicansis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundiaopposstavahl* et *Orthosiphonpallidusroyle* ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées,Burkina Faso.
- Karagozler, A . ; Erdag,B. ;CalmazEmek, Y., 2008 .**Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*.*Food Chemistry*, 111,400-407.
- King A et Young G.,1999.** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.*Journal of the American dietetic association*,99,213-218.
- Kocchilin-Ramonatxo, C.,2006.**Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*. 20,165-177.
- Lesueur D., Serra D.de Rocca, Bighelli A., Hoi T.M., Ban N.K., Thai T.H., Casanova J.,2007.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Micheliafaveolata*Meryll ex Dandy from Vietnam.*Flavour and Fragrance Journal*, 22, 317-321.
- Li, C., Oldham, C.D., May, S.W.N.,1994.** N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as a alternativereeductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem.J*, 300: 31-36.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P., 2006.**Les Polyphénols en agroalimentaire, Mahler, H.R., Cordes , E.H. Biology chemistry, 2éme edition, Harper & row, 748,1971.
- Macheix, J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005.**Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de méthabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. 4-5.
- Magalhaes, L.M., Segundo M.A ., Reis S., Lima J., 2008.** Methodological aspects about in vitro evaaluation of antioxidant properties.*AnalyticaaChimicaActa*, 613, 01-19.

**Maisuthisakul, P; Suttajit, M ; Pongsawatmnit, R., 2007** .Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some that indigenous plants, *Food Chemistry*, 100, 1409-1418.

**Makoi JHJR, Ndakidemi PA.,2007**.Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes.*African Journal of Biotechnology*.6,1358–1368

**Marc etHuang, D., Ou, B., Prior, R. L.,2005**.The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1841-1856.

**Marfak, A. 2003**. Radiolyse gamma des flavonoïdes, étude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcool s : Formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges.

**Mascolo N., Izzo A.A. and Capasso F., 1999**.Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*. 65, 337- 353.

**Milane, H., 2004**. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg.

**Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A.,1993**.A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *ClinSci*, 84, 407–412.

**Novak, I., Buzas, G., Minker, E., Kolfai, M., Szendrei, K., 1966**.*Planta med*, (14), 57.

**Oyaizu, M.,1986**. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr*. 44: 307-315.

**Ozenda, P**. Flore du Sahara, 1958, Ed. CNRS Paris France.

**Paris, R; et Moyses, H.,1969**.Précis de matière médicale.Tome 3 Paris , Masson et Cie.

**Petit P .,Granier T ., Langlois d'Estaintot B .,Manigand C., Bathany K ., Schmitter J-M Lauvergeat V ., Hamdi S ., Gallois B., 2007**. Crystal Structure of grape dihydroflavonol 4-ruductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis.*J. Mol. Biol*, 368,1345-1357

- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O., 2002.** Physiological action of antioxidant a defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 16, 233-239
- Popov, I., Lewin, G., Baehr, R. 1987.** Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed BiochimActa*, 46: 775–779
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex , specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269, 337–341.
- Quezel, P ; et Santa, S. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome II -Edit ion. CNRS. Paris.
- Quezel, F. et Santa S.,1962.** S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Vol. 1-2 Ed. CNRS, Paris France.
- Rahal. K ; Benslimani. A ; TaliMaamar. H ; Missoum. M.F.K ; Kechih-Bounar.S ; Ammari. H., 2011 .** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Document édité avec la collaboration de l'OMS, 6eme édition.
- REF- BIBLIO-FINAL
- Richter G.Métabolisme des végétaux.,1993.** Physiologie et Biochimie. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, 1993, 322-323.
- Rizk, A.M.,1982.** Constituents of plants growing in Qatar.*Filoterrapia*, 52(2), 35-42.
- Roberts, J.D., Caserio, M.S., Conia,J.M.1977.** Chimie organique moderne, Menlo& Park, Paris, 784-797, 1977.
- Saija A ., Scalese M ., Lanza M ., Marzullo D ., Bonina F ., Castelli F,1995.** Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes .Free radical biology &medicine ,19, 481-486.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Shalaby, N. 1998.** Modelling, measurement and control, Energetics, chemistry and

engineering, Earth, Resources, Environment, Biomedical problems, 57 (1),17-35.

**Shan B., Cai, Y.Z.,Brooks, J.D., Corke, H.2007.** *The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. Internaational J. Food Microbiology*, (117)112-119.

**Sies, H. ,Linke I., Muller M., 1997.**FEBES.Lett 97, 138- 140.

**Singab, A.N. Khalifa, T. Mahran, G.H Okada. Y. Matsumaru, Y. Nishino, H. Okuyama, T., 1998.**Natural Medicines. 52 (2), 191-194.

**Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr., 1965.**Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.*American Journal of Encology and Viticulture*, 16, 144-158.

**Sokol-LetowskaA ., Oszmianski J ., Wojdylo A., 2007.**Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap.*Food chemistry*,103:853-859.

**Sorg, O.,2004.**Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *ComptesRendus aBiologies*. 327, 649-662.

**TapieroH ., Tew K.D ., Nguyen Ba G ., Mathé G., 2002.**Polyphenol: do they play a role in the prevention of human pathologies. *BiomedPharmacother*, 56,200-207.

**Timbo B., 2003.** Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichiliaemetica*Vahl (MELIACEAE). Thèse de Pharmacie, Bamako. 108 P

**Touil, A., Rhouati, S., Creche.,2006.** Flavonoid glycosides from *Pituranthos chloranthus*. *Chemistry of compounds*, 42(1), 104-105.

**Trease, E., Evans, W.C., 1987.**Pharmacognosiy, 13th edition, BalliereTindall, London, 61-62.

**Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M.,2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*, 160, 1–40.

**Vermerris W., Nicholson R., 2006.** Phenolic Compound Biochemistry , Springer, Dordrecht 4020-5163.

**Vernin, G.; Lageot,C.; Ghiglione, C.; Dahia,M.etParkanyi, C.1999.** *Journal of Essential OilResearch*.11 (6), 673-676.

**Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H., Blanchard, K. A., 1998.**A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biol. Med.* 24, 480–493

**Wollgast, J. and Anklam, E., 2000.** Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health. *Food Research International* 33, 449–459.

**Yang R. Y., Lin S. et Kuo G., 2008.** Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. *Asia of pacific journal of clinical nutrition*. 17 (S1), 275-279.

**Zamkotsian, R.-M Verbin, G.; Ghiglione, C.; Dahia,M.etParkanyi., 1999.** Abstracts of Papers American Chemical Society, 217, 1-2.

**Zhishen, J., Mengcheng, T., &Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64(4): 555–559.

# ANNEXES

## Annexe 1

### Réactifs de caractérisation

#### ➤ Amidon

L'amidon est caractérisé par un réactif spécifique connu sous le nom d'amidon. Ce dernier a été préparé comme suit :

- ✓ Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium ;
- ✓ Chauffer pendant 5 minutes ;
- ✓ Diluer jusqu'à 500 ml.

La détection d'amidon s'effectue comme suit :

- ✓ Chauffer 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition ;
- ✓ Ajouter le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-violacée.

#### ➤ Alcaloïdes

La caractérisation des alcaloïdes se fait par :

- **Réactif de Mayer** : la préparation de ce réactif s'effectue comme suit :

- ✓ Dissoudre 1,358 g de  $\text{HgCl}_2$  dans 60 ml d'eau ;
- ✓ Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau ;
- ✓ Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité blanc

- **Réactif de Wagner** : ce réactif a été préparé comme suit :

- ✓ Dissoudre 2 g de KI et 1,27 de  $\text{I}_2$  dans 75 ml d'eau ;
- ✓ Ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

## Annexe 2

Les rendements (%) des différentes fractions et extrait de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*.

Extrait ou fraction	Rendements %
Extrait aqueux	8.23
Extrait méthanolique	11.07
Fraction aqueuse	2.63
Fraction méthanolique	7.68

Calculs des teneurs en phénols totaux de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*

Extraits	Teneur en phénols totaux (mg EAG/g de MS)
Extrait méthanolique	15.905± 2.38
Extrait aqueux	4.089±0.38
Fraction méthanolique	1.137± 0.07
Fraction aqueuse	12.58±0.06

### Annexe 3

Résultat de la capacité antioxydante totale (CAT) trouvé pour les différents extraits et les fractions de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*

Extraits	Concentration (mg EAA/g MS)
Extrait méthanolique	10.32 ± 0.73
Extrait aqueux	7.16 ± 0.029
Fraction méthanolique	1.414 ± 0.14
Fraction aqueuse	4.497 ± 0.13

#### Annexe 4

Résultat du test de DPPH trouvé pour l'extrait brut méthanolique et l'extrait brut aqueux de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*

Concentrations (mg/ml)	% d'inhibition	
	Extrait brut méthanolique	Extrait brut aqueux
12	95.027	-
6	93.852	90.663
3	79.667	70.437
1.5	41.554	46.033
0.75	22.028	24.841
0.375	8.091	12.2.64
0.1875	-	2.458

Résultat du test de DPPH trouvé pour la fraction aqueuse et la fraction méthanolique de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*

Concentration (mg/ml) :	% d'inhibition	
	fraction aqueuse	fraction méthanolique
25	-	91.954
12.5	94.297	67.872
6.25	93.734	39.625
3.125	86.278	19.548
1.562	51.824	16.972
0.781	29.711	9.844
0.39	16.941	9.368
0.195	8.296	5.292

## Annexe5

Résultat du test de FRAP trouvé pour la fraction aqueuse et l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*

Concentrations mg/ml	MoyenneDO	
	Extrait aqueux	Fraction aqueuse
30	2.060	-
20	1.281	-
15	0.980	-
10	0.630	1.638
7.5	0.557	-
5	0.378	1.546
2.5	-	1.118
1.25	-	0.696
0.625	-	0.407

## Annexe 5

Résultat du test de FRAP trouvé pour la fraction aqueuse et l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*

Concentrations mg/ml	DO Moyenne	
	Extrait brut méthanolique	Fraction méthanolique
8	-	0.8119
4	1.0759	0.4548
2	0.6082	0.2082
1	0.3587	0.104
0.5	0.2785	-
0.25	0.0968	-
0.125	0.0422	-

## Annexe 6

Composition des milieux de culture

### **Mueller Hinton Agar (MH) :**

Infusion de viande de bœuf .....	300g
Hydrolysate de caséine .....	17,5
Amidon.....	1,5
Agar.....	17
Eau distillée.....	1L

### **B. H. I. B**

Protéose-peptone .....	10.0g
Infusion de cervelle de veau.....	12,5g
Infusion de cœur de bœuf.....	5g
Glucose.....	2g
Chlorure de sodium.....	5g
Hydrogénophosphate de sodium.....	2,5g

### **Bouillon Sabouraud**

Peptone de gélatine .....	10g
Glucose.....	20g
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	5,6

### **Sabouraud**

Peptone de gélatine .....	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	17g
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	5,6