

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى  
كلية علوم الطبيعة والحياة

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل

المكتبة  
رقم الجرد: 2391

Université Med-Seddik Benyahia –Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département des Sciences de l'Environnement

قسم علوم المحيط و العلوم الفلاحية

et des Sciences Agronomiques



### Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme: Master Académique en Biologie

Option: Toxicologie de L'environnement

### *Thème*

**Contribution à l'étude des composés  
phénoliques des extraits de *Ruta chalepensis*  
et *Achillea ligustica* et évaluation in vitro de  
leurs activités biologiques**

**Jury de soutenance:**

Présidente: M<sup>me</sup> khennouf H.

Examineur: M<sup>r</sup> Leghouchi E.

Encadrant : M<sup>me</sup> Benterrouche I.

**Présenté par:**

Méradji Besma

Tebbakh Ratiba

Session: Juin 2016

Numéro d'ordre:.....



# Remerciements



*En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU le tout puissant, de nous avoir donné la santé, le courage, la volonté et la force pour l'accomplissement de ce travail et le mener à terme.*

*Nous adressons nos remerciements à notre promotrice consultante « M<sup>me</sup> BENTERROUCHE I.» pour ses précieux conseils, ses encouragements, sa patience, sa compréhension et sa gentillesse pendant le suivi de ce travail. Nous la remercions également pour la mise à notre disposition tout les moyens pour mener à bien ce projet.*

*Nous remercions également Mme KHENNOUF H. d'avoir accepté de présider le jury et Mr LEGHOUCHI E. d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.*

*Un remerciement particulier va à M<sup>me</sup> BENHAMADA W. pour sa précieuse aide.*

*Nos remerciements vont à l'équipe du laboratoire de la biologie  
Nos derniers remerciements vont à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

*Besma et Ratiba*





## Sommaire

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures .....	ii
Liste des photos .....	iv
Introduction.....	1

### *Partie I: Synthèse bibliographique*

#### *Chapitre I: Les composés phénoliques*

I.1.Généralité.....	03
I.2.Biosynthèse de composés phénoliques.....	03
I.2.1. Voie de l'acide Shikimique.....	03
I.2.2.Voie acétate.....	04
I.3.Les principales classes de composés phénoliques.....	04
I.3.1.Les acides phénols.....	05
I.3.2. Les Flavonoïdes.....	06
I.3.3. La coumarine.....	07
I.3.4. les lignines (C6-C3) n.....	08
I.3.5.Les tannins.....	08
I.4.Rôle de composés phénoliques.....	10

#### *Chapitre II: Les activités biologiques étudiées*

II.1. Activité antioxydante.....	11
II.1.1.Qu'es ce qu'un stress oxydatif ?.....	11
II.1.2.Qu'es ce qu'un radical libre ?.....	11
II.1.3. Oxygène et espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	12
II.1.3.1. Radical Superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ).....	12
II.1.3.2.Radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ).....	12
II.1.2.3. Radicale monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ).....	12
II.1.3.4. Le radical peroxyde $ROO^{\bullet}$ .....	13
II.1.4. Origine et régulation des espèces réactives de l'oxygène in vivo.....	13
II.1.5. Les cibles des espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	14
II.1.5.1. Les lipides .....	15

1.5.2. Oxydation des acides nucléiques.....	15
II.1.5. 3.Les protéines.....	16
II.1.6 Antioxydants et systèmes de défense.....	17
II.1.6.1. Définition d'un antioxydant.....	17
II.1.6.2. Systèmes de défense.....	17
II.1.6.2.1. Systèmes enzymatiques.....	17
II.1.6.2.2. Systèmes non enzymatiques.....	18
II.2. Activité antibactérienne.....	19
II.2.1. Généralité.....	19
II.2. 2. Les principales substances antimicrobiennes.....	19
II.2. 2.1. Les antibiotiques.....	19
II.2. 2.1.1. Classifications des antibiotiques.....	20
II.2. 2.1.2. Les principaux modes d'action des antibiotiques.....	20
II.2. 2.2. Propriété antimicrobiennes des composés phénoliques.....	21
 <b>Chapitre III: Espèces végétales étudiées</b>	
III.1.2. Espèces étudiées.....	22
III.1.2.1. <i>Achillea ligustica</i> .....	22
III.1.2.2. <i>Ruta chalepensis</i> .....	23

## **Partie II: Partie expérimentale**

### **Chapitre IV: Matériel et Méthodes**

IV.1. Matériel végétal.....	26
IV.1.1. Echantillonnage.....	26
IV.1.2. Séchage, broyage et tamisage.....	26
IV.2. Extraction.....	26
IV.3. Calcul du rendement en extraits secs.....	28
IV.4. Dosage des composés phénoliques.....	28
IV.4.1. Dosage des phénols totaux.....	28
IV.4.2. Dosage des polyphénols polaires.....	29
IV.4.3. Détermination des polyphénols apolaires.....	29
IV.4.4. Dosage des flavonoïdes.....	30
IV.4.5. Dosage des tannins.....	31



IV.5. Evaluation de l'activité biologique des différents extraits.....	31
IV.5.1. Activité antioxydante.....	31
IV.5.1.1. Pouvoir réducteur.....	32
IV.5.1.2. Effet scavenger du radical DPPH* .....	33
IV.5.2. Activité antibactérienne .....	33
IV.5.2.1 Choix des bactéries .....	33
IV.5.2.2 Description des bactéries étudiées.....	34
IV.5.2.3 Préparations des précultures.....	35
IV.5.2.4. Préparations des suspensions bactériennes.....	35
IV.5.2.5. Méthode d'étude du pouvoir antibactérien des extraits.....	35
IV.6. Analyse statistique.....	36

## **Chapitre V: Résultats et discussions**

V.1. Le taux d'extraction.....	37
V.2. Dosage des composés phénoliques.....	38
V.2.1. Polyphénols totaux.....	38
V.2.2. Polyphénols polaires et apolaires.....	40
V.2.3. Flavonoïdes.....	41
V.2.4. Tannins.....	42
V.3. Activité antioxydante.....	43
V.3.1. Pouvoir réducteur.....	43
IV.3.2.Effet de piégeage de radical DPPH* .....	48
V.4. Activité antibactérienne.....	53
<b>Conclusion.....</b>	<b>58</b>
<b>Référence bibliograph.....</b>	<b>60</b>

## **Annexes**

**Liste des tableaux**

<b>N<sup>o</sup></b>	<b>Titre</b>	<b>pages</b>
<b>1</b>	Les principales classes de composés phénoliques	<b>5</b>
<b>2</b>	Principaux modes d'action des grandes familles d'antibactériens	<b>20</b>
<b>3</b>	Diamètres des zones d'inhibition de l'antibiotique relatifs aux différentes souches bactériennes	<b>56</b>
<b>4</b>	Effets antibactériens des différents solvants d'extraction	<b>60</b>

## Liste des figures

N°	Titre	pages
1	Voie de l'acide shikimique	4
2	Acides hydroxybenzoïques	5
3	Acides hydroxycinnamiques « phénylpropanoïdes »	6
4	Squelette moléculaire de base des Flavonoïdes avec la numérotation classique	7
5	Quelques exemples de structures chimiques des coumarines	7
6	Principaux constituants de la lignine	8
7	Structure des tanins condensés.	9
8	Structure des tanins hydrolysables	9
9	Les principales sources cellulaires des espèces oxygénées réactives	15
10	Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	16
11	Carte de situation géographique de la région de BorjT'har	27
12	Schéma récapitulatif des étapes suivies pour la préparation des extraits	28
13	Protocole de dosage des polyphénols totaux	30
14	Protocole de dosage des polyphénols polaires	31
15	Protocole de dosage des flavonoïdes	31
16	Protocole du dosage des tannins	32
17	Protocole du pouvoir réducteur	33
18	protocole d'étude de l'activité anti-radicalaire.	34
19	Taux d'extraction (%) en extraits bruts secs des espèces étudiées	38
20	Teneur en polyphénols totaux de différents extraits des deux espèces	41
21	Polyphénols polaires et apolaires de différents extraits	42
22	Teneur en flavonoïdes de différents extraites des deux espèces	44
23	Teneur en tanins de différents extraites des deux espèces	46
24	pouvoir réducteur d'extrait éthanolique de deux plantes étudiée en comparaison avec l'acide ascorbique	47
25	Pouvoir réducteur en fonction des concentrations en extrait éthanolique	49
26	Concentration nécessaire pour la réduction de 50% du fer de l'extrait	50



	éthanolique de l'acide ascorbique, Achillea et Ruta respectivement	
27	Le pouvoir réducteur du les plantes étudiées dans différents solvants	51
28	L'activité antiradicalaire des extraits éthanolique de deux plantes étudiées en comparaison avec l'acide ascorbique	52
29	pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH <sup>•</sup> en fonction des différentes	54
30	Concentration inhibitrice 50% de radical libre DPPH <sup>•</sup> de l'extrait éthanolique de l'acide ascorbique, Achillea et Ruta respectivement.	55
31	L'activité antiradicalaire des différents extraits de deux plantes Étudiées	56
32	La moyenne des diamètres des zones d'inhibitions d'extrais des deux plan relatives au <i>Escherichia coli</i>	58
33	La moyenne des diamètres des zones d'inhibitions de différents extraits d'Achillea et Ruta respectivement relatives au <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
34	la moyenne des diamètres des zones d'inhibitions des différents extraits d'Achillea et Ruta respectivement relatives au <i>Staphylococcus aureus</i> .	5
35	moyenne des diamètres des zones d'inhibitions des différents extraits des deux plants relatives au <i>Klebsilla pneumoniae</i> .	59



## Liste des photos

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>pages</b>
1	<i>Achillea Ligustica</i>	22
2	<i>Ruta chalepensis</i>	24

# Introduction





Depuis l'antiquité, l'homme n'a cessé de chercher à subvenir à ses besoins en puisant dans la nature qui lui assure non seulement ses besoins nutritionnels et vestimentaires mais également médicamenteux.

En effet, les plantes constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement qui en dépendent pour assurer leurs soins de santé primaire et leurs subsistances. Elles utilisent la plupart des espèces végétales, tant ligneuses qu'herbacées, comme médicaments (KAR, 2007 in Attou, 2011).

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales dans l'optique de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé humaines, de leurs effets thérapeutiques, les principes actifs des végétaux : phénols totaux, polaire, flavonoïdes, tanins...et vitamine constituent une source inépuisable de molécule doués de propriétés biologiques (antioxydantes et antibactérienne) très diversifiées (DELILLE, 2007 in CHENNI, 2010).

De plus, la médication par les produits de synthèse devient préoccupante car elle présente de nombreux effets néfastes pour la santé. A cet effet, l'étude de substance active ou principes actifs d'origine naturelle moins toxique et en alternative avec les médicaments de synthèse suscite un regain d'intérêt des scientifique, du fait qu'elle permet la mise au point de nouveaux médicaments (FARNSWORTH et al., 1986 ; ROUX 2007 in CHENNI, 2010).

De nos jours, entre 20.000 et 25.000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale (SI-MOHAMED et SI-MOHAMED, 2012).

Ce travail vise à quantifier les composés phénolique et à étudier l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits de deux plantes médicinales, *Achillea ligustica* et *Ruta chalepensis*, qui appartiennent respectivement à la famille des Astéraceae et des Rutaceae afin de justifier scientifiquement l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle.

Pour cela notre étude englobe trois aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques. Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antioxydante vis-à-vis du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur. Enfin, un test antibactérien est également réalisé afin de déterminer l'efficacité des composés phénoliques contre quatre souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsilla pneumoniae*) pouvant être pathogènes pour l'homme.

Donc le présent travail est divisé en deux parties :

La première constitue une synthèse bibliographique regroupant les principales informations sur les composés phénoliques, les activités biologiques (antioxydante et antibactérienne) et les informations sur les espèces étudiées.

Dans la seconde partie, l'étude expérimentale est subdivisée en deux chapitres : l'un présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail et l'autre est consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

Enfin, on termine notre travail par une conclusion et des perspectives.



# **Parti I : Recherche bibliographique**



**Chapitre I :**  
**Les composés phénoliques**



## I.1. Généralité

Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être considérées comme des substances indirectement essentielles à la vie des plantes par contre aux métabolites primaires qu'ils sont les principales dans leur développement et leur croissance. Les métabolites secondaires participent à l'adaptation de la plante avec l'environnement, ainsi à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température ...) (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

La famille de métabolites secondaires issus des acides aromatique est habituellement comme sous le terme de composés phénolique (HOPKINS, 2003). Ces derniers forment un très vaste ensemble de substances dont la caractéristique est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester et hétéroside) (BRUNETON, 2009).

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (LUGASI *et al.*, 2003).

## I.2. Biosynthèse de composés phénoliques

La biosynthèse du noyau aromatique est un des processus fondamentaux de la biochimie végétale. La biogenèse du noyau aromatique est apparue aux cours de l'évolution de la plante puisque la protéogénèse fait appel à trois acides aminés aromatiques qui sont phénylalanine, tyrosine et tryptophane (HOPKINS, 2003 et MERGHEM, 2009). Les composés phénoliques des végétaux sont issus de 2 grandes voies d'aromagenèse (BRUNETON, 2009).

### I.2.1. Voie de l'acide Shikimique

La voie de l'acide shikimique est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, les 3 acides aminés aromatiques sont synthétisés à partir du phosphénolpyruvate et de l'érythrose -4-phosphate au cours d'une succession de réaction appelée "vois de l'acide Shikimique" (figure 1) (HOPKINS, 2003).

Selon HOPKINS (2003) et MERGHEM (2009), la synthèse des acides aminés commence par la condensation d'une molécule d'érythrose -4-phosphate qui est produit par la vois respiratoire de pentose phosphate avec une molécule phospho-énolpyruvique (PEP) qui provient de la

glycolyse.

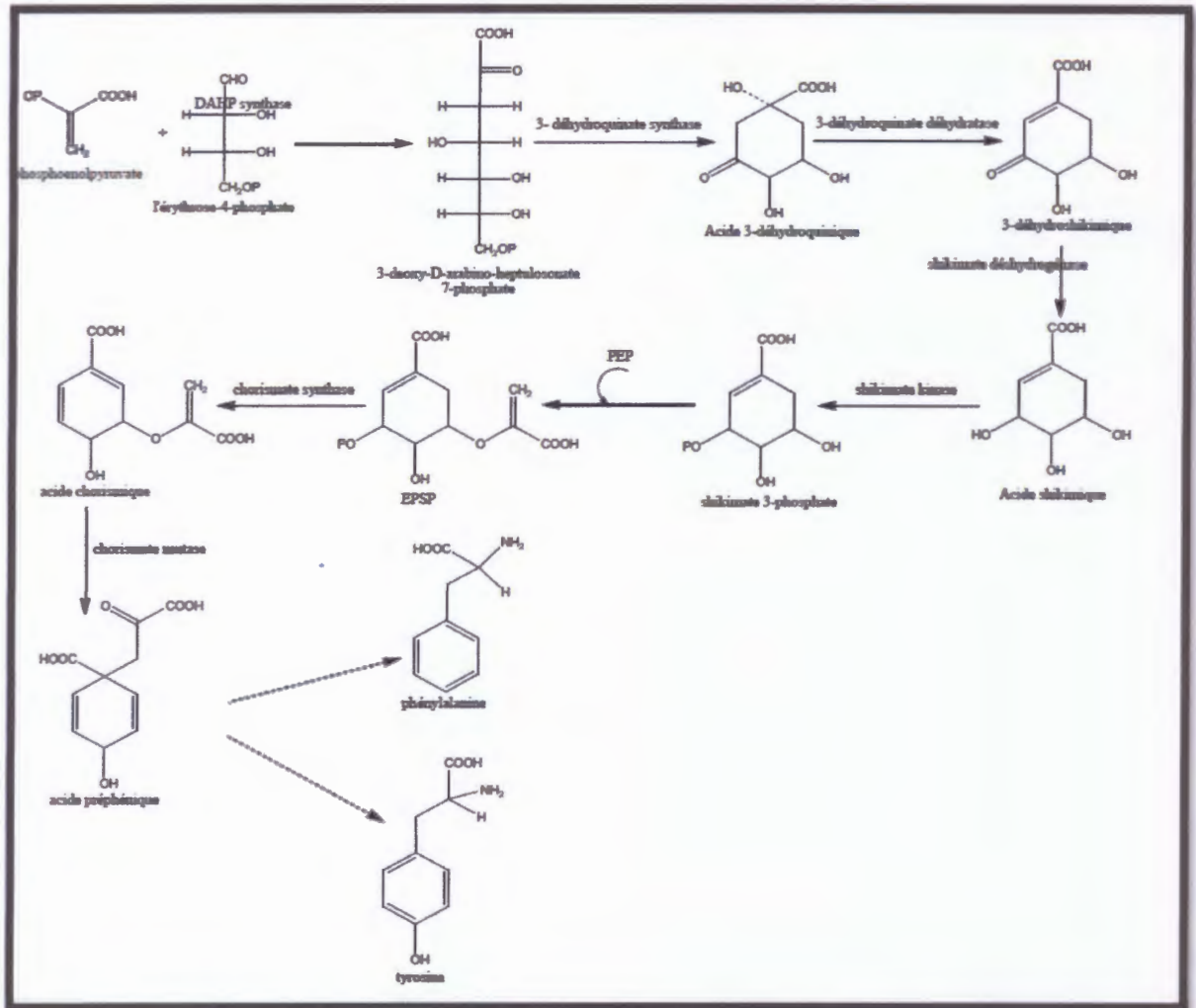


Figure 01 : Voie de l'acide shikimique (HOPKINS, 2003).

### I.2.2. Voie acétate

Cette voie est Plus fréquente chez les bactéries, champignons et plantes inférieure, qui consiste à réaliser un ensemble de noyaux aromatiques par cyclisation des chaînes polycétonique. Elles mêmes obtenus par condensation de groupement acétates (MERGHEM, 2009)

### I.3. Les principales classes de composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (tableau1) qui se différencient d'abord par la complexité des molécules de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées) ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques) (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).



**Tableau 01:** Les principales classes de composés phénoliques (MACHEIX et SARNI-MANCHADO, 2005)

Squelette Carboné	Classe	Exemple	Origine
C6	Phénols simples	Catéchol	
C6 - C1	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C6 - C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique Scopolétine, esculétine	Citrus Citrus
C6 - C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6 - C2 - C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C6 - C3 - C6	Flavonoïdes • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Déidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleure, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C6 - C3)2	Lingnanes	Pinorésinol	Pin
(C6 - C3) n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C15) n	Tannins		Raisin rouge, Kaki

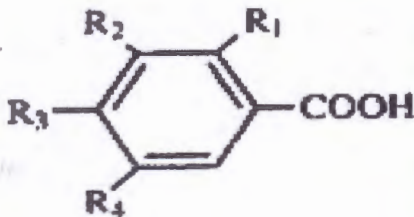
### I.3.1. Les acides phénols

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyl phénolique (BRUNETON, 1999)

#### ➤ Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques (*p*-hydroxybenzoïques, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicyclique, gentisique, ... etc.) (figure 2), sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Ils sont particulièrement représentés chez les gymnospermes et les angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal, en particulier de la lignine et de certains tannins. Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides (MACHEIX et al., 2005 SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).



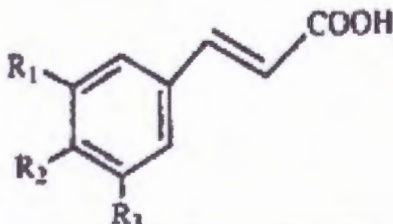
	R1=R2=R3=R4=H	acide benzoïque (non phénolique)
	R1=R2=R4=H, R3=OH	acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
	R1=R4=H, R2=R3=OH	acide protocatéchique
	R1=R4=H, R2=OCH3, R3=OH	acide vanillique
	R1=H, R2=R3=R4=OH	acide gallique
	R1=H, R2=R4=OCH3, R3=OH	acide syringique
	R1=OH, R2=R3=R4=H	acide salicylique
R1=R4=OH, R2=R3=H	acide gentisique	

**Figure02 :** Acides hydroxybenzoïques (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

### ➤ 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. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les féruliques ou sinapiques) sont des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules.

Les molécules de base de la série hydroxycinnamiques l'acide *p*-coumarique (et ses isomères, les acides *o*- et *m*-coumariques, l'acide caféique, l'acide férulique et son dérivé 5-hydroxyle et enfin l'acide sinapique) (figure 3) (MACHEIX et al., 2005 SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

	R1=R2=R3=H	acide cinnamique (non phénolique)
	R1=R3=H, R2=OH	acide <i>p</i> -coumarique
	R1=R2=OH, R3=H	acide caféique
	R1=OCH3, R2=OH, R3=H	acide férulique
	R1=R3=OCH3, R2=OH	acide sinapique

**Figure03:** Acides hydroxycinnamiques « phénylpropanoïdes » (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

### I.3.2. Les Flavonoïdes :

Les Flavonoïdes sont des facilement extractible à cause de la brillance de leurs couleurs. Ilsont constitué une source de colorants dès l'antiquité. Par conséquent dès que la chimie organique moderne a commencé à se développer, les flavonoïdes ont été très largement étudiés et leur chimie est bien connue (HOPKINS, 2003). Les Flavonoïdes sont des dérivés du phénylpropane avec une composition de base C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> le squelette originel du groupe est une flavone dans laquelle la

liaison C<sub>3</sub> a formé un noyau hétérocyclique pyromane (HOPKINS, 2003). Ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base: deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (figure 04) (TAPAS et al., 2008).

Certaines flavanes ont une très grande importance biologique et technologique : les anthocyanes, (pigments rouges ou bleus), les flavones et les flavonols (de couleur crème ou jaune clair), les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe importance de tannins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine (MACHEIX et al., 2005).

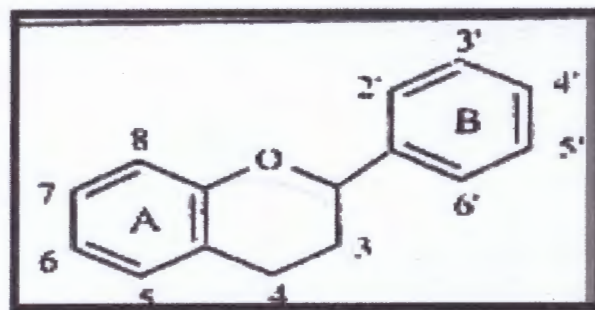


Figure04 : Squelette moléculaire de base des Flavonoïdes avec la numérotation classique (MACHEIX et al., 2005).

### I.3.3. La coumarine

La coumarine est également le point de départ d'une famille de composés, qui se forme par une substitution sur un cycle aromatique (figure 05), analogue à celle des dérivés de l'acide cinnamique (RICHTER, 1993).

La coumarine donne au foin fraîchement coupé son odeur douceâtre caractéristique. Elle est également une composante de l'huile de bergamote, qui est utilisée pour parfumer le tabac de pipe, le thé et d'autres produits. Alors que la coumarine n'est pas toxique en soi, elle peut être convertie par les champignons, en une toxine « le dicoumarol » qui est typiquement présent dans le foin moisi (HOPKINS, 2003).

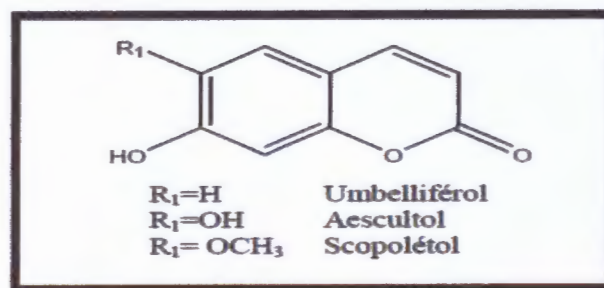


Figure 05 : Quelques exemples de structures chimiques des coumarines (Lacy et al., 2004).



### I.3.4. Les lignines (C6-C3) n

Bien qu'il soit difficile de considérer les lignines comme un « métabolite secondaire » compte tenu de leur importance quantitative et biologique et leur signification dans l'évolution des plantes terrestres, elles doivent être logiquement rattachées aux composés phénoliques en raison de leur structure chimique et des voies de biosynthèse qui sont directement liées à celles des phénylpropanides (MACHEIX et al., 2005).

Les lignines en se déposant au niveau des parois cellulaires secondaires, leur confèrent une autre résistance à la traction et à la pression, grâce à leur propre élasticité. Ce sont par conséquent les parois des cellules de soutien et des cellules des vaisseaux conducteurs qui sont préférentiellement pourvues de dépôts de lignine (RICHTER, 1993). Les principaux constituants de la lignine sont représentés sur la figure 06.

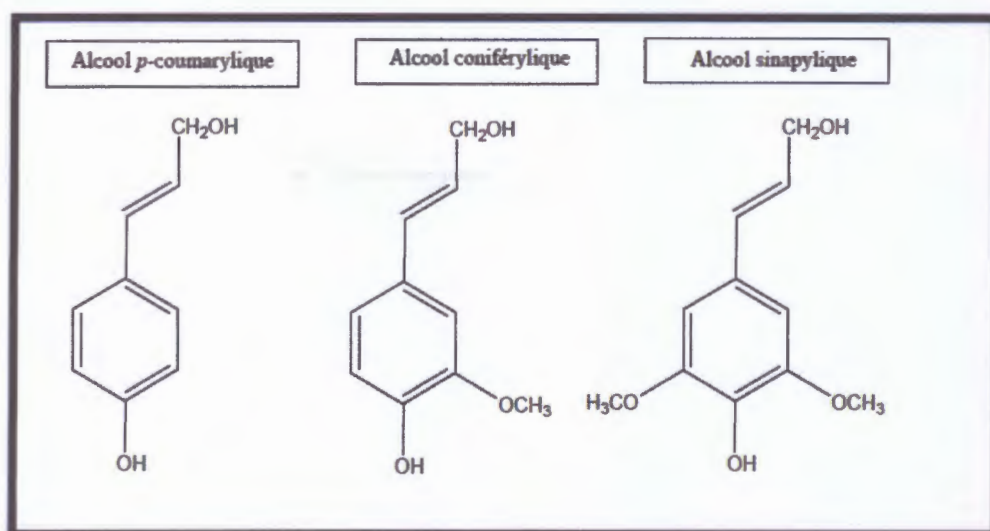


Figure 06: Principaux constituants de la lignine (MACHEIX et al., 2005).

### I.3.5. Les tannins

Selon RAVEN, 2000, les tannins sont des composés phénoliques présents à des concentrations relativement élevées dans les feuilles de plantes ligneuses très diverses.

Le terme provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour « tanner » les peaux d'animaux, autrement dit pour transformer une peau en cuir (HOPKINS, 2003).

On distingue deux catégories de tannins : tannins condensés et tannins hydrolysables.

#### I.3.5.1 Les tannins condensés



Sont des polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons fortes de carbone, non hydrolysable mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines (figure 07) (HOPKINS, 2003).

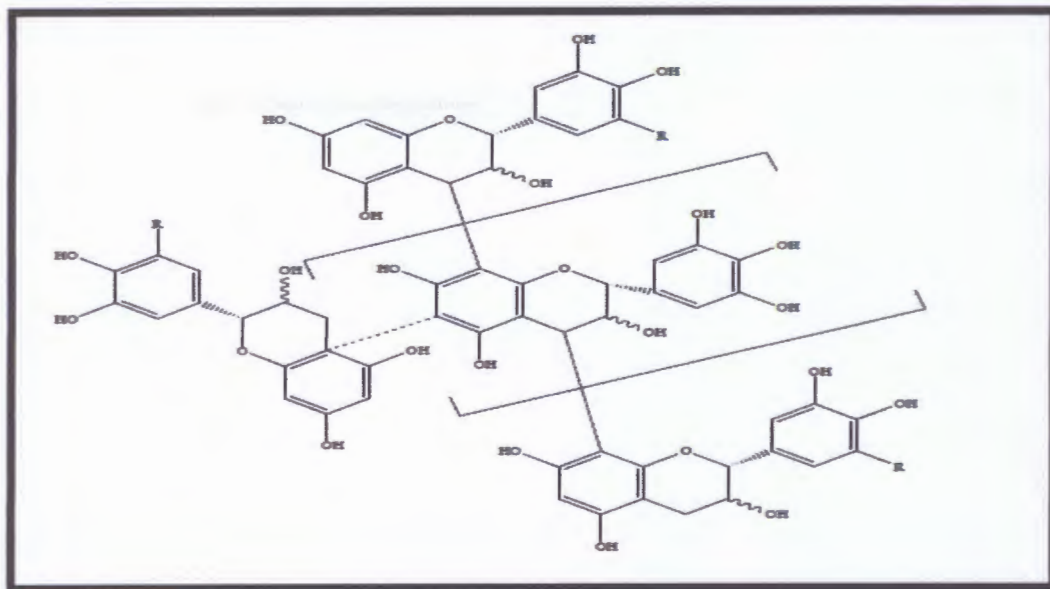


Figure 07: Structure des tannins condensés (HOPKINS, 2003).

### I .3.5.2. Les tannins hydrolysables

Ces tannins sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique en libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique (figure8) (MACHEIX et al., 2005).

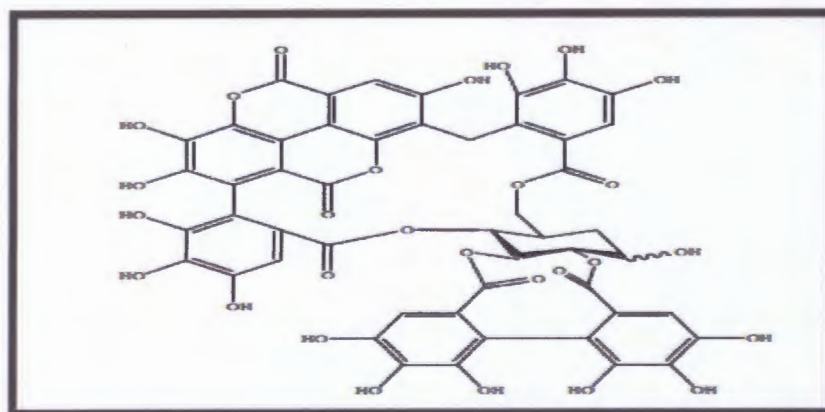


Figure 08: Structure de tannins hydrolysables (MACHEIX et al., 2005).

#### I.4. Rôle de composés phénoliques

Les composés phénoliques ont été impliqués depuis longtemps dans différents domaines de la physiologie de la plante et dans ses relations avec l'environnement physicochimique et biologique. (SARNIMANCHADO et CHEYNIER, 2006).

Donc le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux (MACHEIX et al., 2005).

En effet, tous les composés phénoliques jouent un rôle important dans le métabolisme de la plante mais aussi peuvent réagir dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes). Toutes les catégories de composés phénoliques sont impliquées dans les mécanismes de résistance (DICKO et al., 2008). Ils assurent la communication entre cellules, entre végétaux, entre végétaux et animaux (ROBERT et al., 2000).

Tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements UV et participent donc à la protection des végétaux contre le rayonnement solaire, en particulier en raison de leur localisation superficielle dans les tissus (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

Les pigments de nature phénolique (anthocyanes, flavonols, pigments bruns) participent à la coloration des organes végétaux et jouent à ce titre-là un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement biologique (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

Au niveau des feuilles et fleur, les flavonoïdes ont un rôle attractif pour les abeilles ou répulsif sur les insectes herbivores entraînant ou non la consommation de feuillage (MERGHEM, 2009).

Certains flavonoïdes ont des propriétés fongicides et insecticides qui protègent la plante contre l'attaque des champignons et des insectes (MERGHEM, 2009).

Les propriétés antioxydants ou anti-inflammatoires des polyphénols participent à la prévention de diverses pathologies impliquant le stress oxydant et le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives, (MACHEIX et al., 2005 SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

## **Chapitre II : Les activités biologiques étudiées**



## II.1. Activité antioxydante

### II.1.1. Qu'est-ce qu'un stress oxydatif ?

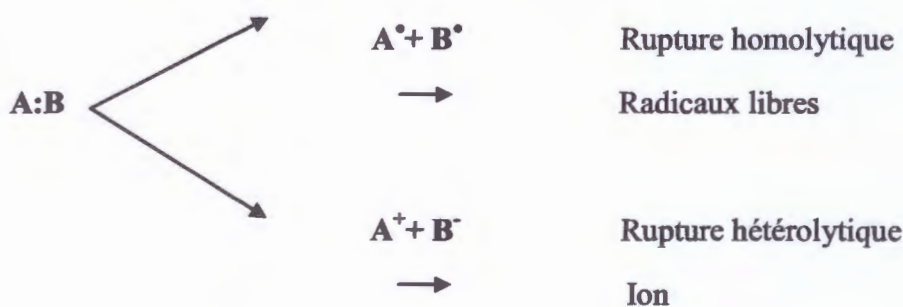
En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées (DEFAIGNE et al, 2007), suite à déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les capacités anti oxydantes de l'organisme (DELATTRE et al., 2005). Cet état est observé physiologiquement au cours du vieillissement et il accompagne également de nombreuses pathologies. Il se traduit par l'accumulation de produits d'oxydation des biomolécules (lipides, protéines, acides nucléiques) au niveau plasmatique et au niveau cellulaire, ce qui permet d'évaluer ce stress oxydant par la détermination de ces produits d'oxydation (BEAUDEUX et DURNAD, 2008).

### II.1.2. Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Un radical libre est défini comme une molécule ou une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons libres sur sa couche périphérique (BORG et REEBER, 2004; DELATTRE et al., 2005).

Selon une définition proposée par HALLIWELL et GUTTERIDGE (1999), les radicaux libres sont des espèces chimiques capables d'existence indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariés", dits électrons célibataires.

D'après DELATTRE et al. (2003), les radicaux libres peuvent se former par transferts mono-électronique ou par scission homolytique d'une liaison covalente selon le schéma suivant :



Selon BORG et REEBER (2004), l'oxydation d'une molécule A : B peut produire les composés A<sup>+</sup> et B<sup>-</sup> qui sont chargés et appelés ions, ou bien les composés A<sup>•</sup> et B<sup>•</sup> qui possèdent un électron libre et appelés radicaux libres qui est très réactif. Parmi les composés qui répondent à cette définition, citons :

- L'atome d'hydrogène;
- Les ions métalliques de transition ;
- Les molécules dérivées de l'oxygène ;
- L'oxyde nitrique.

### II.1.3. Oxygène et espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le peroxyde nitrite ( $ONOO^{\bullet}$ ) (JACQUES et ANDRE, 2004; GUTTERIDGE, 1993).

#### II.1.3.1. Radical Superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ )

Les Radicaux  $O_2^{\bullet -}$  sont des radicaux relativement peu réactifs par eux-mêmes, mais dont la toxicité provient du fait qu'ils peuvent donner naissance à des composés plus réactifs. (DELATTRE et al., 2003).

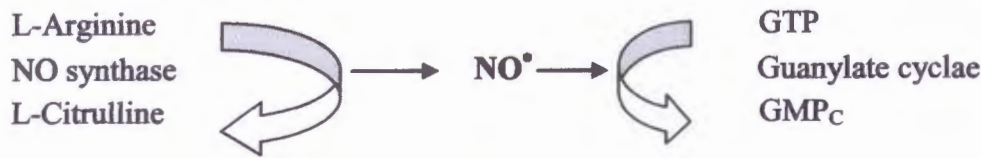
#### II.1.3.2. Radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ )

Les radicaux  $OH^{\bullet}$ , sont les radicaux libres les plus toxiques en biologie et les plus réactifs, capables de réagir avec un très grand nombre de cibles moléculaires in vivo (DELATTRE et al., 2003; BORG et REEBER, 2004). Ils sont les plus dommageables du stress oxydant, tandis que les radicaux superoxydes (GARDES-ALBERT et al., 2003). Ne diffusent pas et réagissent sur le lieu même de leur production, avec des constantes de vitesse très élevées. Ils peuvent ainsi oxyder des acides aminés, produire des coupures des brins d'ADN et des modifications des bases puriques et pyrimidiques, et attaquer des lipides au niveau des membranes et des lipoprotéines (DELATTRE et al., 2003).

#### II.1.2.3. Radicale monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ )

Selon DELATTRE et al. (2003), le monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique) est un radical libre ubiquitaire synthétisé à partir de l'arginine grâce à l'action d'enzymes appelées NO synthases, selon le schéma suivant :





#### II.1.3.4. Le radical peroxyde ROO•

Le radical RO<sub>2</sub>• est issu de l'addition d'O<sub>2</sub> sur des radicaux libres carbonés R• précédemment formés. Il est, en particulier, au cœur du processus de peroxydation lipidique qui dégrade les membranes biologiques (DELATTRE et al., 2005).

#### II.1.4. Origine et régulation des espèces réactives de l'oxygène in vivo

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons, réaction (1) conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présents dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale (DELATTRE et al., 2003 ; GARDES-ALBERT et al., 2003).



Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subit une réduction mono électronique (addition d'un seul électron, réaction (2) conduisant à la formation du radical superoxyde O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) (CADENAS et DAVIES, 2000 GARDES-ALBERT et al., 2003 ).



De même, la NADH-déshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales, peuvent conduire à la formation de radicaux O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> (GRIENGLING et al., 2000).

Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits (FMNH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1999).

L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ainsi formée n'est pas elle-même un radical libre mais une molécule (ayant tous ses électrons périphériques appariés). Sa production



peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène (réaction (3) en présence d'oxydases qui se trouvent principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxysomes. Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines, avec production simultanée de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (GARDES-ALBERT et al., 2003).



L'eau oxygénée est un intermédiaire réduit de l'oxygène qui est relativement toxique. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxysomes) et les glutathion peroxydases (essentiellement localisées dans le cytosol). La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau (réaction (4), tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique, symbolisé ici par GSH) par l'eau oxygénée (réaction (5) (GARDES-ALBERT et al., 2003).



D'abord nous allons envisager le mode de formation in vivo et la réactivité des radicaux superoxydes, des radicaux hydroxyles, du monoxyde d'azote et des composés oxygénés non radicalaires. Les principales sources cellulaires d'espèces activées de l'oxygène sont représentées à la figure 08 (DELATTRE et al., 2003).

### II.1.5. Les cibles des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (FAVIER, 2003).

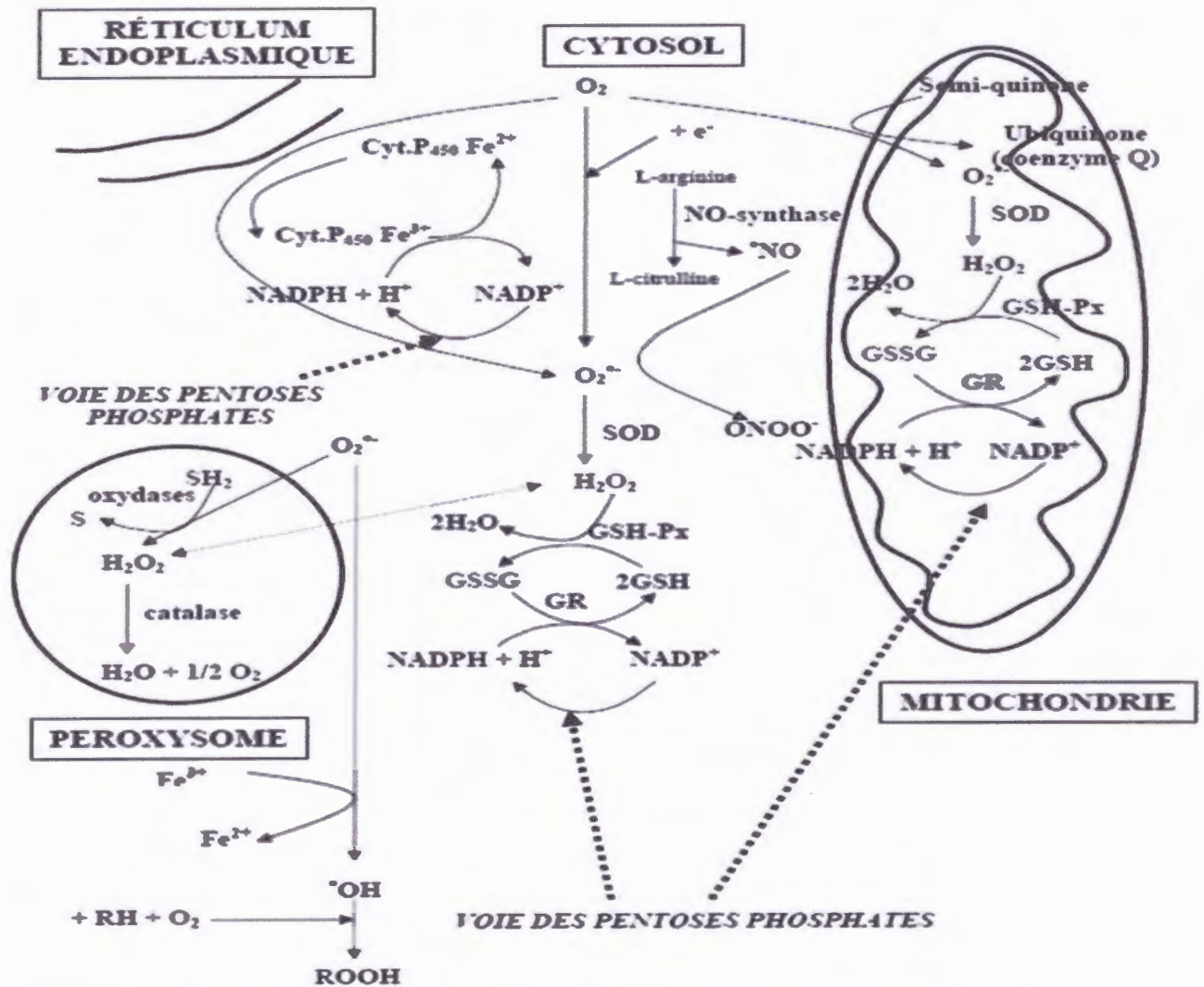


Figure 09 : Les principales sources cellulaires des espèces oxygénées réactives (DELATTRE et al., 2003).

### II.1.5.1. Les lipides

Les 2 principales cibles lipidiques des RLO (OH<sup>•</sup> surtout) sont les acides gras polyinsaturés (AGPI) présents dans les phospholipides et le cholestérol. Comme ce sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines, on comprend que ces derniers soient particulièrement vulnérables. Les produits d'oxydation formés peuvent participer, en tant que seconds messagers, à la régulation de fonction métabolique, de l'expression de gènes et de la prolifération cellulaire. (DELATTRE et al., 2005).

### 1.5.2. Oxydation des acides nucléiques

Les radicaux hydroxyles agissent directement sur l'ADN et oxydent certaines bases comme la guanine qui est transformée en 8 hydroxy-desoxyguanosine ou la desoxycytosine en 5 hydroxy-desoxyguanosine. Il peut également y avoir addition de groupements carbonyles appelé adduits. Le

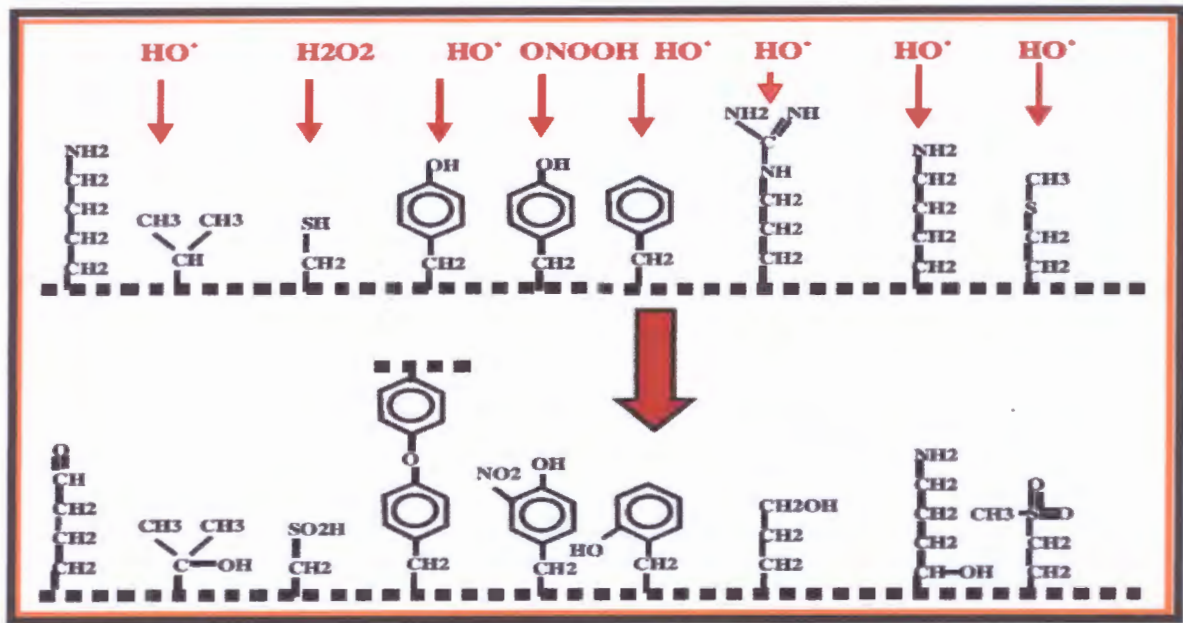


stress oxydant à également des répercussions sur L'ADN mitochondrial, en particulier si la proportion de glutathion oxydé est important. Par ailleurs le peroxyde d'hydrogène peut provoquer la dégradation du RNA mitochondrial (BORG et REEBER, 2008).

### II.1.5. 3. Les protéines

Selon DELATTRE et al. (2005), les acides aminés des protéines sont la cible des Radicaux Libre Oxygénée (RLO) (figure 10):

- Soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydation.
- Soit au niveau de la liaison peptidique, entrainant la fragmentation de la chaîne.



**Figure 10:** Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (FAVIER, 2003).

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées (FAVIER, 2003).

Donc l'action des ces radicaux libres porte sur les chaînes latérales de certains acides aminés (BORG et REEBER, 2008), comme les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine), basiques (arginine, histidine, lysine) et aromatique (phénylalanine, tryptophane et tyrosine) (DELATTRE et al., 2003).



Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (FAVIER, 2003).

## II.1.6 Antioxydants et systèmes de défense

### II.1.6.1. Définition d'un antioxydant

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (SHIMIZU, 2004).

### II.1.6.2. Systèmes de défense

#### II.1.6.2.1. Systèmes enzymatiques

##### **Superoxydedismutase (SOD) :**

Le superoxydedismutase (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en molécules de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène (BEAUDEUX et DURNAD, 2008), Il existe plusieurs types de SOD qui diffèrent par leur structure et leur localisation cellulaire: le SOD à cuivre et à zinc (Cu, Zn-SOD), le SOD à manganèse (Mn-SOD) et le SOD à fer (Fe-SOD) (DELATTRE et al., 2003).

SOD



##### **Catalase :**

Selon DELATTRE et al., (2003) et BEAUDEUX et DURNAD, (2008), la catalase est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les hématies.

Catalase



### ✚ La glutathion peroxydase (GPx) :

Les peroxydases sont des enzymes capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (DELATTRE et al., 2003). L'ensemble glutathion peroxydase (GPx) catalysent la réduction des hydroperoxydes minéraux (le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou organique (hydroperoxydes lipidiques) en molécule d'eau ou alcool coupée à l'oxydation d'un substrat comportant une fonction thiol (glutathion) (BEAUDEUX et DURNAD, 2000).

#### II.1.6.2.2. Systèmes non enzymatiques

Ces systèmes antioxydants comportent des composés synthétisés in vivo, tels que la bilirubine, les hormones sexuelles, la mélatonine, l'acide lipoïque, la coenzyme Q, l'acide urique, etc., et des composés apportés par l'alimentation, comme l'acide ascorbique (vitamine C), l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), les caroténoïdes ou les polyphénols. Il est également possible de classer ces systèmes antioxydants selon qu'ils sont hydrosolubles, assurant une protection des milieux intra et extracellulaire, ou liposolubles, agissant alors au niveau des membranes et des lipoprotéines circulantes (DELATTRE et al., 2003).

### ✚ $\beta$ -carotène

$\beta$ -carotène appartient à la grande famille des caroténoïdes, constituée de plus de 600 pigments identifiés dans de nombreux fruits et légumes, dotés de propriétés antioxydantes. Le carotène est notamment capable de piéger les radicaux hydroxyles (OH<sup>•</sup>) et peroxydes (RO<sup>•</sup><sub>2</sub>), et ainsi d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, il neutralise également l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1999).

### ✚ Vitamine C:

L'acide ascorbique est un composé réducteur qui agit en synergie avec l' $\alpha$ -tocophérol en permettant sa régénération, lui-même étant ensuite régénéré par une NADH réductase (DELATTRE et al., 2003). L'administration médicamenteuse à doses faibles de la vitamine C, en favorisant l'assimilation du fer sous sa forme la plus réactive, contribue à la genèse de RLO (GOUSSARD, 1999).

### ✚ Vitamine E

L'action de la vitamine E est consistée en un piégeage des radicaux peroxyde RO<sup>•</sup><sub>2</sub> issus de la peroxydation lipidique et capable d'auto-entretenir cette peroxydation lipidique et capable d'auto-entretenir cette peroxydation par une réaction en chaîne.





## ✚ Les polyphénols

Les polyphénols sont des piègeurs de radicaux libres et des chélateurs d'ions métalliques, ce qui leur confère des propriétés anti-oxydantes plus ou moins importantes selon leur structure, parmi les quels les flavonoïdes (DELATTRE et al., 2003).

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales. Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol est le composé qui est le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes (PACKER et al., 1999).

Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu (LAUGHTON, 1989).

## II.2. Activité antibactérienne

### II.2.1. Généralité

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria (NAUCIEL et VILDE, 2005).

Les premières substances antimicrobiennes ont été découvertes il y a plus d'un siècle et elles se sont avérées d'une importance majeure pour contrer les maladies infectieuses. L'usage de ces substances est incontournable et essentiel, tant en médecine humaine que vétérinaire (CARBON et al., 1994).

### II.2. 2. Les principales substances antimicrobiennes

#### II.2. 2.1. Les antibiotiques

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi synthétique obtenue

par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant les propriétés suivantes :

- activité antibactérienne ;
- activité en milieu organique ;
- une bonne absorption et une bonne diffusion dans l'organisme.

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1995).

### II.2. 2.1.1. Classifications des antibiotiques

Selon ALANIS, 2005, il existe plusieurs classifications des antibiotiques, on peut les classer selon différents critères:

- la structure chimique,
- le mode d'action.
- l'action antibactérienne.

### II.2. 2.1.2. Les principaux modes d'action des antibiotiques

Les modes d'action sont notamment influencés par les différences structurales et métaboliques entre les cellules microbiennes et animales. Le tableau 2 donne la liste des cinq principaux modes d'action et présente les grandes familles chimiques d'antibiotiques associées à chacun d'eux (ARCHAMBAULT et BLOUIN, 2006).

**Tableau 02:** Principaux modes d'action des grandes familles d'antibactériens (ALANIS, 2005 ; ARCHAMBAULT et BLOUIN, 2006).

Mode d'action	Familles d'antibiotiques impliquées
Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.	$\beta$ -lactamines, glycopeptides (vancomycine) et polypeptides (bacitracine)
Inhibition de la synthèse ou du fonctionnement de la membrane plasmique.	Polymyxines
Inhibition de la synthèse des protéines.	Aminosides, tétracyclines, macrolides et lincosamides



Inhibition de la synthèse de l'acide nucléique (ADN).	Quinolones et certains ansamycines
Inhibition du métabolisme intermédiaire (acide folique, impliqué dans la synthèse des nucléotides).	Sulfamides, triméthoprime

### II.2. 2.2. Propriété antimicrobienne des composés phénoliques

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobiennes des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales (NATARAJAN et al., 2005; SACCHETTI *et al.*, 2005 ; MOROH, 2008 ; FAZELI et al., 2007 et KHLIFI et al., 2013).

Il a été rapporté que les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont possédé une activité antimicrobienne (INIESTA et al., 1990 ; IINUMA et al., 1994 ; HARAGUCHI et al., 1998 ; HARBONE et WILLIAMS 2000 ; TIM et al., 2005). Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique, et d'autres fonctions chimiques (HARBONE et WILLIAMS, 2000).

Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (ULANOWSKA et al., 2007).

## **Chapitre III : Espèces végétales étudiées**



### III-1-2-Espèces étudiées

#### III-1-2-1-*Achillea ligustica*

*Achillea ligustica* est une espèce dans le genre *Achillea* et fait partie de la famille des Asteraceae (Asteracées).

Elle est connue sous le nom vernaculaires français « *achillée de Liguri* » (PIETRI et ANGELIN, 1994). Et en arabe "الاحيلة", nom populaire local بلقيسوم.

Le nom du genre correspond au latin *achillea*, lui-même emprunté au grec *akhileios*, herbe d'achillé.



Photo 01 : *Achillea ligustica*

#### ➤ Description botanique

Plantes herbacées vivaces à feuilles alternes. Comme pour toutes les composées, ce qu'on appelle communément « fleur » est un capitule. Les capitules des achillées sont formés d'un disque de fleurs tubulées hermaphrodites entourées de fleurs ligulées femelles. Les ligules, presque toujours blanches, sont assez courtes, le plus souvent à trois dents. Très nombreux sur la plante, les capitules sont groupés en inflorescences appelées corymbes. Les fruits sont des akènes (QUEZEL et SANTA, 1963).

#### ➤ Composition chimique

*Achillea ligustica* est riche en substances pharmacologique et même à des teneurs très élevés telle que :

l'huile essentielle qui contient du camphre ( 21,3% ) , l'alcool santoline ( 19,3% ) , l'arnoise cétone ( 5,9% ) , le bornéol ( 6,2%) et acétate de bornyle (3,5% ) comme étant les principaux constituants (BADER et al., 2007).

Elle contient des terpènes, des alcaloïdes, des tannins, des saponines, des coumarines, des steroles, des vitamines, des acides et des acides gras.

Les composés phénoliques, tels que les coumarines, les tanins et les flavonoïdes qui constituent l'un des groupes les plus importants de principes pharmacologique actives dans l'achillée (LAROUSSE, 2002 ; TUBEROSO et al., 2009 ; TRUMBECKAITE et al., 2013).

#### ➤ Utilisation

Dans la médecine traditionnelle sicilienne, les feuilles fraîches de *A. ligustica* sont utilisés comme antimicrobien (contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Fusariumoxysporum*, *Rhizoctoniasolani*, *Penicillium commune* et *Aspergillus flavus*) et hémostatique ou ingestion sous forme de pastilles contre les maux d'estomac. Une infusion est utilisée en Sardaigne pour gastralgies et les névralgies. Études ethnopharmacologiques rapportent l'utilisation de la sève obtenue à partir de la plante fraîche comme vermifuge ; la perfusion est également utilisée comme cataplasme contre les troubles de peau et les rhumatismes (BADER et al., 2007). Les feuilles fraîches que l'on frotte et que l'on applique sur la piqure de guêpe pour ne pas enfler (FAZI et FURT, 2011).

#### III-1-2-2- *Ruta chalepensis*

*Ruta chalepensis* est une plante aromatique médicinale qui appartient à la famille des Rutacées. C'est une espèce méditerranéenne, relativement commune dans toute l'Algérie septentrionale, au nord-est de l'Afrique, sud de l'Europe et le sud-ouest de l'Asie (MIOULANE, 2004 in Attou, 2011).

Elle est connue sous le nom vernaculaires français « Rue d'Alep ou Rue » (RAMEAU et al., 2008). Et en arabe Fejel, Fijel, Fijla, fidjel, Fidjla (QUEZEL et SANTA, 1963). Appelée aussi rue-officinale, rue-puante, rue fétide, rue des jardins, Herbe à la belle-fille, Rue des murailles selon BONNIER, (1999). (Attou, 2011).

La rue est citée aussi sous le terme de سذاب *sadzab* par ABDULBASSET et ABDE TAWAB (2008), elle est aussi dite en berbère : اوري *ouermi*, Issel, Issin (BABA AISSA, 1999). D'autres noms sont indiqués par DUKE et al. 2008 : *Al Shathap* (الشذاب), *Bou Ghans*, en grec : Pigam, zent ( Attou, 2011).





**Photo 2 : *Ruta chalepensis***

#### ➤ Description botanique

La rue d'Alep est une plante herbacée à tige ligneuse à la base, pouvant atteindre 1 m (BABA AISSA, 1999 in ATTOU, 2011). Les feuilles de 6 à 12 cm de long, sont aromatiques, ovales, larges, pennatiséquées, bleu-vert, et dégageant une odeur peu agréable, elles présentent de nombreux lobes oblongs, lancéolés ou obovales. En été, s'épanouissent des fleurs de 1 à 2 cm de diamètre, en coupe, de couleur jaune foncé.

Son nom *Ruta* vient du grec ou il désigne déjà la plante 'rhyté' qui signifie sauver, prévenir ou de reô qui signifie qui coule faisant certainement référence à leurs vertus emménagogues et *chalepensis* pour préciser son origine syrienne plus précisément d'Alep (DOERPER, 2008) (ATTOU, 2011).

Ce genre ne comprend que 8 espèces de vivaces ou sous-arbrisseaux tous originaires du pourtour du bassin méditerranéen et de l'Asie du sud-ouest (MIOULANE, 2004). En Algérie, il est représenté par 4 espèces : *R. montana* L., *R. chalepensis* L., *R. angustifolia* P. et *R. latifolia* L., ces espèces diffèrent entre elles par l'allure des feuilles, de la grappe fructifère, des bractées et des sépales (BABA AISSA, 1999) (ATTOU, 2011).

#### ➤ Composition chimique

*Rutachalepensis* est riche en substances pharmacologique et même à des teneuses très élevés telle que :

- les alcaloïdes (0.4- 1.4%), (FOSTER et TYLER, 1999 in ATTOU, 2011).
- Huile volatile (0.2-0.4%) (FLEMING et al., 2000), les plus rencontrés sont le 2-nonanone et le 2-undecanone (MEJRI et al., 2010, MERGHACHE et al., 2009 in ATTOU, 2011).

- Les flavonoïdes dont le composant majoritaire est la rutine (2-5%) (FLEMING et al., 2000 in ATTOU, 2011).
- Les coumarines (MILESI et al., 2001), essentiellement Hydroxy-coumarines, Furo-coumarines et Pyrano-coumarines (FLEMING et al., 2000 in ATTOU, 2011).

➤ **Utilisation**

La rue est très utilisée à des fins diverses : Fébrifuge, antivenimeux local, contre les nausées et les vomissements, dans les constipations, dans le paludisme, pour soigner les anémies, le rhumatisme, contre les douleurs gastriques, les vers intestinaux, dans les accouchements difficiles, les maux des yeux et des oreilles, dans l'asthme, les névroses, Abortif, analgésique, anti fertilité, anti-inflammatoire, antiseptique (contre : *Bacillus*, *Candida*, *Escherichia*, *Microsporium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*), antispasmodique, aphrodisiaque, arachnifuge, bactéricide, candidicide, cardiotonique, decongestant, digestive, émétique, embryotoxique, emménagogue, fébrifuge, immunomodulateur, insectifuge, molluscicide, sédative, stomachique, sudorifique, vermifuge, vulnéraire, antipyrétique, antiparasitaire, antihelminthique, hypotensive par un effet direct sur le système cardiovasculaire (MERAD CHIALI, 1973; KONG et al., 1989; CHIU et FUNG, 1997; BABA AISSA, 1999; FOSTER et TYLER, 1999; GUTIERREZ-PAJARES et al., 2003; DUKE et al., 2008). (ATTOU, 2011)



# **Partie II :**

## **Partie expérimentale**



# Chapitre IV : Matériel et Méthodes





## IV.1. Matériel végétal

### IV.1.1. Echantillonnage

Les feuilles des deux plantes choisies pour notre étude (*Achillea ligustica* ALL. et *Ruta Chalepensis* L.) ont été récoltées d'une manière aléatoire, au mois d'Avril de l'année 2016, dans la région de Bordj T'har, commune de la wilaya de Jijel, située à environ 50 km au sud-est du chef lieu de Jijel (Figure 11).



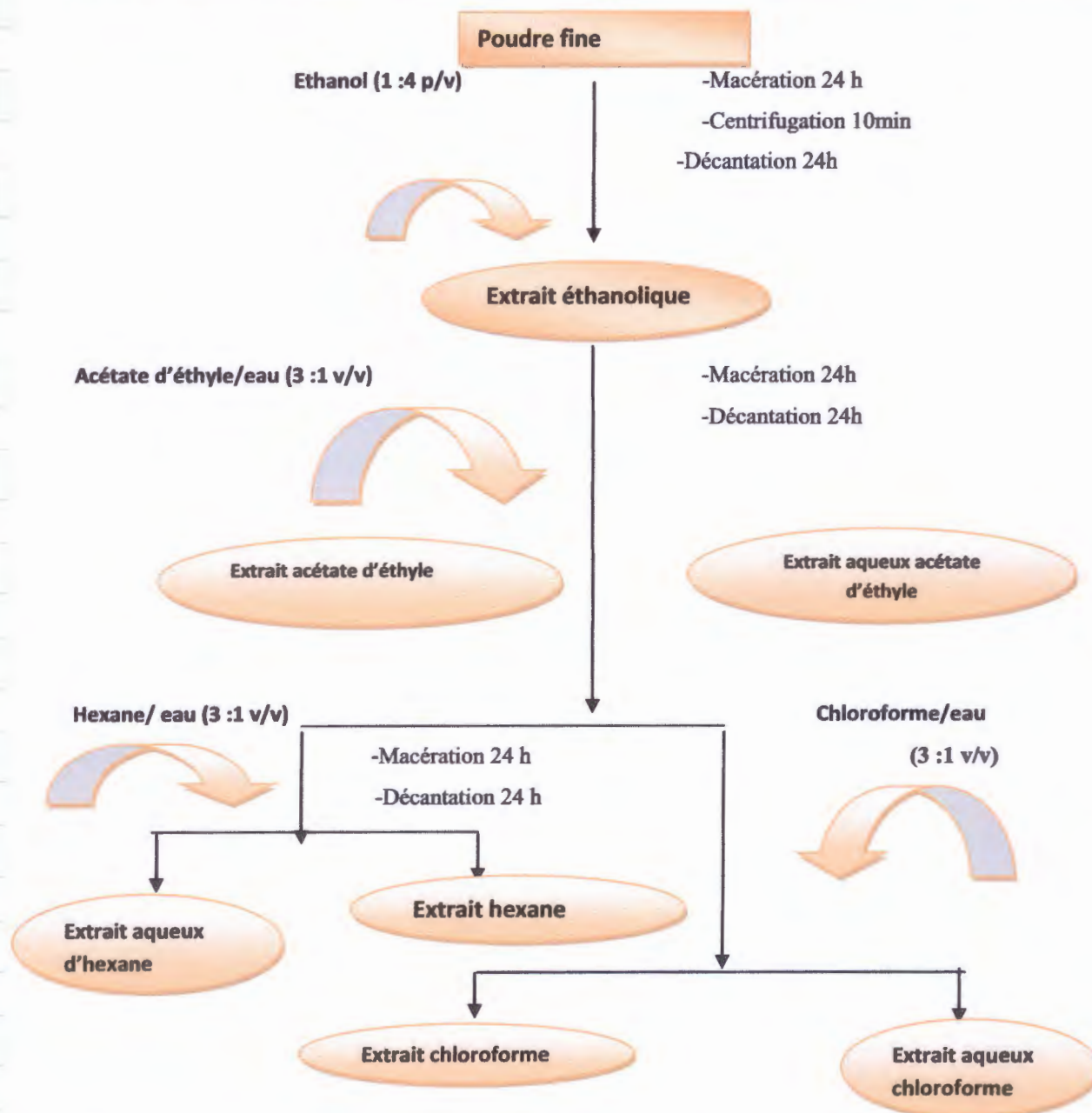
Figure 11 : Carte de situation géographique de la région de Borj T'har

### IV.1.2. Séchage, broyage et tamisage

Après la récolte, tous les échantillons ont été séchés à l'air libre et à l'abri de la lumière jusqu'à la stabilisation complète de leurs poids. Après séchage, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un moulin électrique, puis tamisées dans le but d'obtenir une poudre très fine (d'un diamètre de 250  $\mu\text{m}$ ) afin d'optimiser l'extraction des composés phytochimiques.

## IV.2. Extraction

Dans cette étude, une extraction sélective à plusieurs solvants a été réalisée faite selon le protocole de CHIANG et al., (1994), avec quelques modifications. Le but de cette extraction est de pouvoir séparer les composés phénoliques en diverses phases, selon leurs polarités en fonction de la nature du solvant utilisé. L'extraction débute par l'éthanol afin d'extraire le maximum de composés phénoliques. Le protocole d'extraction des composés phénoliques est schématisé dans la figure 12.



**Figure 12:** Schéma récapitulatif des étapes suivies pour la préparation des extraits.

La première étape de l'extraction des composés phénoliques est la macération de la poudre fine dans de l'éthanol 95% avec un rapport masse /volume de 1 :4 (P : V) pendant 24h. Par la suite, une agitation pendant 2 H, suivie d'une décantation de 24h, donnant naissance à deux phases bien distinctes dont le surnageant représente l'extrait éthanolique. Ce dernier est versé dans des cristallisoirs et soumis à un séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière, jusqu' à stabilisation complète de son poids sec.

La deuxième étape de l'extraction est la macération de l'extrait éthanolique, dans un mélange d'acétate d'éthyle/eau avec un rapport volumique de 3:1 (V:V). Après 24h de macération, la décantation suivante a donné naissance à deux phases non miscibles (une phase aqueuse et une



phase organique d'acétate d'éthyle). Ces dernières ont été séparées et laissées sécher dans les mêmes conditions précédemment citées.

La troisième et dernière étape de l'extraction est la macération d'une partie de l'extrait organique d'acétate d'éthyle, qui est divisé en deux parties: une est transférée dans un mélange hexane /eau et l'autre dans un mélange chloroforme/eau, avec un rapport volumique de 3 :1 (V:V). Après 24h de macération, suivie d'une décantation, les quatre phases résultantes ont été séparées et laissées sécher jusqu'à stabilisation complète de leur poids sec.

### IV.3. Calcul du rendement en extraits secs

Le taux d'extraction de chaque étape est calculé par la formule suivante:

$$\text{Taux d'extraction(\%)} = [(P_1 - P_0) / E] \times 100.$$

$P_1$ : Poids de l'extrait après évaporation.

$P_0$ : Poids initial du cristalliseur ou de la boîte de Pétri.

$E$ : Poids de l'échantillon initial (Poudre ou extrait sec de la phase précédente).

### IV.4. Dosage des composés phénoliques

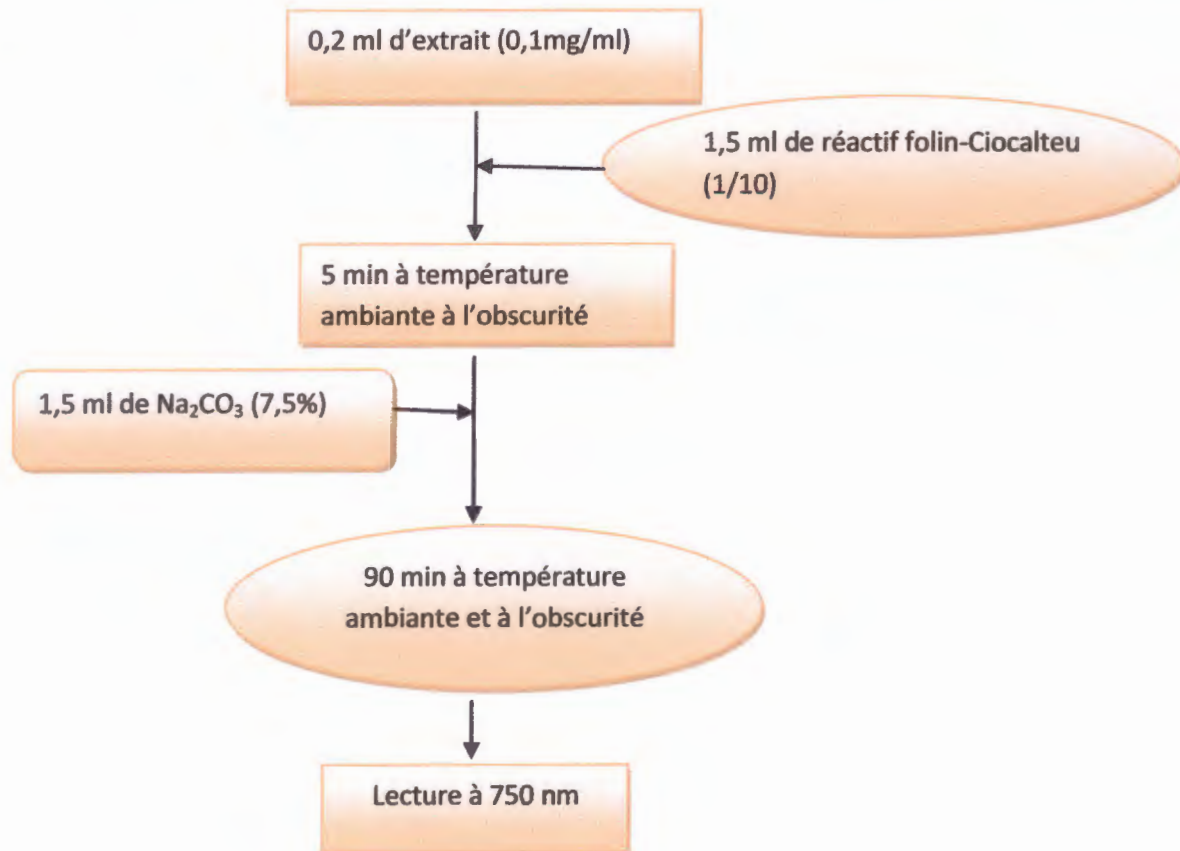
#### IV.4.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm (Ribereau-Gayon et al., 1982).

Le taux de composés phénoliques des deux extraits a été estimé par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la procédure d'Othman et ses collaborateurs (2007) avec quelques modifications. Le mode opératoire est schématisé dans la figure 13.

La concentration en polyphénols a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (figure 1, annexe1).

La teneur moyenne en polyphénols est exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mgEq AG/g d'extrait).



**Figure 13 :** Protocole de dosage des polyphénols totaux

#### IV.4.2. Dosage des polyphénols polaires :

La méthode utilisée est celle rapportée par **Owen et Johns (1999)**. Le mode opératoire est schématisé sur la **figure 14**.

La concentration en polyphénols polaires a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (**figure 2, annexe 1**).

La teneur moyenne en polyphénols polaires est exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mgEq AG/g d'extrait).

#### IV.4.3. Détermination des polyphénols apolaires :

La quantité de polyphénols apolaires contenus dans les extraits de plantes est obtenue par soustraction du taux de polyphénols polaires de celui des polyphénols totaux :

$$T_{ap} = T_t - T_p$$

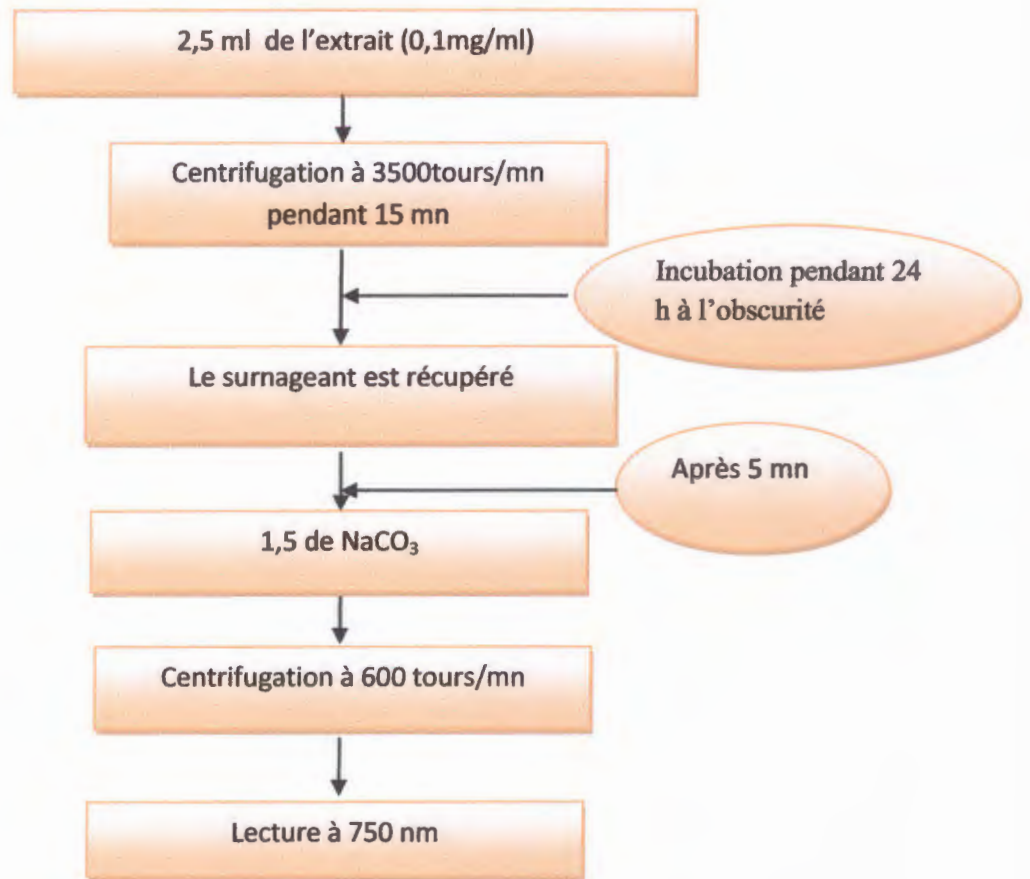
Où :

**T<sub>ap</sub>** : Taux de polyphénols apolaires.



**Tt** : Taux de polyphénols totaux.

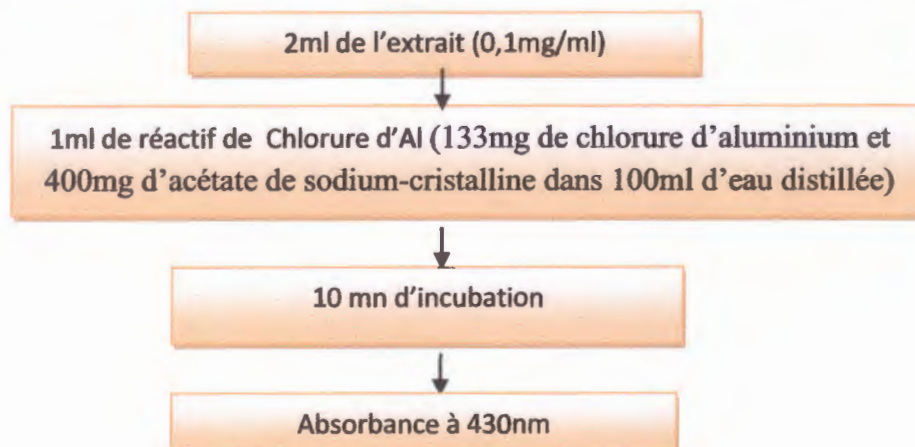
**Tp** : Taux de polyphénols polaires.



**Figure 14** : Protocole de dosage des polyphénols polaires

#### IV.4.4. Dosage des flavonoïdes:

Les flavonoïdes sont déterminés par la méthode de chlorure d'aluminium décrite par **Maksimovié et ses collaborateurs (2004)**. Le protocole est présenté dans la **figure 15**.

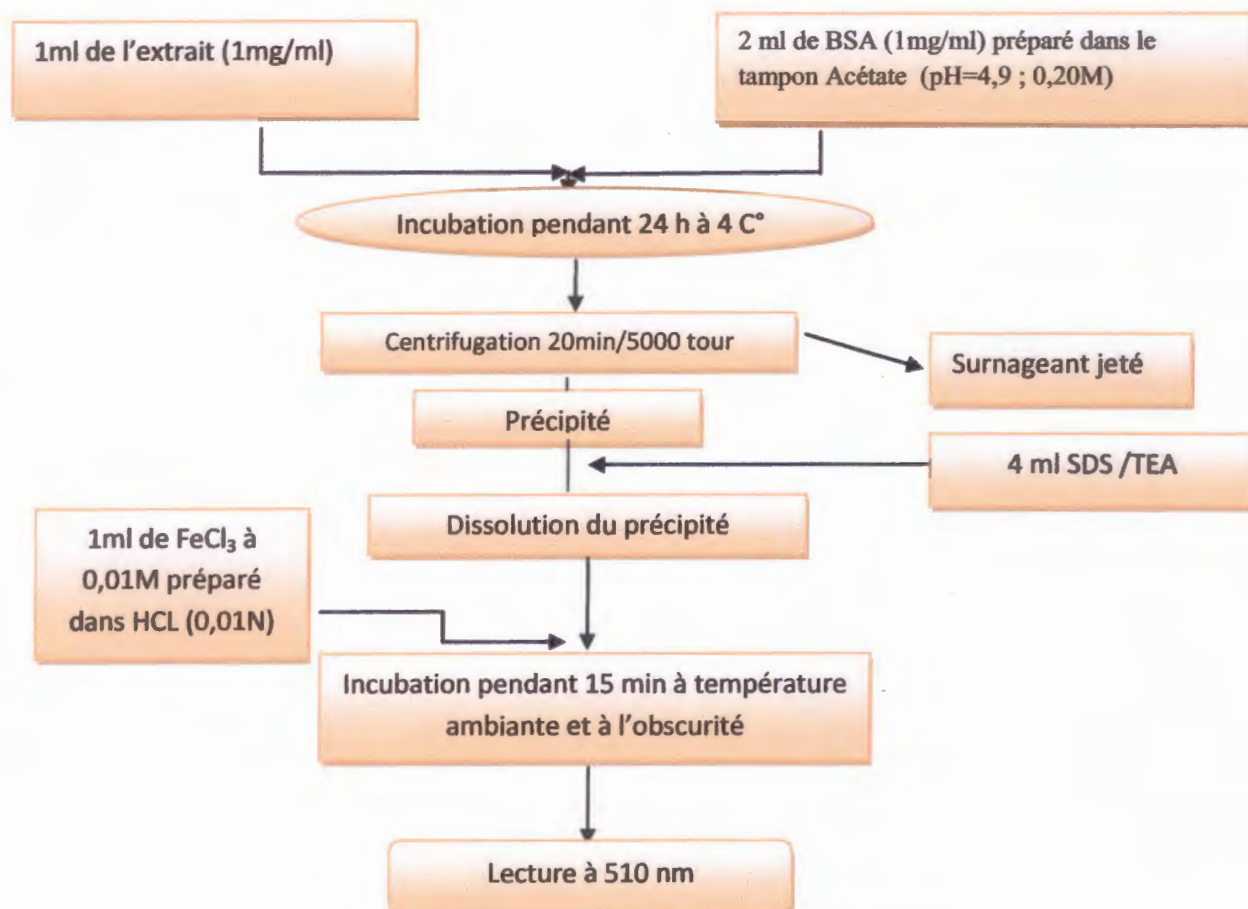


**Figure 15**: Protocole de dosage des flavonoïdes

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la Quercetine (**figure3, annexe1**) et sont exprimés en mg équivalent Quercetine/g d'extrait (mg Eq Q/g d'extrait).

#### IV.4.5. Dosage des tannins :

Les tannins sont déterminés par la méthode décrite par d'Hagerman et Butler (1978). Le protocole est présenté dans la **figure 16**.



**Figure 16** : Protocole du dosage des tannins.

En se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide tannique (**figure 4, annexe1**), les concentrations sont exprimées en mg équivalent d'acide tannique par g d'extrait (mg Eq AT/g d'extrait).

#### IV.5. Evaluation de l'activité biologique des différents extraits :

##### IV.5.1. Activité antioxydante :

Les méthodes évaluant l'activité antioxydante ont connu un intérêt important vue la recherche des substances antioxydantes naturelles.



Les activités étudiées dans le présent travail sont le pouvoir réducteur, le pouvoir antiradicalaire de DPPH°.

#### IV.5.1.1. Pouvoir réducteur :

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique en fer ferreux en présence d'un agent chromogène, le ferricyanure de potassium  $[K_3Fe(CN)_6]$  et de l'acide trichloracétique (milieu acide) (GULÇIN *et al.*, 2005).

La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait.

Le pouvoir réducteur des extraits de plantes est déterminé selon la méthode décrite par KARAGOZLER *et al.* (2008). Le protocole est présenté dans la figure 17.

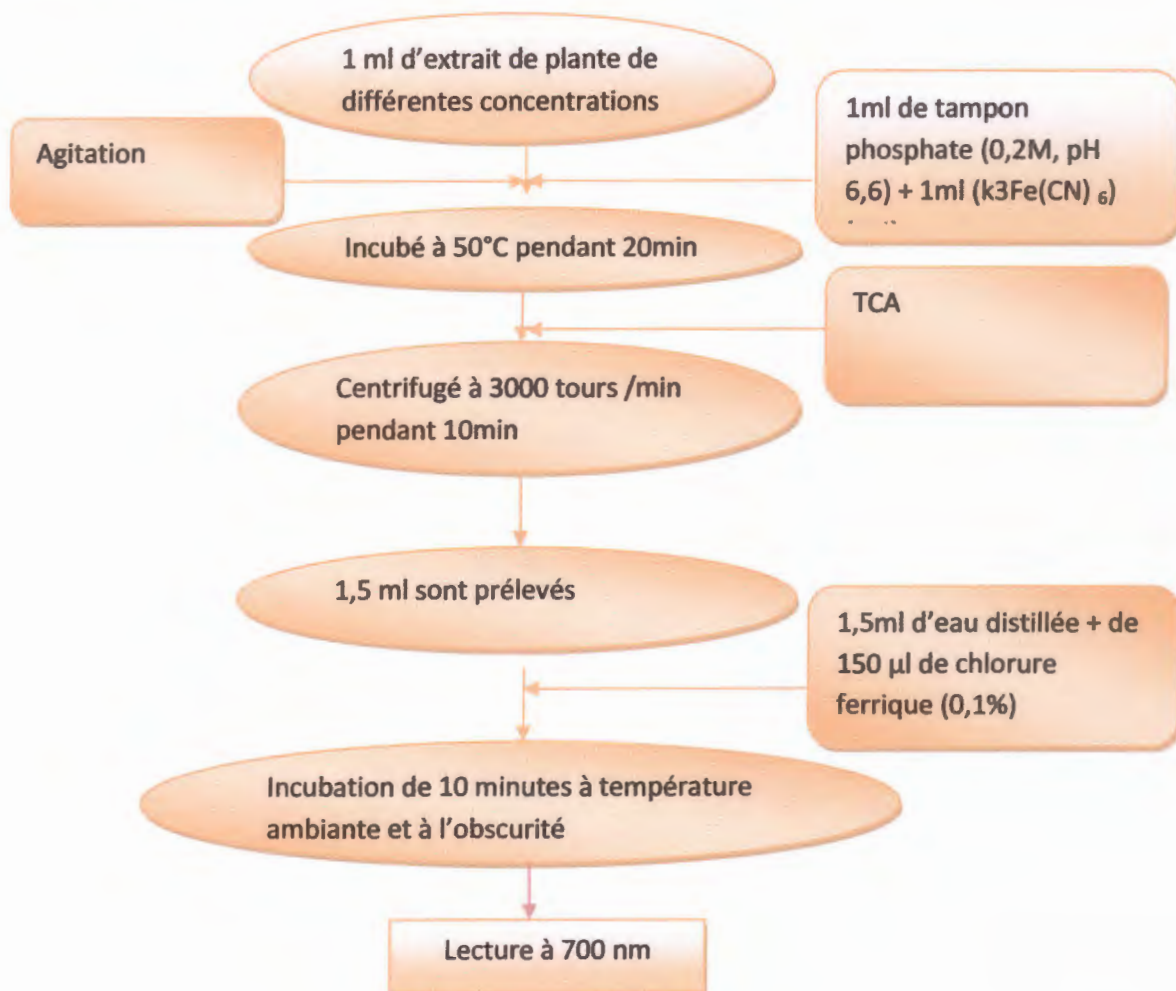
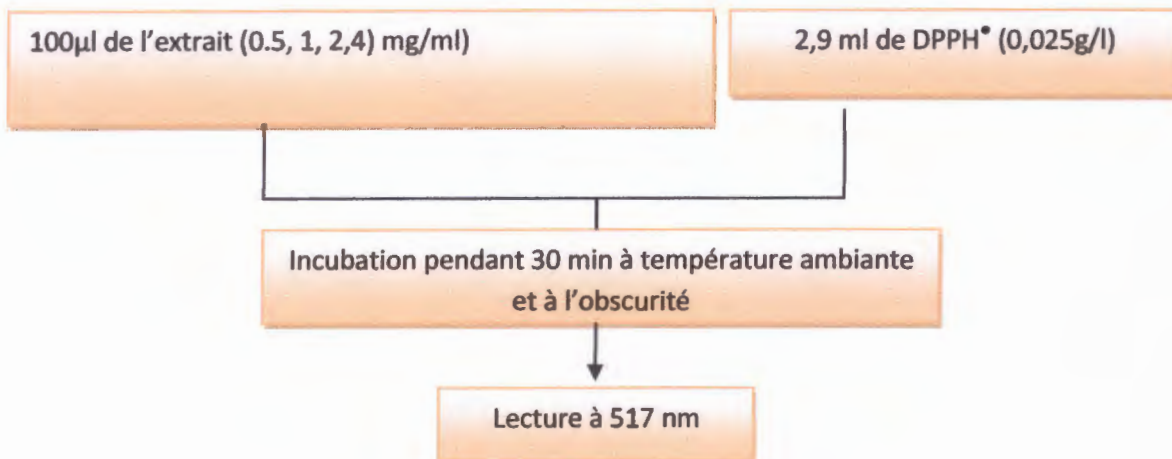


Figure 17 : Protocole du pouvoir réducteur

#### IV.5.1.2. Effet scavenger du radical DPPH<sup>•</sup>

L'effet scavenger du radical DPPH<sup>•</sup> des extraits, ainsi que les standards est estimé selon la méthode de Brand Williams et al. (1995) décrite par Ba et ses collaborateurs (2010). Le protocole d'évaluation du pouvoir anti-radicalaire est illustré par la figure suivante.



**Figure 18:** Protocole d'étude de l'activité anti-radicalaire.

Le pourcentage de réduction du radical DPPH<sup>•</sup> est donné par l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de réduction du DPPH} = [(A_t - A_e)/A_t] \times 100$$

$A_t$  : Absorbance du témoin ;

$A_e$  : Absorbance de l'échantillon

#### IV.5.2. Activité antibactérienne

##### IV.5.2.1 Choix des bactéries

Les germes qui ont été testés pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des extraits d'*Achillea Ligustica* et *Ruta chalepensis* sont les suivants :

Trois souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) :

- *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram négative).
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positive).
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram négative).

Une souche clinique isolée de patients hospitalisés (à l'hôpital de Jijel):

- *Klebsiella pneumoniae*



#### IV.5.2.2. Description des bactéries étudiées

##### -*Escherichia coli*

*Escherichia coli* est un bacille à gram négatif (PATRICK et al., 1988 in BOUMEDIENE et AGHA, 2014), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$  (STEVEN et al., 2004 in BOUMEDIENE et AGHA, 2014).

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (PATRICK et al., 1988 in BOUMEDIENE et AGHA, 2014).

##### -*Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1  $\mu\text{m}$ . Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (PATRICK et al., 1988 in BOUMEDIENE et AGHA, 2014). Elle représente la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée (STEVEN et al., 2004 in BOUMEDIENE et AGHA, 2014).

##### -*Pseudomonas aeruginosa*

Ce sont des bacilles Gram négatif, constituées de bacilles de 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1,5 à 3,0  $\mu\text{m}$  de longueur, aérobies, asporulées très mobiles par un ou plusieurs flagelles polaires. Il s'agit de bactéries d'altération ou pathogène (parfois même redoutable est mortelle) (MANN et al., 2000). Se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature monotriche (quelques rares cellules portent cependant plusieurs flagelles polaires). *P. aeruginosa* ou bacille pyocyanique exprime un pigment vert nommé pyocyanine (EUZEBY, 2008).

##### -*Klebsiella pneumoniae*

Les *Klebsiella* sont des saprophytes du tube digestif et des voies aériennes supérieures qui peuvent être également rencontrées dans la nature. Le biotype le plus souvent rencontré est *Klebsiella pneumoniae*, encore appelé pneumobacille de Friedländer. Ce sont des bacilles



immobiles, souvent encapsulés qui vont fermenter la plupart des hydrates de carbone avec production abondante de gaz (SCHUMACHER et al., 2000).

#### IV.5.2.3. Préparations des précultures

Les souches bactériennes à tester (*Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*) ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive et incubées à l'étuve pendant 24 heures à 37°C afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.

#### IV.5.2.4. Préparations des suspensions bactériennes

A l'aide d'une pipette pasteur, nous avons prélevé quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et ont été mises dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% de sel (NaCl). La suspension bactérienne est bien homogénéisée et à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml. Les concentrations des inocula sont évaluées et exprimées par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm (des suspensions microbiennes d'une densité optique de 1 McFarland).

#### IV.5.2.5. Méthode d'étude du pouvoir antibactérien des extraits

La méthode employée pour l'évaluation de l'effet antibactérien des différents extraits est la méthode de diffusion sur disque : **Aromatogramme**

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion inespérée d'une vieille, méthode de datant de (Pibiri, 2005 in GUERIN et CARRET, 1999), l'aromatogramme consiste à :

✓ **une préparation des disques**

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman, avec un diamètre de 6 mm. A l'aide d'un perforateur. Ensuite, ces disques sont placés dans un tube à essais et stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante dans un tube à essai hermétiquement fermé.

✓ **une préparation des boîtes de pétri**

La gélose de Muller-Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles. L'épaisseur de la gélose est de 4-5mm répartie uniformément dans les boîtes, ces dernières sont placées à côté du bec bunsen jusqu'à solidification de la gélose.

✓ **un ensemencement des souches :**

L'ensemencement est effectué par des cotons tiges, à partir de suspension fraîchement préparée. Il consiste à tremper un coton tige stérile dans la suspension puis le frotter pour l'étaler sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution uniforme de la suspension.

Pour chaque souche le test est répété 2 fois.

✓ **un dépôt des disques**

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques du papier Wattman imbibé par 10µl de l'extrait éthanolique des deux plantes à différentes concentrations (5-6 disques par boîtes) sont déposés sur la gélose, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi. Les boîtes sont maintenues à 4C° pendant 1 heure pour assurer une bonne diffusion de l'extrait dans la gélose (**annexe2, figure2**).

✓ **une incubation des boîtes**

Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve pendant 17-24h à 37C°.

✓ **une lecture**

La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres d'inhibitions autour des disques.

#### **IV.6. Analyse statistique**

Deux essais ont été effectués pour chaque test. Les moyennes et les écarts types ont été calculés par l'Excel.

Le test de la corrélation nous permet de compléter l'interprétation et d'établir les liens existants entre les différents paramètres.



# Chapitre V : Résultats et discussion



### V.1. Le taux d'extraction

La méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction. Dans le but d'optimiser l'extraction, le broyage et le tamisage ont été réalisés pour pouvoir récupérer la poudre la plus fine possible.

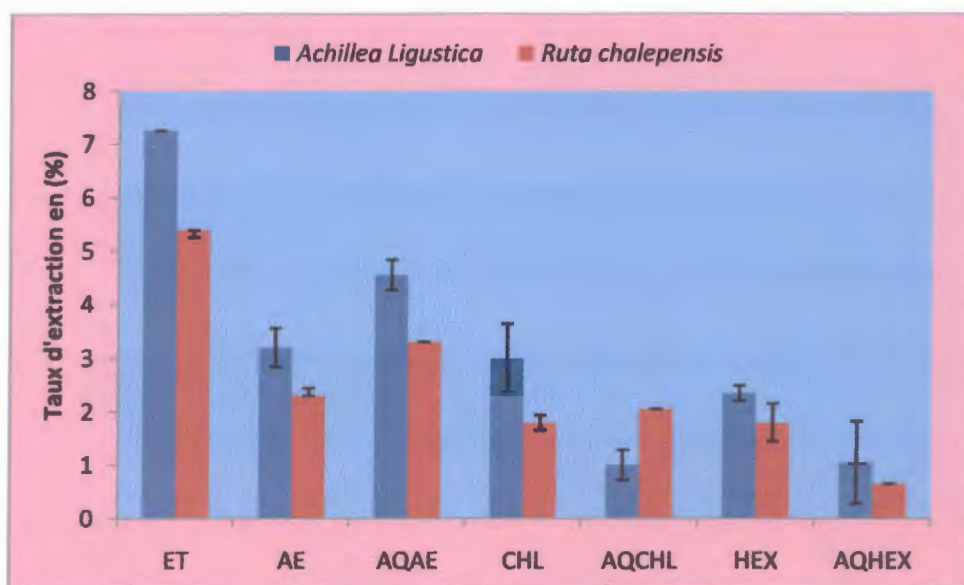


Figure 19 : Taux d'extraction des deux plantes étudiées.

ET : Éthanol, AE : Acétate d'éthyle, AQAE : Aqueux Acétate d'éthyle, CHL : Chloroforme, AQCHL : Aqueux Chloroforme, HEX : Hexane et AQHEX : Aqueux Hexane.

Les taux d'extraction sont représentés par la figure 19. Les rendements en extraits sont variables selon le solvant et la plante. En effet, les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique représente un taux d'extraction plus élevé pour les deux plantes (*A. ligustica* 7.25% et *R. chalepensis* 5.4%) par rapport aux autres extraits étudiés, alors que l'extrait aqueux d'hexane représente le taux le plus faible pour les deux plantes (*A. ligustica* 1.05% et *R. chalepensis* 0.65%).

Selon une étude menée par MANSOUR et ses collaborateurs (1990) sur *Ruta chalepensis*, le rendement en extrait brut de la partie aérienne entière est de 3.75%. Rendement nettement inférieure à celui obtenu dans notre étude (5.4%).

Aussi, les travaux de BOUDJOURAF (2011) travaillant sur l'extrait Ethanolique, Acétate d'éthyle, Chloroforme d'*Artimisia campestris* appartenant à la même famille d'*Achillea Ligustica*, ont trouvé un taux de 3.4%, 2.66%, 0.48%) ces résultats sont toujours faibles par rapport à nos résultats (7.25%, 3.2%, 3%).



L'extraction de composés phénoliques d'un matériel végétal est influencée par la structure chimique de composé, le procédé d'extraction, la taille des particules constituant l'échantillon, le temps et les conditions de leur stockage (NACZK et SHAHIDI, 2004).

Le solvant est également un des paramètres qui peuvent affecter l'extraction de polyphénols (TROSZNSKA et al., 2002). L'extraction peut être effectuée par divers solvants tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol et l'acétone l'hexane...etc. Dans le cas contraire, les solvants aqueux donnent les meilleurs rendements d'extraction que les solvants absolus (SPIGNO et al., 2007), c'est le cas de notre étude ou on a remarqué qu'à partir de la deuxième étape de l'extraction, la majeure partie des composés de l'extrait éthanolique est passée dans la phase aqueuse d'acétate d'éthyle dont le taux d'extraction atteint une moyenne de 4,57 et 3,3% pour respectivement *A. ligustica* et *R. chalepensis*.

A partir de ces résultats on peut conclure que l'éthanol possède une polarité plus élevée que les autres solvants ce qui a conduit à un taux d'extraction plus important. L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de la poudre selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Selon la variabilité du taux d'extraction entre solvant d'extraction et phase (organique et aqueuse), on peut dire que les extraits des deux espèces contiennent des composés de polarités variables.

Le critère taux d'extraction n'est pas suffisant pour préconiser la richesse d'un extrait en composés phénoliques car les extraits de plantes contiennent d'autres pigments. Cet état de fait est montré dans l'étude de la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins discutés ci-dessous.

## **V.2. Dosage des composés phénoliques**

Les différents dosages opérés ont mis en certitude l'existence de polyphénols totaux, de polyphénols polaires, de polyphénols apolaires, de flavonoïdes et de tannins dans les extraits des deux plantes étudiées, toutefois avec des proportions variables.

### **V.2.1. Polyphénols totaux**

La quantification des polyphénols totaux a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y=ax+b$ ) réalisée par une solution étalon (acide gallique) à différentes concentrations (figure1, annexe1)

Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque extrait ont été rapportées en équivalent gramme d'acide gallique et déterminées par l'équation de type :  $y = 3.736x + 0.276$  sachant que  $r = 0,99$ . Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par un gramme d'extrait (mg EAG / g d'extrait).

Les résultats de dosages des polyphénols totaux dans les échantillons de plantes analysées sont reportés dans le **tableau 01 annexe1** et présentés dans la **figure 20**.



**Figure 20** : Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits des deux plantes étudiées.

Nous constatons que la teneur en polyphénols totaux varie selon l'espèce et les différents extraits, la meilleur teneur se trouve dans l'extrait éthanolique par une valeur de 377,810 mg EAG/g E pour *A. ligustica* et une valeur de 165,284 mg EAG/g E pour *R. chalepensis*. Tandis que la teneur la plus faible a été enregistrée dans l'extrait aqueux acétate d'éthyle pour les deux espèces *A. ligustica* et *R. chalepensis* avec 3,319 mg EAG/g E et 0,790 mg EAG/g E respectivement.

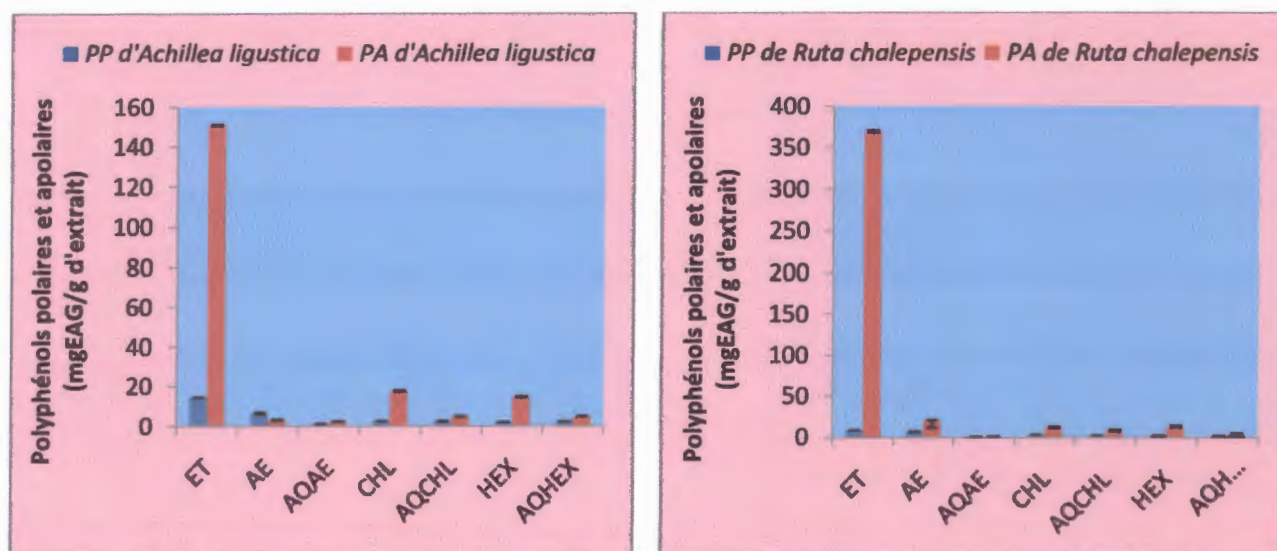
Aussi, si on compare nos résultats avec d'autres travaux, on remarque que la teneur en polyphénols totaux de l'extrait éthanolique de *R. chalepensis* est largement supérieure à celle trouvée par FAKHFAKH et al., (2012) (6.72 mg EAG/g EB éthanolique) et SELLOUM et al., (2013) (0,07 mg EAG/g EB).

Par manque de données concernant la teneur en polyphénols totaux d'*A. ligustica*, on a comparé avec une autre espèce *A. odorata* sur l'extrait brut éthanolique réalisé par BOUTENNOUN et al. (2014) et qui ont obtenu la teneur de 448.8 mg EAG/g EB, qui est supérieure à notre résultat (165,28 mg EAG/g EB).



### V.2.2. Polyphénols polaires et apolaires

La teneur des polyphénols polaires et apolaires de chaque extrait est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage (figure2, annexe1) et qui est exprimée en mg équivalent Quercetine par g d'extrait (mg EAG /g d'extrait). Les résultats relatifs aux Polyphénols polaires et apolaires sont reportés dans le tableau 02 annexe1 est représentés dans la figure 21.



**Figure 21:** Teneurs en polyphénols polaires et apolaires des différents extraits des deux plantes étudiées.

On constate que les teneurs en polyphénols apolaires sont supérieures à celles des polyphénols polaires chez les deux plantes étudiées pour tous les extraits, mis à part l'extrait acétate d'éthyle d'*A. ligustica* et aqueux acétate d'éthyle de *R. chalepensis*.

La teneur en polyphénols apolaires de l'extrait éthanolique est plus importante que celle des autres extraits ou on a enregistré une teneur de 369,298 mg EAG/g d'extrait pour *R. chalepensis* et une teneur de 150,985 mg EAG/g d'extrait pour *A. ligustica*.

On constate aussi que les faibles teneurs en polyphénols apolaire pour *A. ligustica* 2,31 mg EAG/g E et 0,61 mg EAG/g E pour *R. chalepensis* ont été enregistrées dans l'extrait aqueux acétate d'éthyle.

Par contre la teneur en polyphénols polaire la plus faible a été enregistrée dans l'extrait aqueux acétate d'éthyle pour les deux plantes avec 1,007 mg EAG/g d'extrait et 0,729 mg EAG/g d'extrait respectivement *A. ligustica* et *R. chalepensis*.

Donc, *A. ligustica* et *R. chalepensis* sont riches en composés phénoliques apolaires solubles dans les solvants organiques.

### V.2.3. Flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). La quercétine a été utilisée comme étalon.

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y=ax+b$ ) réalisée par une solution étalon (Quercétine) à différentes concentrations (figure 3 en Annexe 1). La teneur des flavonoïdes de chaque extrait est exprimée en mg équivalent de quercétine par g d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

Les résultats relatifs aux flavonoïdes sont reportés dans le tableau 03 annexé et sont représentés sur la figure 22.

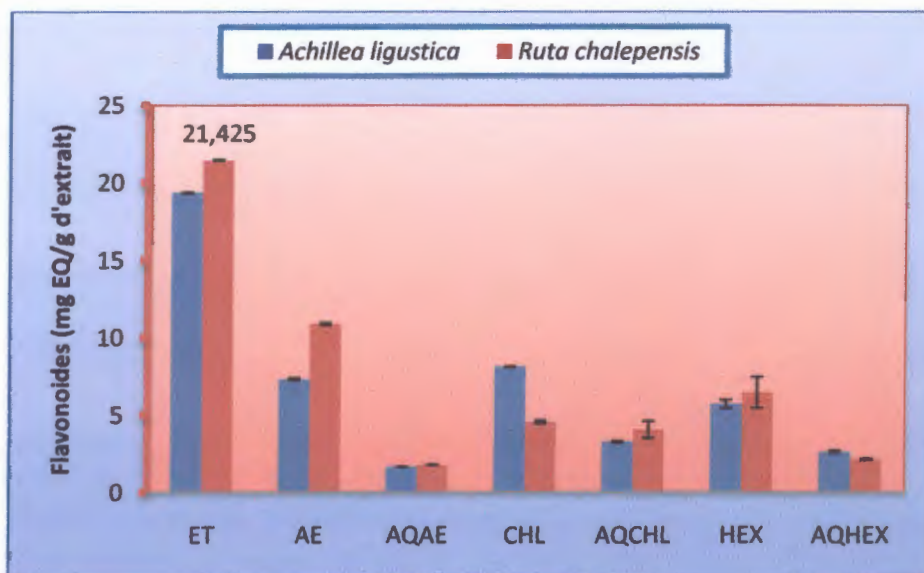


Figure 22 : Teneurs en flavonoïdes des différents extraits des deux plantes étudiées.

A partir de ces résultats, on remarque que l'extrait éthanolique de *R. chalepensis* et *A. ligustica* affiche la teneur la plus élevée avec 21,43 mg EQ /g d'extrait et 19,34 mg EQ /g d'extrait respectivement. La teneur la plus faible est présentée par l'extrait aqueux acétate d'éthyle pour les deux espèces, *R. chalepensis* avec 1,76 mg EQ /g d'extrait et *A. ligustica* avec 1,64 mg EQ /g d'extrait.

On remarque que *R. chalepensis* a généralement présentée la teneur en flavonoïdes la plus élevée dans la majorité des extraits (ET, EA, AQAE, AQCHL, HEX). Donc on remarque que *R. chalepensis* enregistre les plus fortes teneurs par rapport à *A. ligustica*.



Ce résultat a été confirmé par l'étude de **BOUTAS et BEKKOUCHE (2015)** qui, travaillant sur les mêmes plantes, ont trouvé que la teneur en flavonoïdes de *R. chalepensis* est plus importante qu'*Achillea Ligustica* (0,240 et 0.220 mg EQ /g d'extrait éthanolique). Valeurs nettement inférieures à ceux obtenues dans notre étude (21,425 mg EQ /g d'extrait ).

Les teneurs en flavonoïdes obtenues par **ARDESTANI et YAZDANPARAST, (2006)** travaillant sur l'extrait éthanolique d'*A santolina* sont de 49.04 mg EQ /g EB. Une autre étude sur extrait méthanolique une d'*A odorata* L par **BOUTENNOUN et al., (2014)** ont trouvés une teneur de 97.77 mg EQ /g d'extrait brut .

**BOUDJOURAF (2011)** travaillant sur l'extrait éthanolique, Acétate d'éthyle et chloroforme d'*Artimisia campestris* appartenant à la même famille d'*Achillea Ligustica* on trouvé des teneurs de 21.33 mg EQ/mg Ps, 19.47 mg EQ/g Ps et 16.88 mg EQ/mg Ps respectivement.

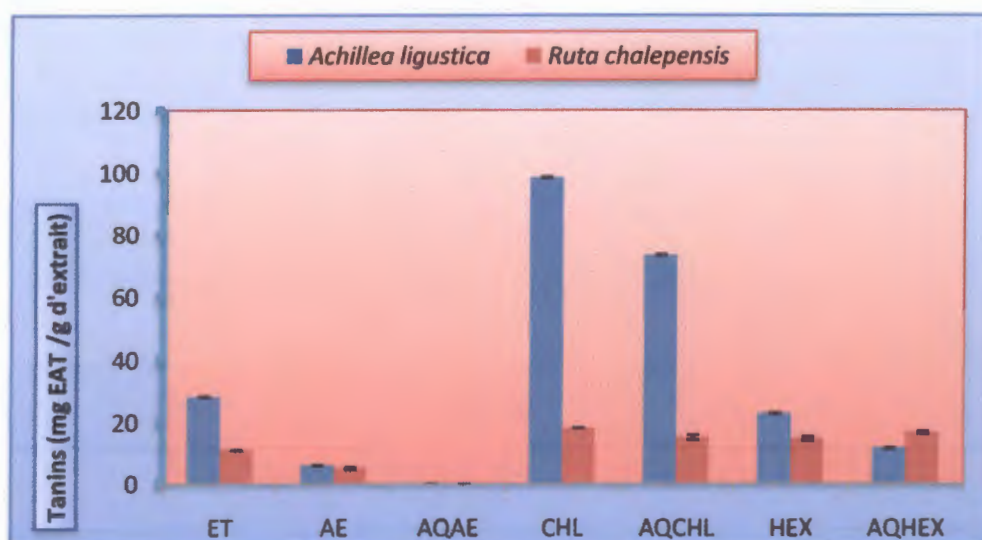
Ces valeurs restent plus importantes par rapport à nos résultats (19,33 mg EQ /g d'extrait éthanolique).

Les teneurs en flavonoïdes obtenues par **BENTAHER et ses collaborateurs (2012)** travaillant sur l'extrait éthanolique de *Ruta montana* sont de l'ordre de 0.00170 mg EQ /g d'extrait qui sont largement inférieures à nos résultats (10.49 mg EAG/g EB)

#### V.2.4. Tannins

La quantification des tannins a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y=ax+b$ ) réalisée par une solution étalon (acide tannique) à différentes concentrations (**figure 4 en Annex1**), la teneur est exprimée en mg équivalent d'acide tannique par g d'extrait (mg EAT /g d'extrait).

Les résultats relatifs aux tannins sont reportés dans le **tableau 04 annexe1** est représentés dans la **figure 23**.



**Figure 23 : Teneurs en tannins des différents extraits des deux plantes étudiées.**

La teneur en tannins est très importante dans l'extrait chloroforme pour les deux espèces, *A. ligustica* a enregistré la plus forte teneur (98,41 mg EAT /g d'extrait) par rapport à *R. chalepensis* (18,36 mg EAT /g d'extrait).

D'abord on remarque que les tannins se condensent essentiellement dans les extraits organiques apolaires pour les deux espèces par opposition aux extraits aqueux, sauf l'extrait aqueux hexane où on a enregistré des teneurs importantes, 73,31 et 15,45 mg EAT /g d'extrait pour *A. ligustica* et *R. chalepensis* respectivement.

L'extrait acétate d'éthyle et aqueux acétate d'éthyle montre une pauvreté totale en tannins. Dans le premier extrait, on a enregistré une teneur de 5,95 et 5,26 mg EAT /g d'extrait pour respectivement *A. ligustica* et *R. chalepensis*. Enfin, les tannins n'ont pas été détectés dans l'extrait aqueux acétate d'éthyle pour les deux espèces.

Cette répartition pourrait être expliquée par l'insolubilité des tannins, en particulier les tannins condensés à haut poids moléculaire dans les solutions aqueuses comme l'a indiqué SARNI-MANCHADO et CHEYNIER (2006).

Travaillant sur l'extrait méthanolique de *R. chalepensis*, KHLIFI et al. (2013) ont obtenus des valeurs de l'ordre de 4,73 mgEC/g de PS et qui reste inférieure au résultat obtenu pour l'extrait brut éthanolique (11,255 mg/g d'extrait).

La différence dans les teneurs en composés phénolique peut être expliquée par plusieurs facteurs comme les conditions climatiques, la situation géographique, la période de collecte, les facteurs génétiques, les conditions expérimentales, les solvants utilisés, la maturité de la plante, la partie de plante testée ainsi que le solvant et la méthode d'extraction (TROSZNSKA et al., 2002 ; SOSA et al., 2005 ; CHEYNIER, 2005 ; ADEDAPO et al. 2008)

### V.3. Activité antioxydante

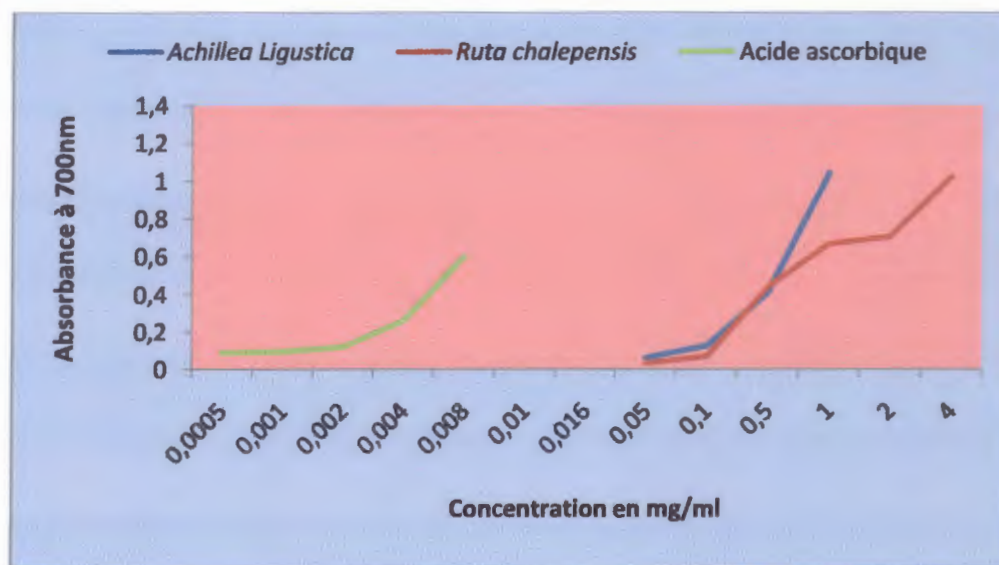
#### V.3.1. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur présente l'aptitude d'une substance à transférer un électron sur une autre substance et à prévenir de la sorte le phénomène de peroxydation des lipides, jouant ainsi le



rôle d'antioxydant. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur de son activité antioxydante.

Les résultats de la capacité réductrice des extraits éthanoliques des deux plantes sont représentés dans la **figure 24**. On remarque en premier lieu que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées. En second lieu, que tous nos extraits ont des activités moins importantes que la substance de référence (acide ascorbique), pour ce dernier le pouvoir réducteur est déjà de 0,6 à la concentration de 0,008 mg/ml.



**Figure 24:** Pouvoir réducteur de l'extrait brut à différentes concentrations des deux plantes étudiées en comparaison avec l'acide ascorbique.

Les absorbances des extraits éthanoliques d'*A. ligustica* oscillent entre 0,012 et 1,075 pour des concentrations en extrait brut de 0,01 mg/ml à 1 mg/ml. Par contre, les absorbances des extraits éthanoliques de *R. chalepensis* oscillent entre 0,035 et 1,022 pour des concentrations allant de 0,05 mg/ml à 4 mg/ml. Pour l'acide ascorbique les absorbances oscillent entre 0,089 et 0,6 pour les concentrations allant de 0,0005 mg/ml à 0,008  $\mu$ g/ml.

#### Détermination de $CR_{0,5}$ :

Pour comparer l'activité antioxydante des deux espèces avec le standard, nous avons calculé  $CR_{0,5}$  qu'est considérée comme la concentration qui donne une absorbance de 0,5 à 700 nm et qui représente la réduction de 50% du fer. La  $CR_{0,5}$  de chaque espèce et du standard est obtenue à partir des courbes représentées sur la **figure 25**.

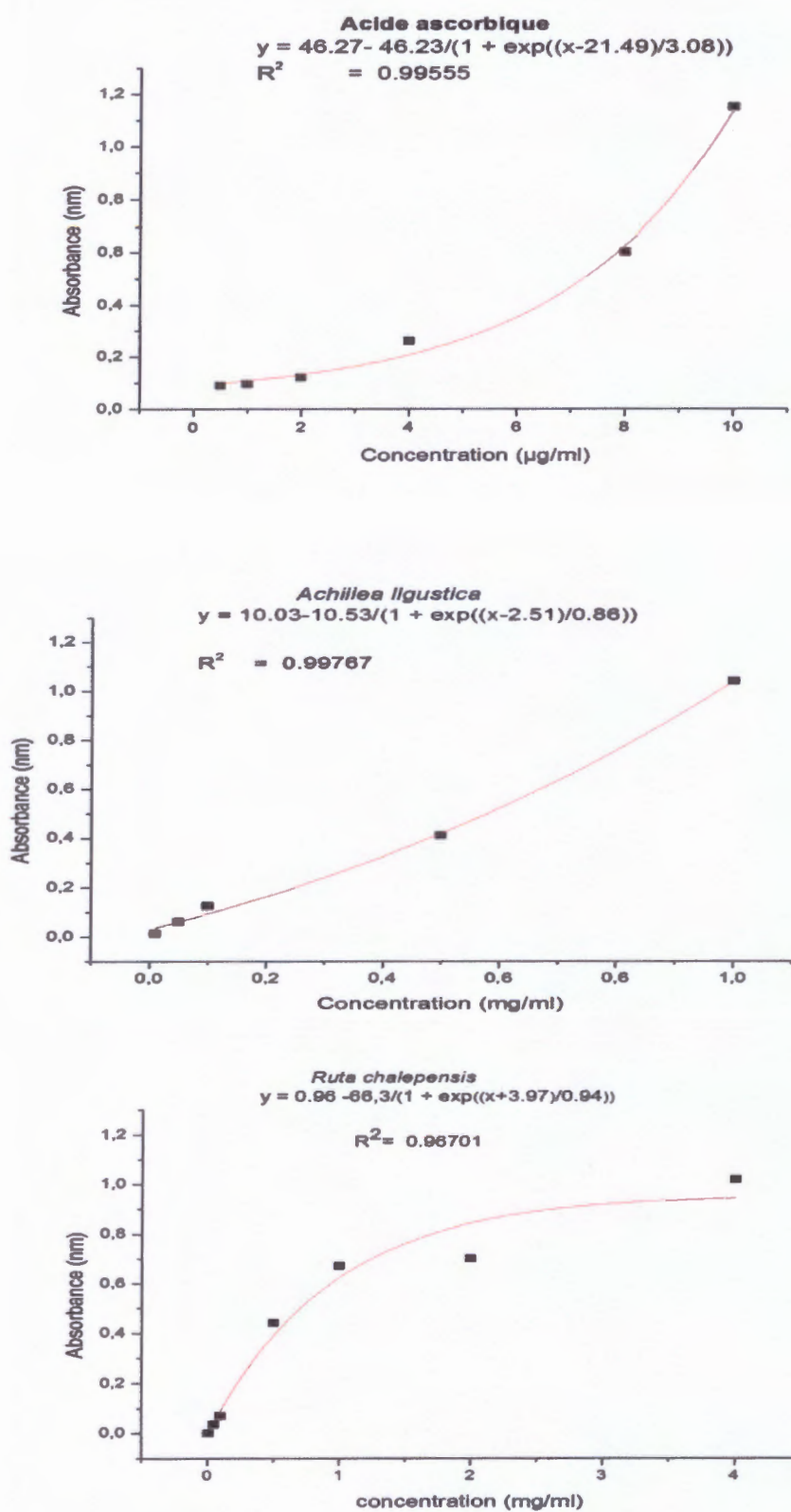
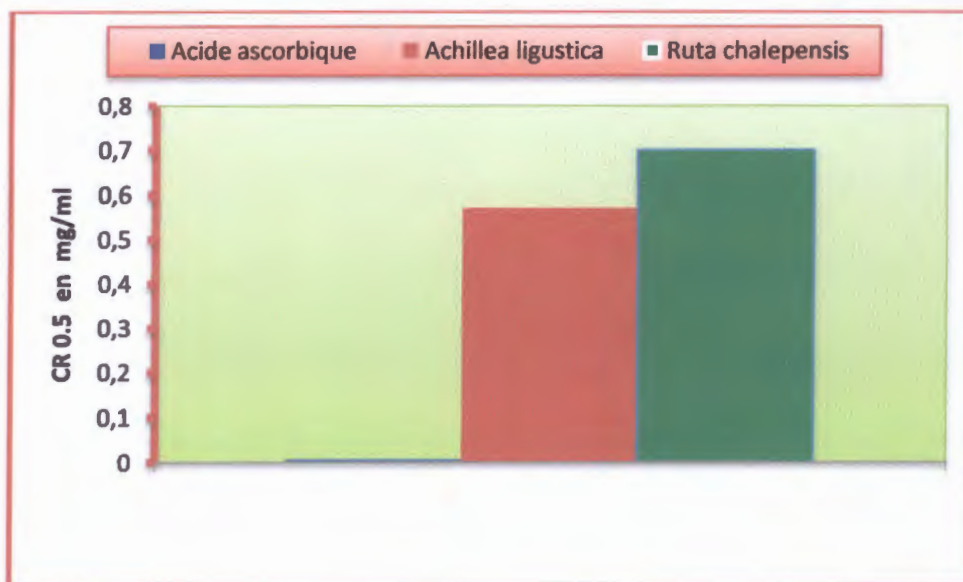


Figure 25 : Pouvoir réducteur en fonction des concentrations en extrait éthanolique.



Les résultats obtenus sont illustrés sous forme d'histogramme dans la **figure26**.

Nous remarquons que la capacité à réduire le fer est variable est beaucoup plus importante pour l'acide ascorbique (0,007mg/ml) suivi par *A. ligustica* (0,57 mg/ml) et enfin *R. chalepensis* (0,7mg/ml).



**Figure26** : Concentrations nécessaires pour la réduction de 50% du fer de l'extrait éthanolique d'*A. ligustica*, de *R. chalepensis* et de l'acide ascorbique.

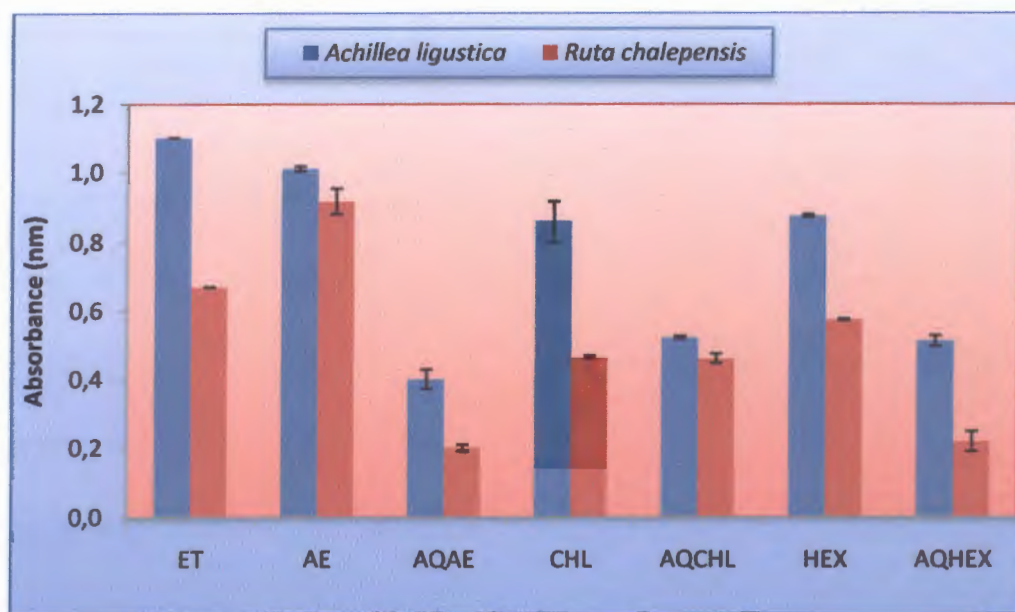
Nos résultats sont confirmées par l'étude de **Boutas et Bekkouche (2015)** qui travaillant sur les mêmes espèces ont trouvé la même séquence des CR<sub>0.5</sub>, 0,110 mg/ml pour *A. ligustica* et 0,150 mg/ml pour *R. chalepensis*. En comparant la CR<sub>0.5</sub> avec nos résultats, on peut dire que nos extraits sont moins actifs. Par ailleurs, les CR<sub>0.5</sub> trouvé pour l'extrait éthanolique de *R. Chalepensis* d'Ain Timouchent rapporté par **Attou (2011)** qui étaient compris entre 0,22 et 0,8 mg/ml est comparable à notre résultat.

- **Comparaison du pouvoir réducteur des différents extraits des deux plantes étudiées à 1mg/ml.**

Afin de comparer le pouvoir réducteur des différents extraits, on a choisie la concentration de 1mg/ml. Les résultats de la capacité réductrice des extraits sont représentés dans la **figure 27**.

L'activité la plus forte du pouvoir réducteur a été exposée par l'extrait éthanolique pour les deux espèces avec une absorbance de 1,101 et 0,67 pour respectivement *A. ligustica* et *R. chalepensis* suivi par l'extrait acétate d'éthyle (1,01 et 0,916 pour *A. ligustica* et *R. chalepensis*

respectivement). Dans le cas des extraits aqueux, le pouvoir réducteur est beaucoup plus faible (de 0,202 à 0,522).



**Figure 27:** Pouvoir réducteur des différents extraits des deux plantes étudiées à 1mg/ml.

Ces résultats sont confirmés par KASEM et al. (2015), qui travaillant sur différents extraits de *R. chalepensis* de région de mahdia (Tunisie) ont trouvé que l'extrait éthanolique donne une activité plus importante par rapport à l'extrait hexane, méthanol, acétate d'éthyle...etc. avec une valeur de 0.47 pour une concentration 1mg/ml. Si on compare avec ces résultats, on trouve que l'extrait éthanolique de *R. chalepensis* de Jijel donne une absorbance plus importante (0,670), donc cet extrait est considéré comme plus actif.

L'activité antioxydant de l'extrait des plantes est probablement due à son contenu phénolique, comme l'a souligné HOLLMAN et KATAN (1999). Les variations de la capacité antioxydant de l'éthanol et d'autres extraits peut être attribuée à la différence dans leur contenu phénolique (BOUTENNOUN et al., 2014),

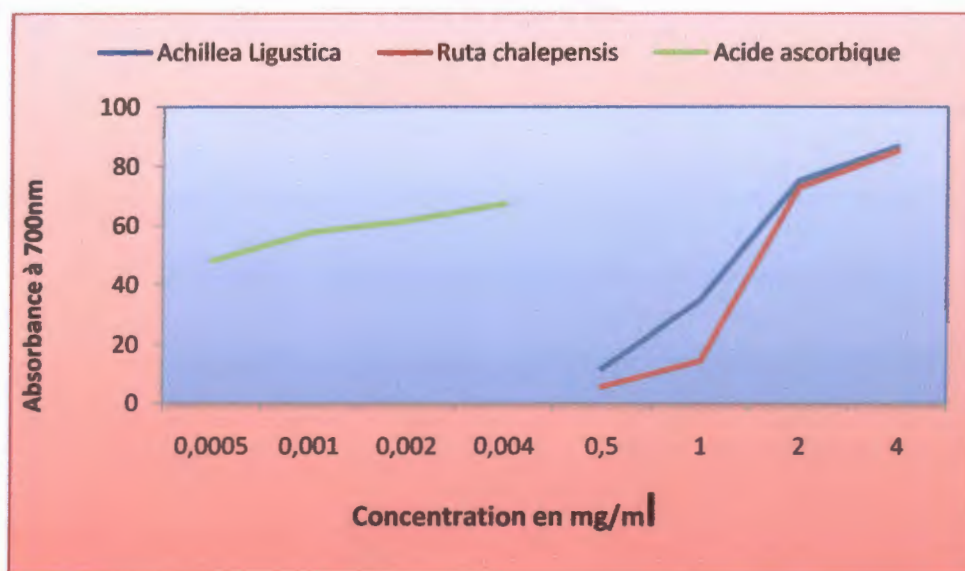
Par ailleurs, le pouvoir réducteur des extraits d' *A. ligustica* suit le même ordre que celui des teneurs en flavonoïdes et en phénols polaires, tandis que les extraits de *R. chalepensis* suit le même ordre que celui des teneurs en flavonoïdes et en phénols apolaires.

En effet, le test de corrélation a montré un lien positif entre le pouvoir réducteur d'*A. ligustica* avec les flavonoïdes ( $r=0.93$ ) et les polyphénols apolaires ( $r=0.7$ ), entre le pouvoir réducteur de *R. chalepensis* avec à la fois les flavonoïdes ( $r=0.98$ ) et les polyphénols apolaires ( $r=0.96$ ) (Annexe 3).



### V.3.2. Effet de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup>

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. La réduction de ce dernier par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits (Wu, 2007). Le DPPH est initialement violé, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques (HADBAOUI, 2012).

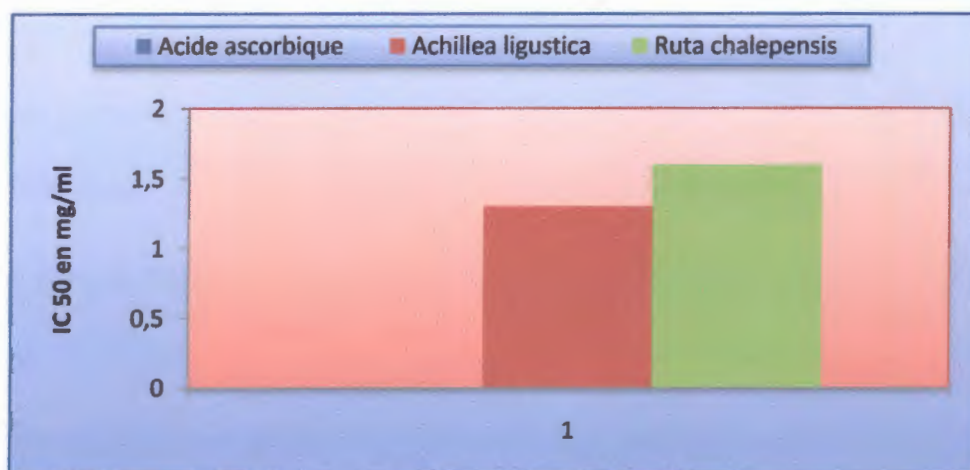


**Figure 28 :** Activité antiradicalaire contre le DPPH de l'extrait brut à différentes concentration des deux plantes étudiées en comparaison avec l'acide ascorbique.

Les résultats de l'activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique à différentes concentration, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont illustrés dans la **figure 28**. Les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'acide ascorbique ou pour les deux espèces.

L'acide ascorbique a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> plus important par rapport à l'extrait brut d'*A. ligustica* et *R. chalepensis* ceci est démontré par l'allure des graphes qui trace une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction presque totale du DPPH<sup>•</sup> en sa forme non radicalaire.

Les valeurs des IC<sub>50</sub> trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans la **figure 30**. On constate que l'acide ascorbique a montré la meilleure activité (0.00056 mg/ml), suivi d'*A. ligustica* (1,3mg/ml), puis *R. chalepensis* (1,6 mg/ml).



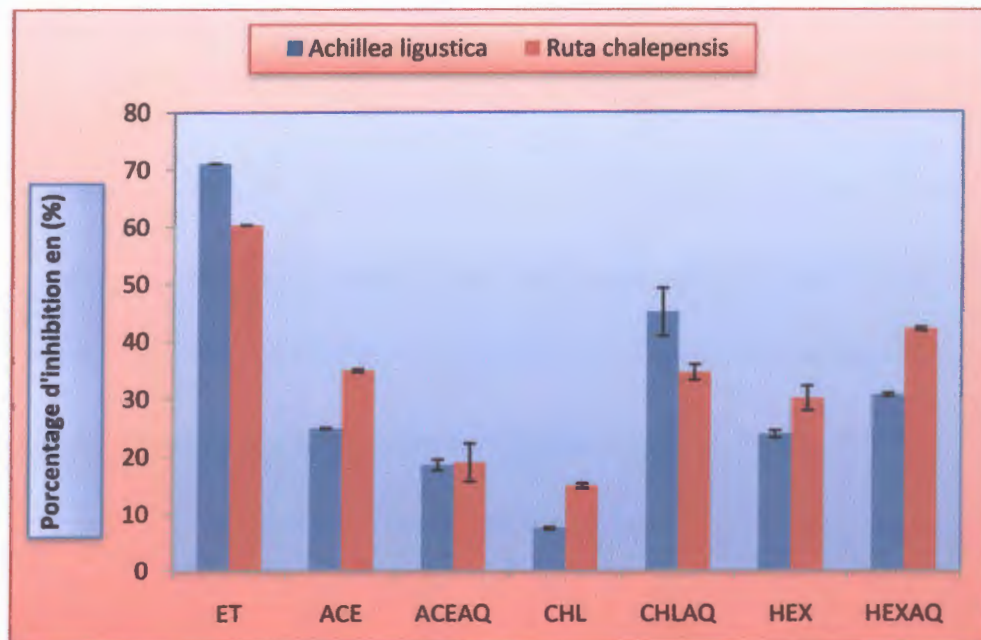
**Figure30** : Concentration inhibitrice de 50% du DPPH<sup>•</sup> des extraits éthanoliques d'*A. ligustica* et de *R. chalepensis* et de l'acide ascorbique.

D'autre part, si on compare nos résultats avec ceux obtenus par **Boutennoun et al. (2014)** qui ont travaillé sur *A. odorata* dont les pourcentages d'inhibition obtenus sont de 65.24 % et 88.34% à des concentrations de 100 et 200 µg / ml et qui sont plus importants que celle rapportée dans le présent travail.

Selon les résultats obtenus, l'extrait éthanolique de *R. chalepensis* et *A. ligustica* a montré une puissante activité antiradicalaire. Cette activité peut être due à la présence d'une certaine catégorie de composés phénoliques dans l'extrait. Selon **Acker et al. (1995)**, les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules.

➤ **Comparaison de l'activité antiradicalaire contre le DPPH<sup>•</sup> des différents extraits des deux plantes étudiées à 1mg/ml.**





**Figure 31:** Activité antiradicalaire contre le DPPH des différents extraits des deux plantes étudiées à 1mg/ml.

Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits à 1mg/ml sont illustrés dans la **figure31**. Selon les résultats obtenus, l'extrait éthanolique a exhibé l'effet scavenging le plus élevé (71,06% et 60,35% pour respectivement *A. ligustica* et *R. chalepensis*). Les autres extraits ont exhibé des activités scavenging inférieures à 50%, c'est le cas de l'extrait chloroforme (45,04% et 34,62% pour respectivement *A. ligustica* et *R. chalepensis*), l'extrait aqueux d'hexane (30,69% et 42,05). L'extrait qui exhibe les plus faibles activités est l'extrait chloroforme avec des pourcentages d'inhibition de 7,51% et 14,94% respectivement pour *A. ligustica* et *R. chalepensis*.

Les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane ayant montrés les meilleurs pourcentages d'inhibition ont la capacité de dons d'électrons plus élevée que les autres extraits. Ils possèdent des composés polaires riches en hydroxyles phénoliques dotés d'une grande capacité de donner un atome d'hydrogène.

Les résultats d'une étude sur l'activité antiradicalaire contre le DPPH des extraits éthanoliques, acétate d'éthyle et hexane de *R. chalepensis* rapportés par **KACEM et al. (2015)** ont montré des activités de 84,8%, 58,63% et 19,75% à une concentration de 0,5mg/ml beaucoup plus importante que celle obtenue par nos extraits 14,196 %, 18,950%, 18,950%, à une concentration de 1mg/ml.

Par ailleurs, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH n'a aucun lien avec les teneurs des composés phénoliques (phénols totaux, phénols polaires, phénols apolaires, flavonoïdes et tannins) pour les deux plantes (**annexe 3**). Notre résultat témoigne comme s'est fait par **CHUNG et al. (2002)** que l'activité

inhibitrice est fortement associée à la structure chimique des composés et pas uniquement à leur concentration.

#### V.4. Activité antibactérienne

Pour mieux expliquer, nous devons présenter nos résultats sous forme d'une comparaison entre les moyennes des diamètres obtenus, et les concentrations des extraits utilisées vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Nous constatons, que le diamètre de la zone d'inhibition est variable et proportionnelle à la concentration des extraits pour les deux espèces, l'extrait étudié est actif lorsqu'il est concentré, donc l'activité est inversement proportionnelle à la dilution et varie aussi selon les souches bactériennes testées.

Selon la littérature scientifique, les souches bactériennes répondent ou pas aux extraits en fonction de l'existence ou non de zones d'inhibition, trois réponses sont possibles :

- ✓ Souche sensible : la dimension du diamètre de la zone d'inhibition est égale ou supérieure à 10mm
- ✓ Souche limite (intermédiaire) : la dimension du diamètre de la zone d'inhibition inférieure à 10mm
- ✓ Souche résistante : absence de zone d'inhibition (BENHAMMOU, 2012).

Donc, quand le diamètre est important, l'extrait donne une bonne activité antibactérienne, et la souche est considérée comme plus sensible.

##### V.4.1. Pouvoir antibactérien de la ciprofloxacine (antibiotique)

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zone d'inhibition autour des disques. Les diamètres des zones d'inhibition de l'antibiotique sont présentés dans le tableau (03) et la figure 1 (annexe 2).

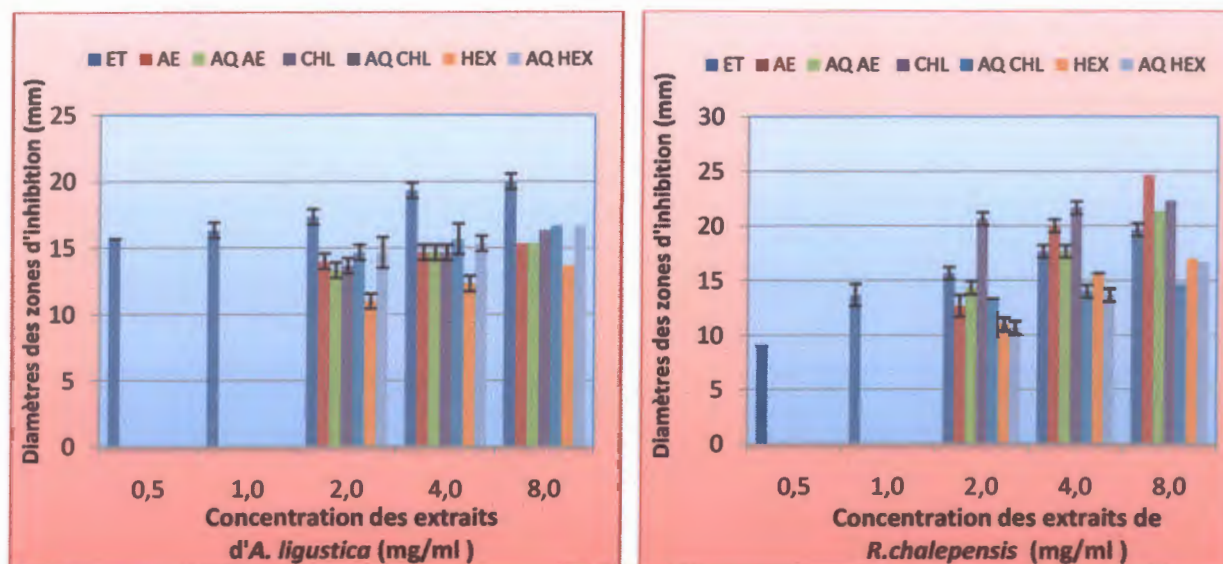
**Tableaux 03 :** Diamètres des zones d'inhibition de l'antibiotique relatifs aux différentes souches bactériennes

Souche bactérienne	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Diamètre (mm)	9	11	12



Les souches ont montré des sensibilités vis-à-vis de l'antibiotique, la souche la plus sensible est *Pseudomonas aeruginosa* (12 mm) suivi de *Staphylococcus aureus* (11 mm) et enfin *Escherichia coli* (9 mm).

#### V.4.2. Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis d'*Escherichia coli*

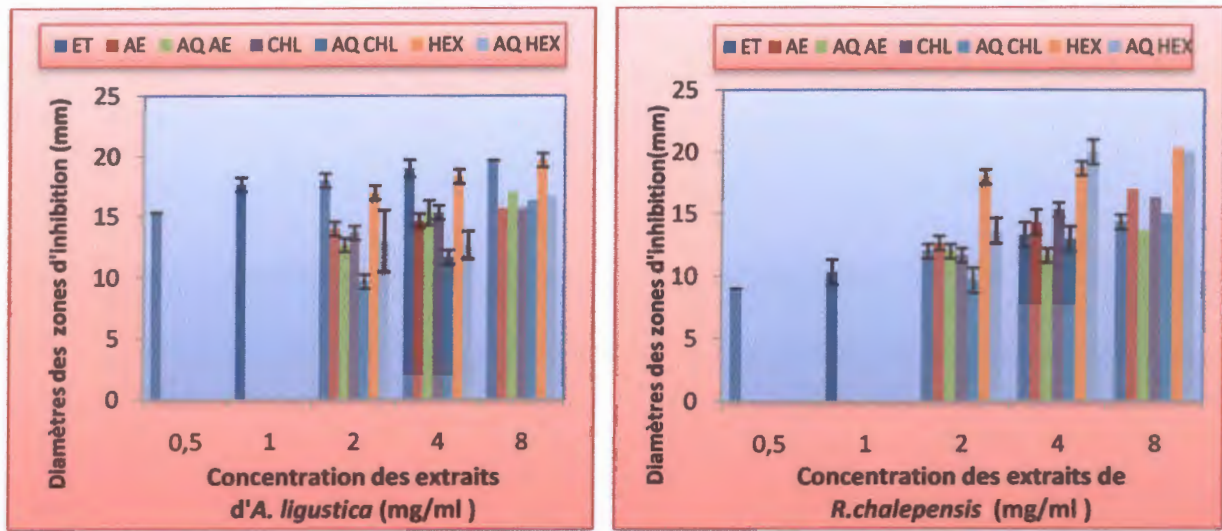


**Figure 32 :** Diamètres des zones d'inhibitions des extraits des deux plantes relatifs à *Escherichia coli*.

D'abord, nous remarquons selon la figure 32 que les diamètres des zones d'inhibition contre la souche *E. coli* sont de 20 mm pour *A. ligustica* qui présente le diamètre le plus important marqué à 8mg/ml dans l'extrait éthanolique, et un diamètre de 24 mm pour *R. chalepensis* dans l'extrait acétate d'éthyle.

Les plus faibles diamètres sont marqués dans l'extrait hexane d' *A. ligustica* (13,67 mm) et dans l'extrait chloroforme aqueux de *R. chalepensis* (14,67mm).

#### V.4.3. Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

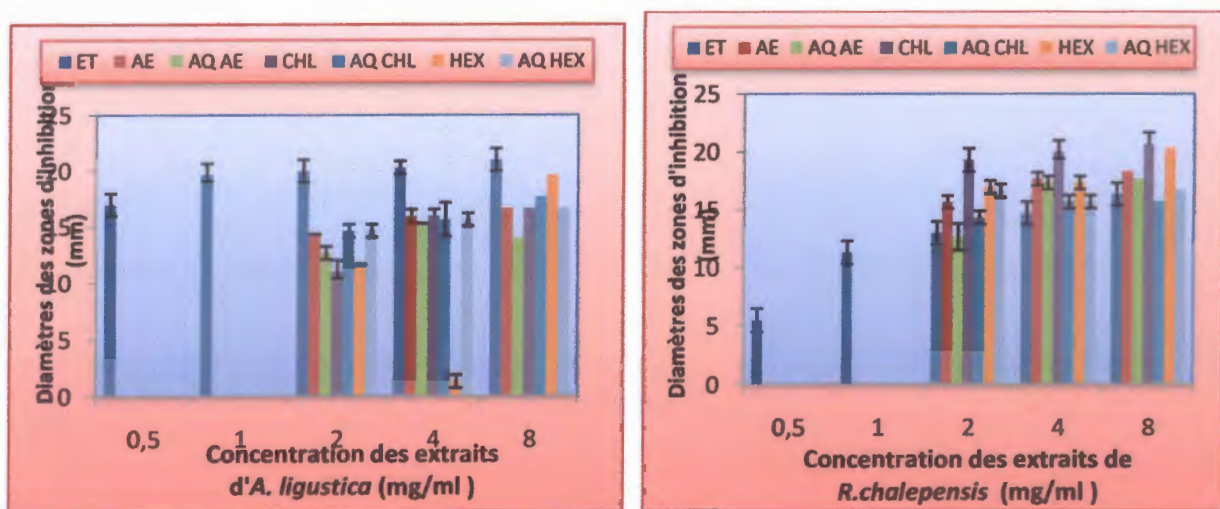


**Figure 33 :** Diamètres des zones d'inhibition des extraits des deux plantes relatifs à *Pseudomonas aeruginosa*.

Comme le montre la **figure 33**, les diamètres des zones d'inhibitions calculées contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* sont de 19.67 mm pour *A. ligustica* qui présente le diamètre le plus important marqué à 8mg/ml a été enregistrée dans l'extrait hexane et éthanolique, et un diamètre de 20.33 et 20 mm pour *R. chalepensis* présenté par l'extrait hexane et hexane aqueux.

Les plus faibles diamètres : 15,67 mm sont marqués chez *A. ligustica* pour l'extrait acétate d'éthyle et 13,67mm pour *Ruta chalepensis* chez l'extrait aqueux acétate d'éthyle.

#### V.4.4. Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*



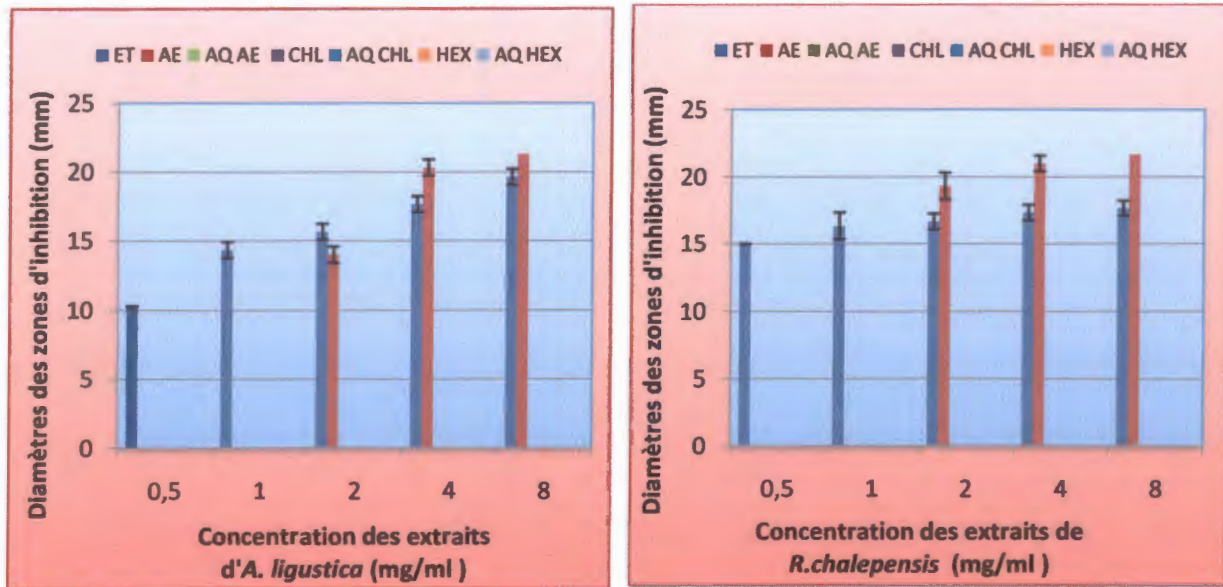
**Figure 34 :** Diamètres des zones d'inhibition des extraits des deux plantes relatifs à *Staphylococcus aureus*.



Les diamètres des zones d'inhibitions contre la souche *Staphylococcus aureus* : 21 mm pour *A. ligustica* qui présente le diamètre le plus important marqué à 8mg /ml pour l'extrait éthanolique, et un diamètre de 20.67 mm pour *R. chalepensis* qui présenté à l'extrait chloroforme.

Les plus faibles diamètres : 14 mm sont marqués chez *A. ligustica* pour l'extrait acétate d'éthyle et 13,67 mm pour *R. chalepensis* chez l'extrait chloroforme aqueux.

#### V.4.5. Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*



**Figure 35:** Diamètres des zones d'inhibition des extraits des deux plantes relatifs à *Klebsiella pneumoniae*.

Le diamètre des zones d'inhibition de la souche *Klebsiella pneumoniae* est 21.33 mm pour *A. ligustica* et 21.67 mm pour *R. chalepensis* qui présentent les diamètres les plus importants marqué à 8mg /ml pour l'extrait acétate d'éthyle suivi de l'extrait éthanolique.

Dans le cas des extraits de deux espèces nous avons remarqué aussi que la concentration 0,5 mg/ml était suffisante pour inhiber la croissance des souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*)

D'autre part, pour les bactéries ; *Pseudomonas aeruginosa* est toujours la plus résistante suivi de *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* par contre *Escherichia coli* est sensible à ces extraits.

En comparant les résultats obtenus de nos extraits à ceux de l'antibiotique, nous pouvons déduire que tous les extraits présentent une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis de toutes

les bactéries testées. Nous constatons aussi que les extraits d'*A. ligustica* présentent des zone d'inhibition plus intéressantes que celles des extraits de *R. chalepensis*

Si on compare nos résultats à ceux de **BIYITI et al. (2004)**, qui montre que les diamètres d'inhibition varient de 9,6 à 15 mm de l'extrait éthanolique pour quatre plantes (*Pyrenacantha staudtii*, *Maesopsis eminii*, *Harrissonia abyssinica* et *Cissus petiolata*), *A. ligustica* et *R. chalepensis* présentent une bonne activité.

Pour confirmé que les résultats obtenus résulte seulement de l'activité des extraits de plantes et non pas aux solvants d'extraction utilisés, un test négatif a été établie. Les résultats figurent dans le **tableau04**.

**Tableau 04** : Effets antibactériens des différents solvants d'extraction

Souche Bactérienne	ET	AE	AQ AE	CHL	AQ CHL	HEX	AQ HEX
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-

(-) : test négatif

Les résultats du tableau ci-dessus indiquent que les souches ne présentent aucune zone d'inhibition pour les différents solvants utilisés. Les résultats obtenus indiquent que les extraits étudiés ont marqué une bonne activité antibactérien contre les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumonie*.

La différence d'activité entre ces extraits pourrait être expliquée par la nature des molécules contenues dans ces derniers. En effet, il existe des différences de capacité de solubilisation et d'extraction des solvants, à l'égard des phytomolécules. Selon **COWAN (1999)**, au cours de l'extraction liquide-liquide, les phytomolécules sont réparties entre les solvants en fonction de leur polarité et leur solubilité.

Aussi l'activité antibactérienne de l'extrait des plantes est probablement due à son contenu phénolique, selon **Athamena et al., 2010**. les composés phénoliques sont des substances antibactériennes importantes.



# Conclusion

suivi par l'extrait acétate d'éthyle (1,01 et 0,916 pour *A. ligustica* et *R. chalepensis* respectivement). Dans le cas des extraits aqueux, le pouvoir réducteur est beaucoup plus faible (de 0,202 à 0,522).

En effet, le test de corrélation a montré un lien positif entre le pouvoir réducteur d'*A. ligustica* avec les flavonoïdes ( $r=0.93$ ) et les polyphénols apolaires ( $r=0.7$ ), entre le pouvoir réducteur de *R. chalepensis* avec à la fois les flavonoïdes ( $r=0.98$ ) et les polyphénols apolaires ( $r=0.96$ )

L'acide ascorbique a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> plus important par rapport à l'extrait brut d'*A. ligustica* et *R. chalepensis* avec des IC<sub>50</sub> de 0.56 µg/ml pour l'acide ascorbique, 1,3mg/ml pour *A. ligustica* et 1,6 mg/ml pour *R. chalepensis*. Aussi, l'extrait éthanolique à 1mg/ml a exhibé l'effet scavenging le plus élevé (71,06% et 60,35% pour respectivement *A. ligustica* et *R. chalepensis*). Les autres extraits ont exhibé des activités scavenging inférieures à 50%,

Tous les extraits présentent une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis de toutes les bactéries testées. Nous constatons aussi que les extraits d'*A. ligustica* présentent des zones d'inhibition plus intéressantes que celles des extraits de *R. chalepensis* dépassant parfois 24mm. La souche *Pseudomonas aeruginosa* est toujours la plus résistante suivi de *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* par contre *Escherichia coli* est sensible à ces extraits.

Selon les résultats obtenus, on conclut que nos plantes sont très riches en composés phénoliques avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par la recherche.

Un tel résultat témoigne de la richesse de ces extraits en divers composés et met en valeur les diverses applications thérapeutiques d'*Achillea ligustica* et *Ruta chalepensis*. Néanmoins, les résultats obtenus dans cette étude restent préliminaires et des études complémentaires sont envisagées et se résument dans les points suivants :

- Isolement et caractérisation des composés actifs dans (CCM, HPLC)
- Identification des molécules responsables du pouvoir antioxydant en utilisant des techniques d'identification plus performantes.
- Evaluation de l'activité antioxydante par d'autres méthodes et de faire des tests in vivo afin de déterminer de nouveaux agents thérapeutiques.
- Evaluation de l'activité antibactérienne sur d'autres souches bactériennes.
- Evaluation d'autres activités biologiques anti-insecticide, anti-inflammatoire, ...etc.



# Références Bibliographiques

## -A-

**Adedapo A.A., Jimoh F.O, Koduru S, Masika, P.J et Afolayan, A.J., 2008.** Evaluation of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Halleria lucida*. *Bioresource Technology*, 99: 4158–4163.

**Alanis A.J., 2005.** Resistance to antibiotics: are we in post-antibiotic Era *Archives of Medical Research*, p 697-705.

**Archambault M. et Blouin J., 2006.** *Évaluation de l'impact de l'arrêt de l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance et de la modification de l'utilisation des antibiotiques à des fins thérapeutiques et préventives en médecine vétérinaire.* Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, p 273p.

**Ardestani A. Yazdanparast R., 2007.** Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea semolina extracts. *Food Chemistry* 104, pp 21–29.

**Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laouar A, Laroui S et Khebri S. 2010.** activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum* l. *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 1.

**Attou A., 2011.** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de magister en Biologie Option : « Produits naturels : Activités biologiques et synthèses », Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, p 10.

**Auckenthaler R., 1999.** *Activité antibactérienne, spectre, mode d'action et cibles bactériennes*, pp 17-32. Dans Bergogne-Bérézin, E. et P Dellamonica. *Antibiothérapie en pratique clinique*. Masson, Paris.

## -B-

**Ba K. Tine E. Destain J. Cissé N et Thonart P., 2010.** Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt, 14(1), p131-139.

**Beaudeau, J.-L, Durand. 2000.** *Biochimie médicale : marqueurs actuels et perspectives.* Médecine Sciences Publication, Lavoisier, Paris, 145p.



- Beckera L. Zaitera A. Petitb P. Zimmerb D. Karam M.C. Baudelairec I, Scherb J. Dickoa A., 2016.** Improvement of antioxidant activity and polyphenol content of *Hypericum perforatum* and *Achillea millefolium* powders using successive grinding and sieving. *Industrial Crops and Products* 87, pp 116–123
- Bader A. Panizzi L. Luigi Cioni P.L. Flamini G. 2007.** *Achillea ligustica*: composition and antimicrobial activity of essential oils from the leaves, flowers and some pure constituents. *Central European Journal of Biology* 2(2), pp 206-212.
- Baudeau J.L. Delattre J., Therond P. Bonnefont-Rousselot D. Legrand A. et Peynet J., 2006.** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse et Biologie spécialisée* 169 p.
- Bergogne-Berezin E. et Dellamonica P., 1995.** Antibiothérapie en pratique clinique. Ed. Masson, Paris, 486 p.
- Benhammou N. Atik Bekkara F. Kadifkova P., 2007.** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf, *Advances in Food Sciences*, 29(3), pp 155-161.
- Benhammou N., 2012** Activité antioxydant des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse ~~présenté Pour l'obtention d'un~~ Doctorat en Biologie. Université Aboubakr Belkaïd-TLEMCEM, page 2.
- Biyiti L .F. Meko'Od.J .L. Tamzic v. Amvam Zollo P.H., 2004.** Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. Vol.13, pp.11-20.
- Boudjouref M., 2012.** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de Magister En Biochimie Option- Biochimie appliquée, Université Ferhat Abbas, SETIF, p25.
- Boutas A. Bekkouche I., 2015.** Constituants bioactifs et potentiel antioxydant de l'extrait brut de *Ruta chalepensis* L et *Achillea Ligustica*. Mémoire ~~de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de~~ Master 2 Académique en Biologie Option-Toxicologie de l'Environnement, Université Med-Seddik Benyahia-Jijel, p 83.
- BORG A. REEBER J ., 2008.** Biochimie métabolique, ELLIPSES paris. 285p.
- BOUMEDIENE N, AGHA O., 2014.** Contribution à l'étude de l'activité biologique d'une espèce du genre *Rata* de Djebel Tessala (Algérie occidentale) et à la faisabilité d'un Plan de conservation.

Mémoire de master II Option : Amélioration de la Production Végétale. Université Abou Bekr Belkaid. p 103.

**Boutennoun H. Boussouf L. Rawashdeh A. Al-Qaoud K. Abdelhafez S. Kebieche M. Madani K., 2014.** In vitro cytotoxic and antioxidant activities of phenolic components of Algerian *Achillea Odorata* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.013>

**Bruneton J., 2009.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Tec et Doc Lavoisier, 4<sup>ème</sup> édition, Paris, 1120 p.

-C-

**Carbon C. Regnier B. Saimot G., 1994.** Médicaments anti-infectieux, Flammarion, Paris. 501p.

**Celiktas O.Y. Hames Kocabas E.E. Bedir E. Vardar Sukan F. Ozek T. Baser K.H.C., 2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*, 100: 553-559.

**Chenni M., 2010.** Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale : *Bryonia dioica* Jacq. Mémoire présenté Pour l'obtention du Diplôme de Magister spécialité : Chimie Moléculaire : Analyse, Modélisation, synthèse. Université D'oran Es-Senia. 50 p.

**Cheyrier, V., 2005.** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*, 81: pp 223-229.

**Chiang H.S. Juilo Y et Lu F.J., 1994.** Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (hook) Tryon. *Journal of enzyme inhibition*. n°: 8, pp 61-71.

**Chung Y., Chien C., Teng K., Chou T., 2006.** Antioxydant and mutagenic proprieties of *Zanthoxylum ailanthoides*. *Food chemistry*, 97 : pp 418-425

**Collin S. et Crouzet J., 2011.** Agence universitaire de la francophonie. Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. *Edition Lavoisier*, p 13.

**Cowan M .M. (1999).** Plants products as anti-microbial activity. *Clinical Microbiology Reviews* 4 (12) : 564-582.

-D-



**Defraigne j-o, pincemail j. 2007.** Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev Med Liege* p 10.

**Delattre J. Durand G. Jardillier J-C., 2003.** Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Radicaux libres et antioxydants. Flammarion Médecine-Sciences. ... P?

**Delattre J. Thérond P Bonnefont-Rousselot D., (2005).** Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier: 281-309.

**Dicko M. H. Gruppen H. Traoré A. S. Voragen A. G. J. et Van Berkel W. J. H., 2006.** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, P 21-38.

**Dykes L. et Rooney L.W., 2006.** Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of cereal Sciences* 44, p 236 - 241.

-E-

**Euzeby J.P., 2008.** List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/>.

-F-

**Fakhfakh N. Zouari S. Zouari M. Loussayef C and Zouari N., 2012.** Chemical composition of volatile compounds and antioxidant activation of essential oil, aqueous and ethanol extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) *Journal of Medicinal Plants Research* Vol.6(4) 593-600.

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

**Fauchere L-L. Avril J-L., 2002.** *Bactériologie générale et médicale*. Editions Ellipses.

**Fazi A .et Furt J-M ., 2011.** Vivre du patrimoine: Un nouveau modèle de développement, Harmattan, Paris, 45p.

**Fazeli M-R. Amin G. Ahmadian-Attari M.M. Ashtiani H. Jamalifar H. Samadi N., 2007.** Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*, 18: p646-649.

-G-

**Gardès-Albert M. Bonnefont-Rousselot D. Abedinzadeh Z. et Daniel D., 2003.** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité chimique nov-déc*, pp 91-96.

**Gharibia S. Tabatabaei B.E.S. Saeidi G. Goli S.A.H. et Majid., 2013.** Total phenolic content and antioxidant activity of three Iranian endemic Achillea species. *Industrial Crops and Products* 50 pp 154– 158.

**Goussard J.P., 1999.** Les radicaux libres et antioxydants pp 2-11.

**Griendling K. Sorescu D. Ushio-Fukai M., 2000.** *Circ. Res.*, 86,p. 494.

**Gülçin I. Küfreviöglu O. Oktay M .Büyükokuroglu M.E., 2004.**Antioxydant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.), P 205-215.

**Guerin F. V, Carret G., 1999.** *L'anatograme, Principal méthodologiee, interet et limites. Journées nationale GTV-INRA*,pp 5-12.

**Gutteridge J.M., 1993.** Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun.* 19 : 141-158.

**Greenwood D. et Whitley R., 2003.***Modes of action.* Dans **Finch, R.G., D.**

**Greenwood S. Ragnar Norrby et R.J. Hauser, A.R., 2007.** Whitley. *Antibiotic and chemotherapy.* Churchill Livingstone, 8th edition: 11-14. . *Antibiotics*

-H-

**Hagerman A . et Butler L., 1978.** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins, *J. Agric. Food Chem.* 26 (4), pp 809–812.

**Hadbaoui Z., 2012.** Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de sorgho et de mil locaux. Thèse de Doctorat : Université de Kasdi Merbah OUARGLA-ALGERIE.

**Hallowell B. Gutteridge J.M.C., 1999.** *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed, Oxford University Press.

**Harborne J-B. And Williams C-A., 2000.** Advances in flavonoid research since 1992 *Phytochemistry.* 55 : pp 481-504.

**Hollman P-C-H.Katan M-B., 1999.** Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* 37, pp 937–942.

**Hopkins W- G., 2003.** Physiologie végétale. *De Boeck Supérieur*, p 280p-



## -I-

**Iniesta-Sanmartin E., Barberan F.A.T., Guirado A., and Lorents F.T., 1990.** Antibacterial flavonoids from *Helichrysum picardii* and *H. italicum*. *Planta Medica*. 56 : 648-649.

**Iinuma M, Tsuchiya H, Sato M, Yokoyama J, Ohyama M, Ohkawa Y, Tanaka T, Fujiwara S, and Fujii T., 1994.** Flavanones with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 892-895.

## -J-

**Jacques B .et André R., 2004.** Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp : 217-219- 220-223-225.

**Jakštas V., 2011.** *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. *Food Chemistry* 127, PP 1540–1548.

**Jarrig R. Ruckebusch Y., 1995.** Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion. Editions Quae, 57p.

## -K-

**Kacem M. Kacem I. Simon G, BenMansour A, Chaabouni S, Elfeki A, Bouaziz M.? 2015.** Phytochemicals and biological activities of *Ruta chalepensis* L. growing in Tunisia. *Food Bioscience* 12 PP 73-83.

**Khelifi D, Sghaier R-M. Amouri S. Laouini D. Hamdi M. Bouajila J., 2013.** Composition and antioxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalepensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and Chemical Toxicology* 55, pp 202–208.

## -L-

**Lacy A. et O’Kennedy R., 2004.** Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design* 10, 3797-3811.

**Laughton M. J. Halliwell B. Evans P. J. Robin J. et Houlst, S., 1989.** Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology* 38 (17), 2859-2865.

**Lugasi A. Hovari J. SagiK. and Biro L., 2003.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J.Acta.biologica. szegediensis.* 47 (1-4) :119-125.(Ci)

## -M-

**Macheix J-J. Fleuriet F. et Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques* 194 p.

**Mejri J. Abderrabba M. et Mejri M., 2010.** Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis L.*: Influence of drying, hydrodistillation duration and plant parts; *Industrial Crops and Products* 32, pp: 671- 673.

**Merghem R., 2009.** Elément de BIOCHIMIE VEGETALE, 1ère édition. Edition Bahaeddine, 168 p.

**Maksimovic Z. Malencié N-D. and Kovacevié N., 2004.,** Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource Technology*, 96 (8): 873-877.

**Mann C-M. COX S-D. et Merkhham J-L., 2000.** The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749, contribute to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30, 294-297.

**Mansour S. El said M. TARIQ M.A. Al-Yahya S. Rafatullah O Ginnawi T. and AGEEL A-M., 1990.** Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine; *Journal of Ethnopharmacology* 28; Ed: ELSEVIER SCIENTIFIC; p: 305-3012.

**Moroh J. Bahi C. Dje K. Loukou Y.G, Guede-Guina F., 2008 :** Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redhead (Rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 77: 44 –61.

## -N-

**Nauciel C. and Vildé J-L., 2005.** Bactériologie médicale, 2ème Ed. Maisson. Paris. 160 p.

**Naczki M and Shahidi F. 2004.** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054 (1-2), pp 95-111.

**Natarajan D. John Britto S. Srinivasan K. Nagamurugan N. Mohanasundari C. Perumal G., 2005.** Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J. Ethnopharmacol*, 102: 123-126.



**-O-**

**Othman A Ismail A, Ghani AN et Adenan I. (2007).** Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* 100, pp 1523–1530.

**Owen P.L et Johns T., 1999.** Xanthine oxidase inhibitory activity of north eastern North American plant remedies used for gout. *J. Ethnopharmacol.* 64: pp 149-160.

**-P-**

**Packer L. Hiramatsu M et Yoshikawa T. 1999.** Antioxidants Food Supplements in Human Health; Ed: ACADEMIC PRESS; pp 35- 41.

**Pietri J et Angelin J.V., 1994.** *Le chamanisme en corse ou la religion du néolithique Arkanorum*, Paris, p 150.

**Pokorny J. Yanishlieva N. Gordon M., 2001.** Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.

**-Q-**

**Quezel P et Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome II Edition. CNRS. Paris 450 p.

**-R-**

**Raven P.H Evert F.E. Eichhorn S-E., 2000.** Biologie végétale. 6eme Ed. De boeck. Paris, bruxelles. 944 p.

**Robert D et Catesson A.M., 2000.** Biologie végétale : caractéristiques et stratégie évolutives des plantes. Organisation végétative. *Wolters Kluwer France Edition*, Volume2, p 320.

**-S-**

**Sacchetti G. Maietti S. Muzzoli M. Scaglianti M. Manfredini S. Radice M. Bruni R., 2005.** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.*, 91: 621-632.

**Sarni-Manchado P. Cheynier V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions *Tec &*

Doc, p 398.

**Schumacher H. Scheibel J et Maller J-K., 2000.** Cross –resistance patterns among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with decreased susceptibility to Ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, pp215-221.

**Selloum M. Djelid Y. Mahemedi A. Belhattab R., 2013.** Polyphenol content and antioxidant activity of organic extract from *Ruta chalepensis* from Bousaada region, The First International Seminar on Medicinal Plants, Health and Environment (SIPMSE'13).

**Shimizu H., 2004.** Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study, *Stroke*, 35 (9) : 2072-2077.

**Si-Mohamed Y. Si-Mohamed C., 2012.** Les plantes aromatiques et médicinales : *Un exemple de développement humain au Maroc la coopérative féminine de Ben Karrich – Tétouan.* exposition photographique, p 20.

**Sosa T. Alias J.C. Escudero J.C. and Chves N., 2005.** Interpopulational variation in the flavonoid composition of *cistus ladanifer* L. exudates. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 353-364.

**Spigno G. Tramelli L. and Faveri D.M.D., 2007.** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81(1):200-208.

**Stojanovi G. Radulovi. Hashimoto T. Pali R., 2005.** In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology* 101, 185–190.

-T-

**Tim C.T.P. and Andrew J.L., 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 26:343–356.

**Trosznska A. Estrella I. Amores M.L.L et Hernandez T., 2002.** Antioxidant activity of pea (*Pisum Stivum*) seed coat acetone extract. *Lebens. Wiss. Technol.*, 35: pp 158-164.



**Trumbeckaite S, Benetis R, Bumblauskiene L, Burdulis D, Janulis V, Toleikis A, Viškelis P, Jakštas V., 2011** . *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. *Food Chemistry* 127 1540–1548.

**Tuberosa C.I.G. Montorob P. Piacente S. Corona G. Deiana M. Dessi M.A. Pizza C. Cabras P., 2009**. Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50, pp 440–448.

**Torres R. et al., 2006**. Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappus multifolius*; *Phytochemistry* 67; Ed: ELSEVIER; p: 984-987.

-U-

**Ulanowska K. Majchrzyk A. Moskot M. Jakbkiewicz-Banecka J. and W\_Âgrzyn G., 2007**. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*; 62: 132-135.

-V-

**Van Acker SA. Tromp MN. Haenen GR. Van Der Vijgh WJ. Bast A., 1995**. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214,755–759

-W-

**Wollgast J. et Anklam E., 2000**. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33, 423 - 447.

**Wu H., 2007**. Isolation and characterization of natural products from inger and *Allium Ursinum*. *ProQuest Edition*, p 28.

# Annexes



## Annexe 1

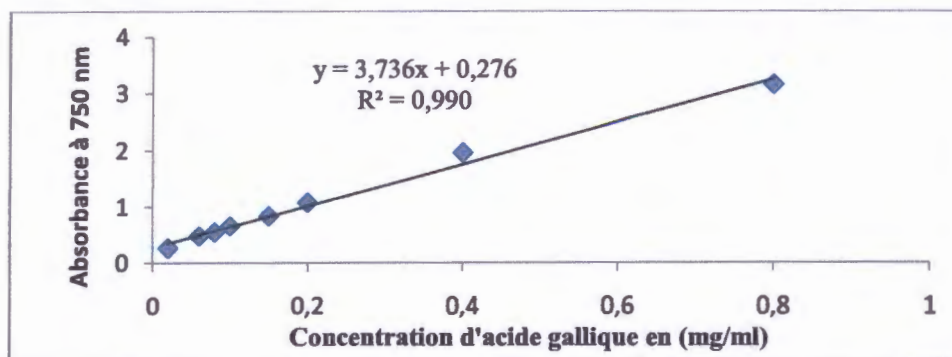


Figure 1 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux d'extrait ethanolique

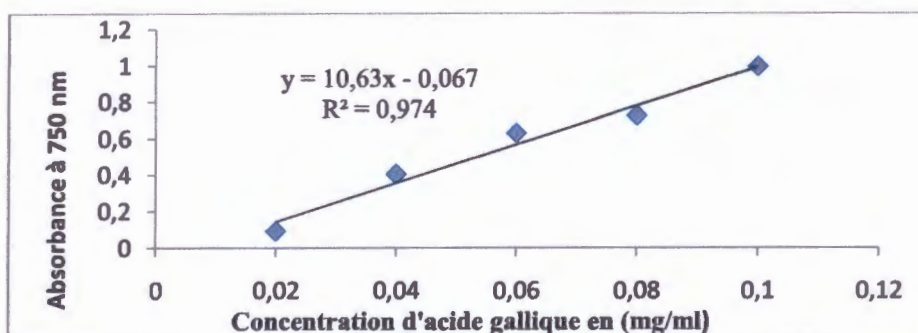


Figure 2 : Courbe d'étalonnage des phénols polaires d'extrait ethanolique.

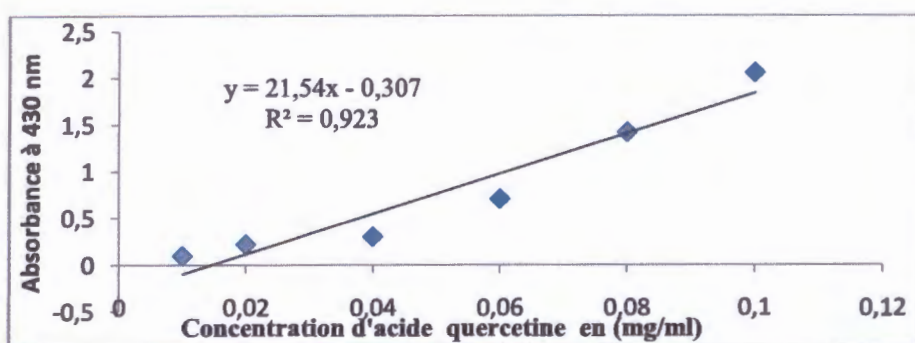


Figure 3 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes d'extrait ethanolique.

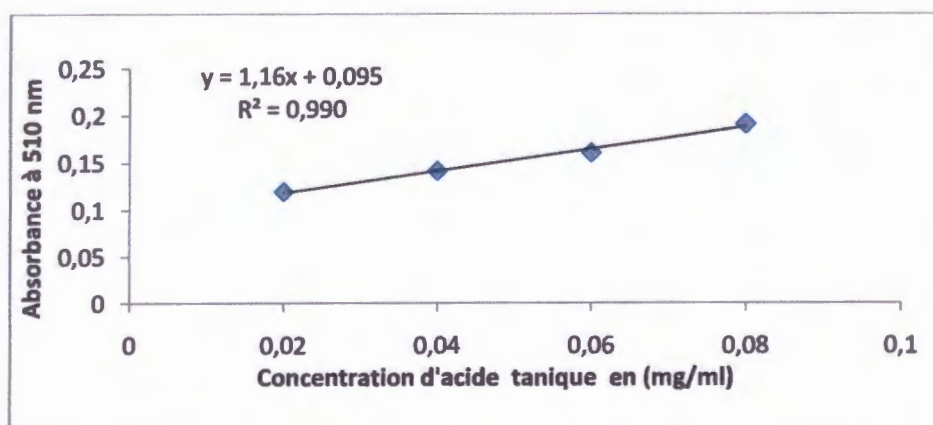


Figure 4: Courbe d'étalonnage des tanins d'extrait ethanolique.

**Tableau 01 : Teneurs des différents extraits en Polyphénols totaux.**

Extraits	Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait)	
	<i>Achillea ligustica</i>	<i>Ruta chalepensis</i>
Ethanolique	165,284	377,810
Acétate d'éthyle	9,208	2,687
Aqueux acétate d'éthyle	3,319	0,79
Chloroforme	20,128	15,337
Aqueux chloroforme	7,173	10,332
Hexane	16,556	15,98
Aqueux hexane	7,08	5,996

**Tableau 02: Teneurs des différents extraits en Polyphénols polaires et apolaires.**

Extraits	Teneurs en polyphénols polaires et apolaires (mgEAG/g d'extrait)			
	<i>Achillea ligustica</i>		<i>Ruta chalepensis</i>	
	polaires	apolaires	polaires	apolaires
Ethanolique	14,299	150,985	8,512	369,298
Acétate d'éthyle	6,148	3,06	6,905	19,969
Aqueux acétate d'éthyle	1,007	2,312	0,729	0,13
Chloroforme	2,446	17,683	3,137	12,2
Aqueux chloroforme	2,465	4,709	1,797	8,535
Hexane	1,936	14,818	2,582	13,397
Aqueux hexane	2,295	4,784	1,867	4,129



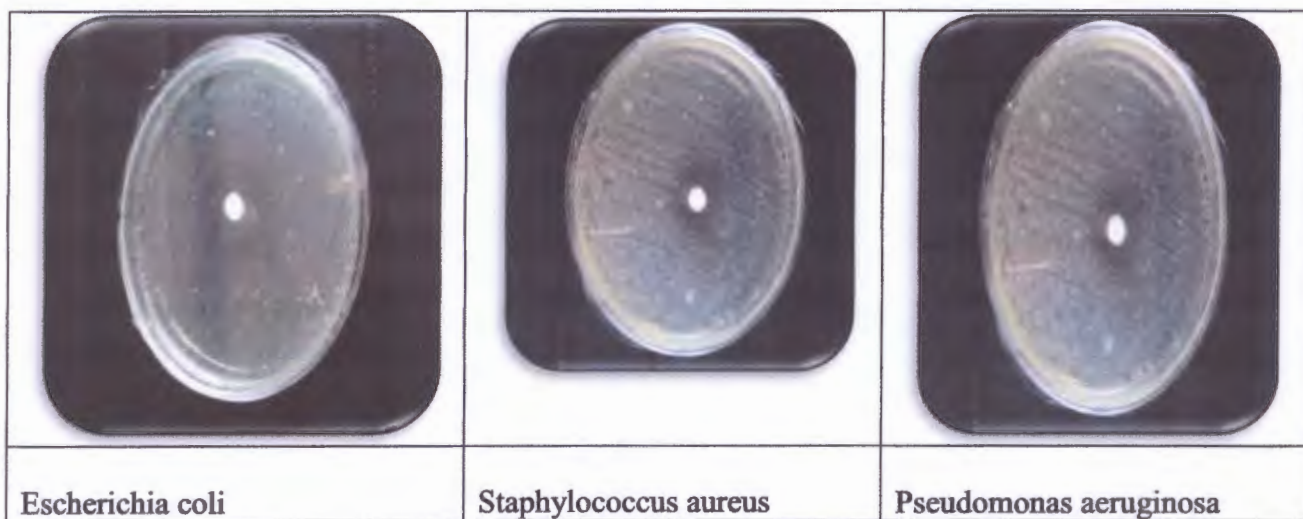
**Tableau 03:** Teneurs des différents extraits en flavonoïdes.

Extraits	Teneurs en flavonoïdes (mg EQ /g d'extrait)	
	<i>Achillea ligustica</i>	<i>Ruta chalepensis</i>
Ethanolique	19,336	21,425
Acétate d'éthyle	7,321	10,896
Aqueux acétate d'éthyle	1,641	1,764
Chloroforme	8,138	4,545
Aqueux chloroforme	3,278	4,062
Hexane	5,7196	6,462
Aqueux hexane	2,616	2,166

**Tableau 04 :** Teneurs des différents extraits en tannins.

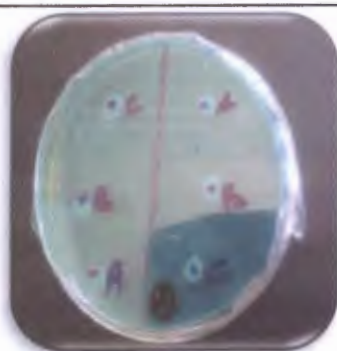
Extraits	Teneurs en tannins (mg EAT /g d'extrait)	
	<i>Achillea ligustica</i>	<i>Ruta chalepensis</i>
Ethanolique	28,362	11,255
Acétate d'éthyle	5,948	5,26
Aqueux acétate d'éthyle	0	0
Chloroforme	98,41	18,36
Aqueux chloroforme	73,31	15,46
Hexane	22,96	15,11
Aqueux hexane	11,76	17,06

## Annexe 2

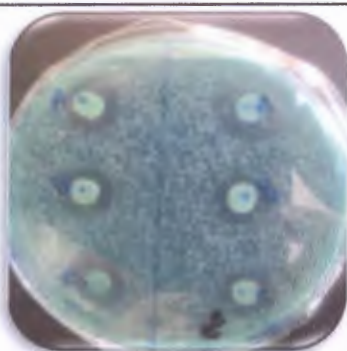


**Figure 01:** teste positives d'antibiotique (Ciprofloxacine 0.5 mg/ml).

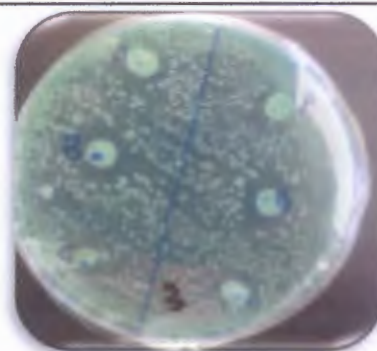




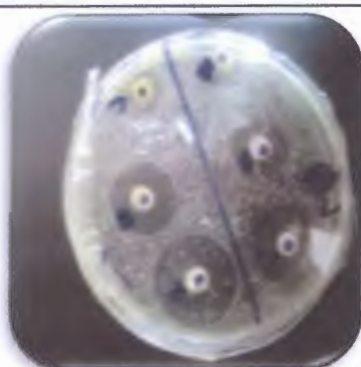
**Pseudomonas-Extrait  
AE- *Achillea ligustica***



**Escherichia coli-Extrait AE-  
*Achillea ligustica***



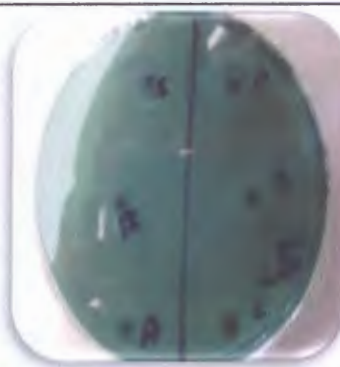
**Staphylococcus- Extrait AE-  
*Achillea ligustica***



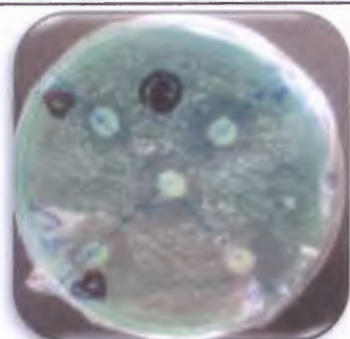
**Escherichia coli-Extrait AE-  
*Ruta chalepensis***



**Pseudomonas -Extrait AE-  
*Ruta chalepensis***



**Staphylococcus -Extrait AE-  
*Ruta chalepensis***



**Staphylococcus- Extrait ET-  
*Achillea ligustica***



**Staphylococcus -Extrait ET-  
*Ruta chalepensis***



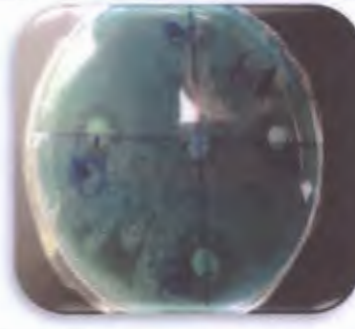
**Pseudomonas-Extrait  
ET- *Achillea ligustica***



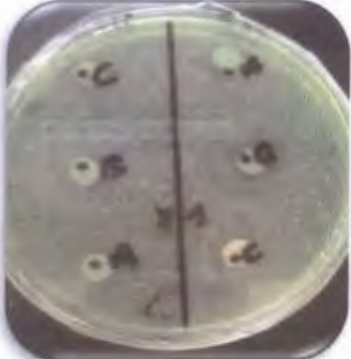


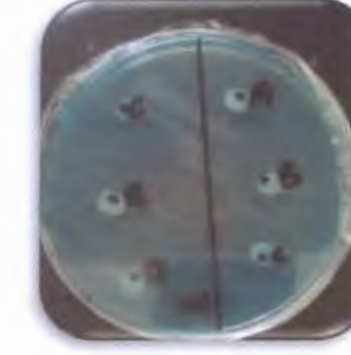


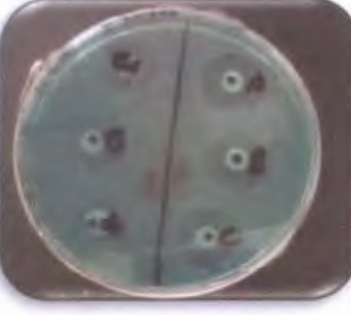





**Pseudomonas -Extrait ET-  
*Ruta chalepensis***







**Escherichia coli-Extrait ET-  
*Achillea ligustica***



**Escherichia coli -Extrait ET-  
*Ruta chalepensis***

		
<p><b>Escherichia coli-Extrait CHL-<i>Ruta chalepensis</i></b></p>	<p><b>Staphylococcus- Extrait CHL-<i>Achillea ligustica</i></b></p>	<p><b>Staphylococcus -Extrait CHL-<i>Ruta chalepensis</i></b></p>
		
<p><b>Pseudomonas -Extrait CHL-<i>Ruta chalepensis</i></b></p>	<p><b>Escherichia coli-Extrait CHL-<i>Achillea ligustica</i></b></p>	<p><b>Pseudomonas-Extrait CHL-<i>Achillea ligustica</i></b></p>
		
<p><b>Pseudomonas -Extrait HEX-<i>Ruta chalepensis</i></b></p>	<p><b>Escherichia coli-Extrait HEX-<i>Ruta chalepensis</i></b></p>	<p><b>Staphylococcus -Extrait HEX-<i>Ruta chalepensis</i></b></p>
		
<p><b>Escherichia coli-Extrait HEX-<i>Ruta chalepensis</i></b></p>	<p><b>Staphylococcus- Extrait HEX-<i>Ruta chalepensis</i></b></p>	<p><b>Pseudomonas-Extrait HEX-<i>Ruta chalepensis</i></b></p>



<i>Achillea ligustica</i>	HEX- <i>Achillea ligustica</i>	<i>Achillea ligustica</i>
		
<i>Klebsiella-Extrait ET- Ruta chalepensis</i>	<i>Klebsiella-Extrait ET- Achillea ligustica</i>	
		
<i>Klebsiella-Extrait AE- Ruta chalepensis</i>	<i>Klebsiella-Extrait AE- Achillea ligustica</i>	

**Figure 02 :** Présentation de la différence dans la zone d'inhibition de la croissance de trois souches bactériennes.



**Figure 03:** teste négatif (les solvants).

## Annexe 3

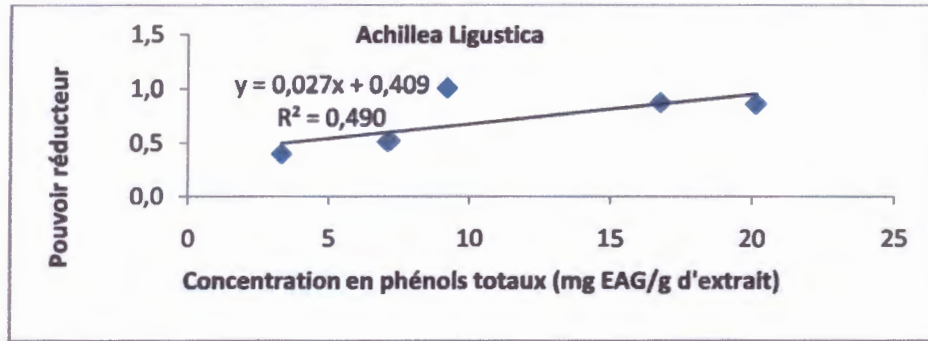


Figure 1 : corrélation entre le pouvoir réducteur et les polyphénols totaux.

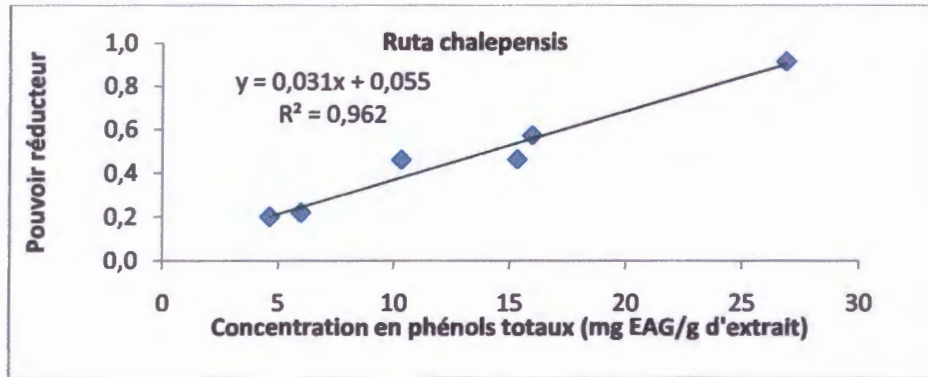


Figure 2 : corrélation entre le pouvoir réducteur et les polyphénols totaux.

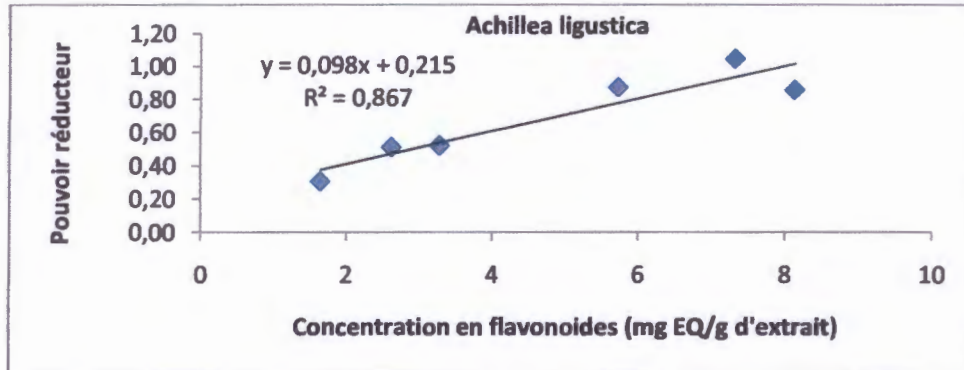


Figure 3 : corrélation entre le pouvoir réducteur et les flavonoïdes.

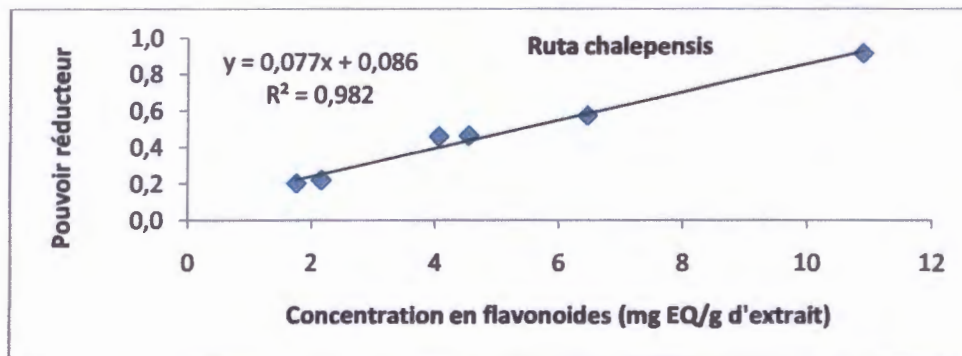
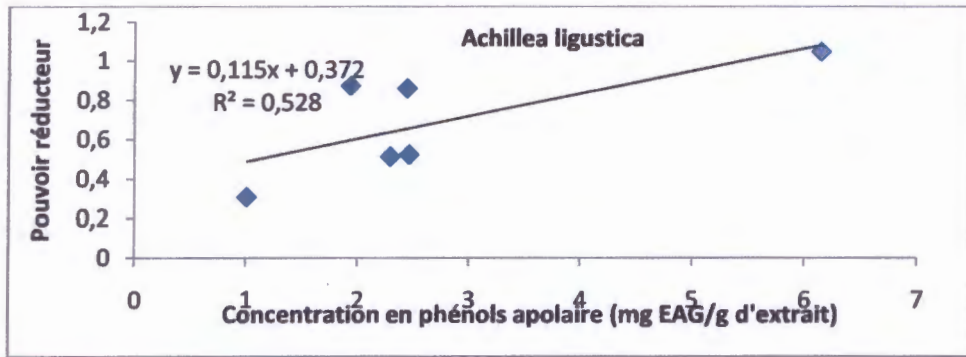
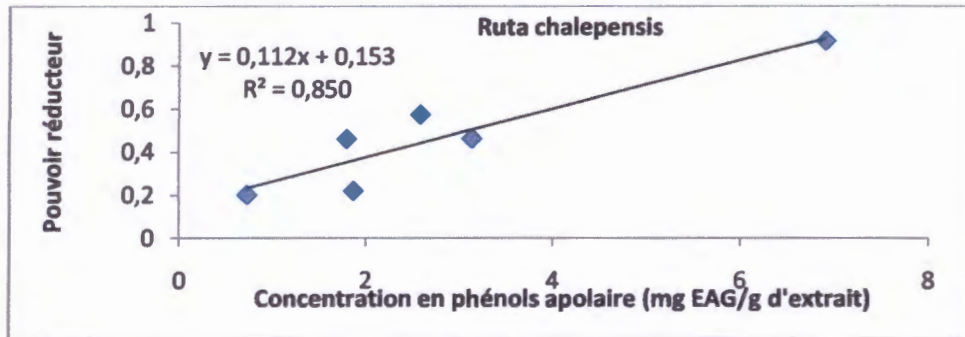


Figure 4 : corrélation entre le pouvoir réducteur et les flavonoïdes.

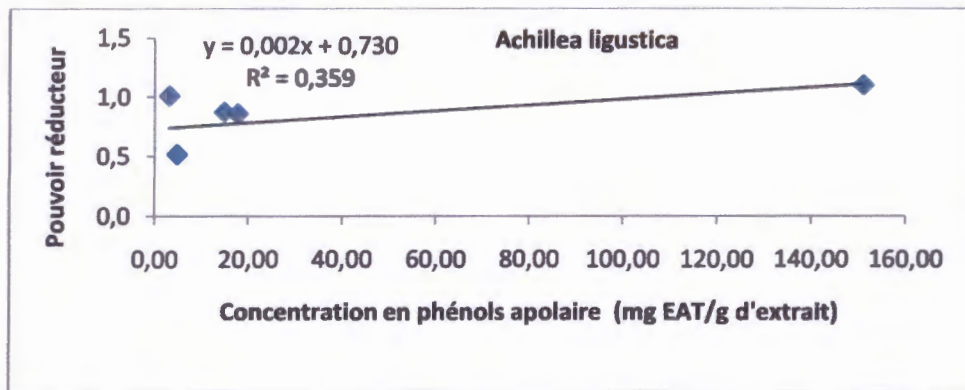




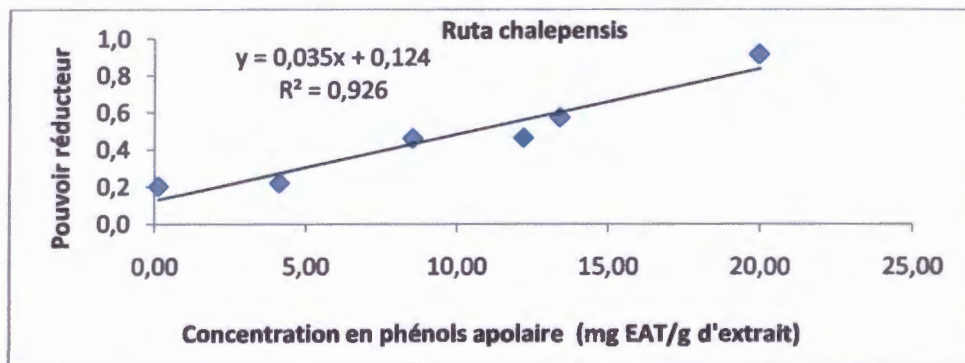
**Figure 5 :** corrélation entre le pouvoir réducteur et les phénols polaire.



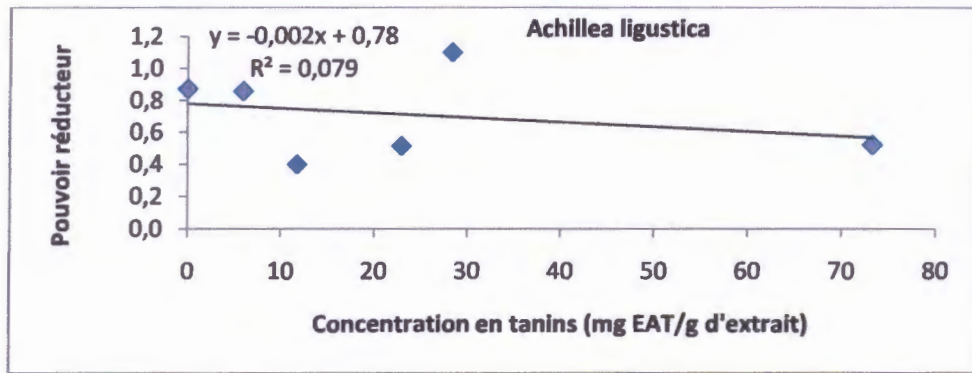
**Figure 6:** corrélation entre le pouvoir réducteur et les phénols polaire.



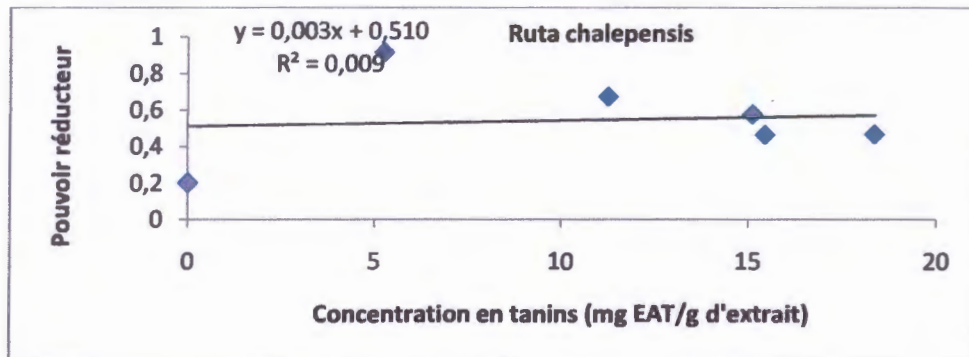
**Figure 7:** corrélation entre le pouvoir réducteur et les phénols apolaire.



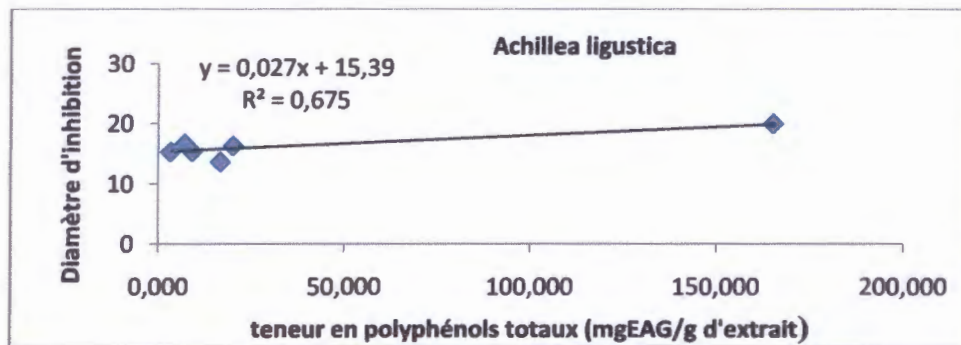
**Figure 8:** corrélation entre le pouvoir réducteur et les phénols apolaire.



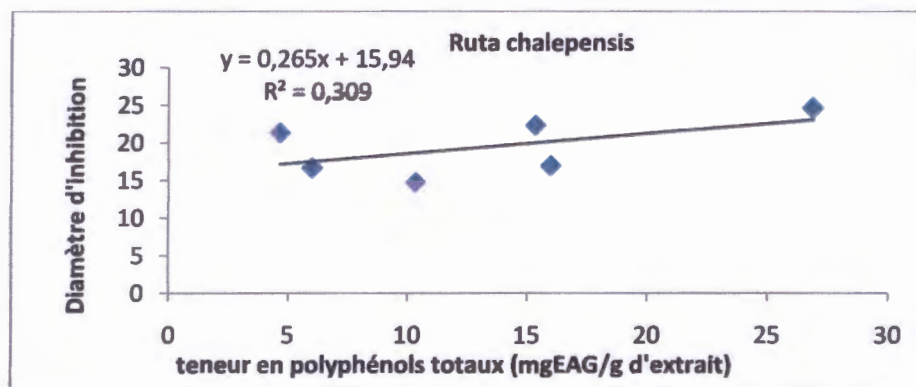
**Figure 9** : corrélation entre le pouvoir réducteur et les tanins.



**Figure 10** : corrélation entre le pouvoir réducteur et les tanins.

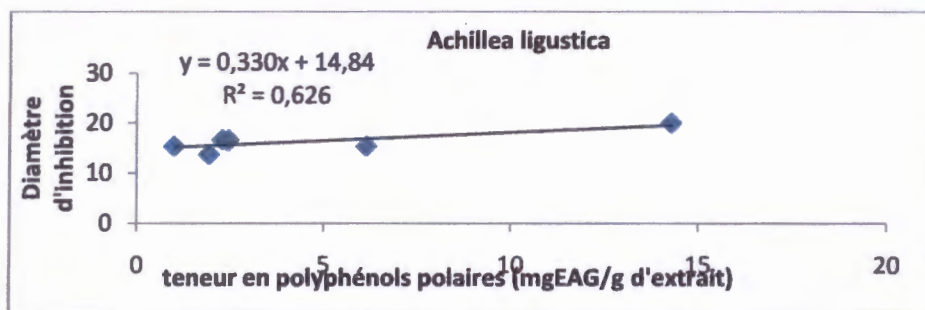


**Figure 11**: Corrélation entre le diamètre d'inhibition des bactéries et les polyphénols totaux.

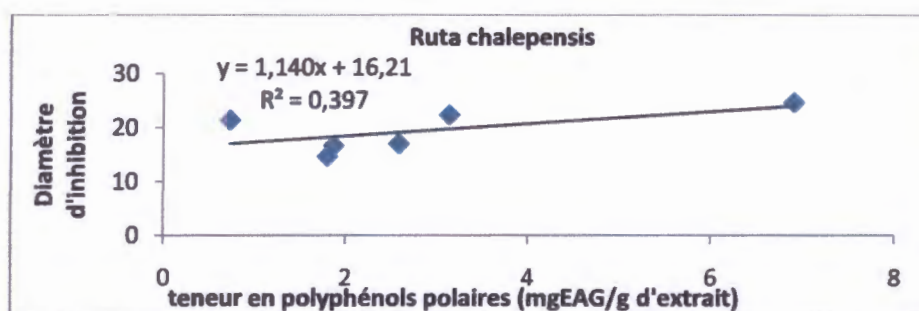


**Figure 12**: Corrélation entre le diamètre d'inhibition des bactéries et les polyphénols totaux.

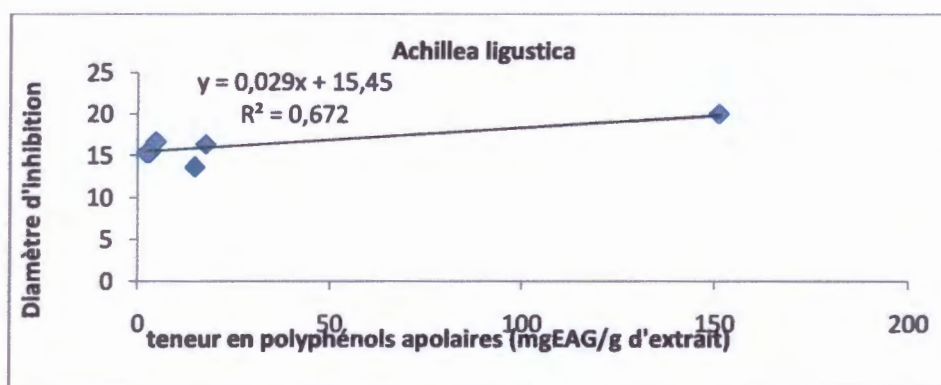




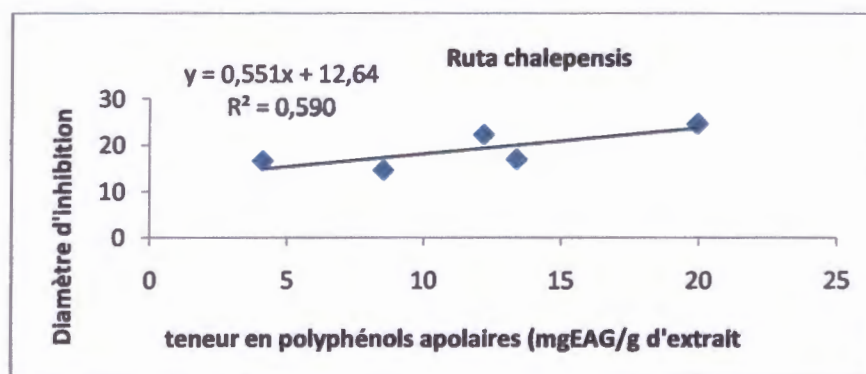
**Figure 13 :** Corrélation entre le diamètre d'inhibition des bactéries et les polyphénols polaires.



**Figure 14 :** Corrélation entre le diamètre d'inhibition des bactéries et les polyphénols polaires.



**Figure 15 :** Corrélation entre le diamètre d'inhibition des bactéries et les polyphénols apolaires.



**Figure 16:** Corrélation entre le diamètre d'inhibition des bactériens et les polyphénols apolaires.

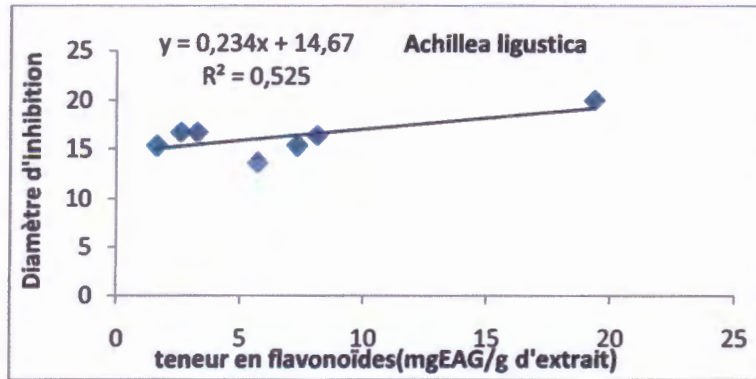


Figure 17 : Corrélation entre le diamètre d'inhibition des bactéries et les flavonoïdes.

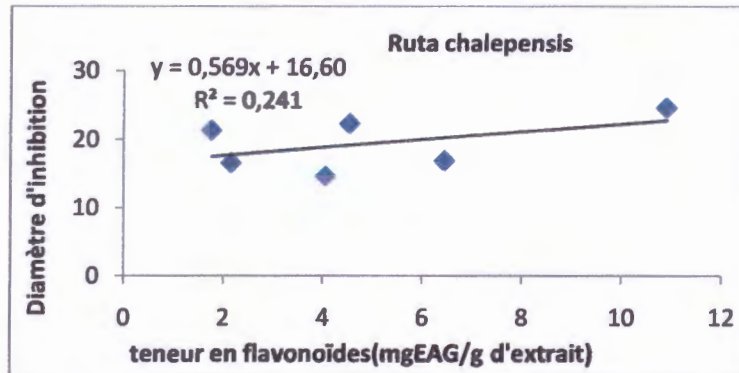


Figure 18 : Corrélation entre le diamètre d'inhibition des bactéries et les flavonoïdes.

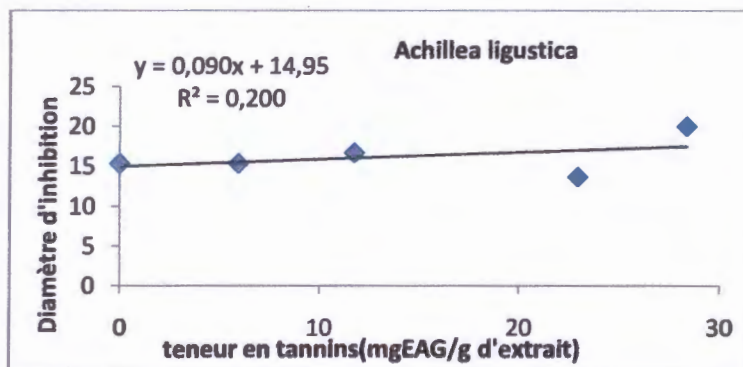


Figure 19: Corrélation entre le diamètre d'inhibition des bactéries et les tannins.

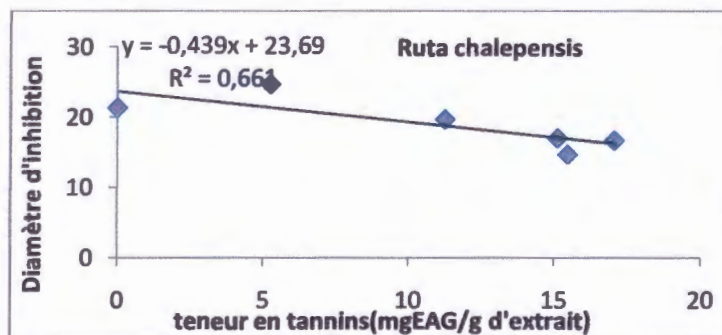


Figure 20 : Corrélation entre le diamètre d'inhibition des bactéries et les tannins.



**Contribution à l'étude des composés phénoliques des extraits de *Ruta chalepensis* et *Achillea ligustica* et évaluation *in vitro* de leurs activités biologiques.**

Réalisé par :

Méradji Besma

Tebbakh Ratiba

Date de soutenance :  
03 Juillet 2016

**Résumé**

Afin de valoriser et exploiter le patrimoine végétal dans plusieurs domaines pharmacologique, médical et agro-alimentaire, nous nous sommes intéressées dans ce travail à l'étude des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de deux plantes médicinales (*Achillea ligustica* et *Ruta chalepensis*). Les résultats obtenus montrent la richesse de l'extrait éthanolique de *Ruta chalepensis* en phénols totaux (377,81 mg EAG /g d'extrait) et en flavonoïdes (21,425 EQ/g d'extrait) par rapport à *Achillea ligustica*. Cette dernière est riche en tannins avec une valeur très importante dans l'extrait chloroforme (98,41 mg EAT /g d'extrait). Les méthodes d'activité antioxydante montrent des pouvoirs moyens de réduction de Fer et de piégeage du radical libre DPPH comparés à celui de l'acide ascorbique. Tous les extraits de *Ruta chalepensis* et *Achillea ligustica* présentent une importante activité antibactérienne par rapport à l'antibiotique.

**Mots clés :** *Achillea ligustica*, *Ruta chalepensis*, composés phénoliques, pouvoir réducteur, DPPH, activité antibactérienne.

**Abstract**

In order to develop and operate the plant heritage in several pharmacological, medical and food industry, we are interested in this work to the study of phenolic compounds and evaluation of the antioxidant and antibacterial activity of two medicinal plants (*Achillea ligustica* and *Ruta chalepensis*). The results show the richness of the ethanol extract of *Ruta chalepensis* total phenols (EAG 377.81 mg / g extract) and flavonoids (21.425 EQ / g extract) from *Achillea ligustica*. The latter is rich in tannins with a very important value in the chloroform extract (98.41 mg EAT / g of extract). The methods of antioxidant activity show average powers of iron reduction and sequestration of free radical DPPH compared to that of ascorbic acid. All sample *Ruta chalepensis* and *Achillea ligustica* exhibit significant antibacterial activity compared with the antibiotic.

**Keywords:** *Achillea ligustica*, *Ruta chalepensis*, phenolic compounds, reducing power, DPPH, antibacterial activity.

ملخص: من أجل تطوير واستغلال الميراث النباتي في مختلف المجالات الصيدلانية, العلاجية و الزراعية الغذائية, اهتمنا في هذا العمل بدراسة المكونات الفينولية وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة و البكتيريا لنوعين من النباتات الطبية (الأخيلة والفجل). حيث أظهرت النتائج غنى نبتة الفجل بالفينولات الكلية, والفلافونويدات مقارنة مع نبتة الأخيلة. هذه الأخيرة غنية بالدباغ بنسبة عالية لمستخلص الكلوروفورم. أظهرت طرق نشاط مضاد الأكسدة قدرة متوسطة على إرجاع الحديد وعزل الجذور الحرة DPPH التي تم مقارنتها مع حمض الأسكوربيك. كل من مستخلصات نبتة الفجل والأخيلة تظهر أهمية في النشاط ضد البكتيريا بالنسبة للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الأخيلة, الفجل, المركبات الفينولية, القدرة الارجاعية, DPPH, مضادات البكتيريا

