

Mémoire

Présenté par

Mr BECHAMI Sofiane

Pour l'obtention du diplôme de Magister

Filière : Biologie

Option : Ingénierie Biochimique et Biotechnologie

Thème

Les polyphénols de *Teucrium fruticans* et leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes

Soutenu le : 13/01/2016

Devant le jury composé de :

| | | | |
|--|------------|-----------------|------------|
| <i>M^{me}</i> BEDJOU F | Professeur | Univ. de Bejaïa | Président |
| <i>M^{me}</i> BEN ABDESSELAM F | Professeur | Univ. de Bejaïa | Rapporteur |
| <i>M^{me}</i> KHETTAL B | MCA | Univ. de Bejaïa | Examineur |
| <i>Mr</i> OUCHEMOUKH S | MCA | Univ. de Bejaïa | Examineur |

Année universitaire : 2014-2015

DEDICACE

*À la mémoire de mon **Père***

*À ma chère **Mère***

*Qui m'ont aidé à être ce que je suis, Pour leur soutien tout le long de
mes études, avec tant d'amour et d'affection*

*À la mémoire de mon frère **Abdelnour**, que dieu repose son âme en
paix*

*À mes **Sœurs** et **Frères**, et à toute la **Famille***

*À mes **Amis***

À tous ceux que j'aime

À ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

REMERCIEMENTS

*Je remercie **DIEU** tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui m'a permis de mener à bien ce travail.*

*Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à ma promotrice **M^{me} BEN ABEDESSELAM Fadila**, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Bejaïa qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.*

*Je remercie également **M^{me} BEDJOU Fatiha**, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Bejaïa d'avoir accepté de présider le jury.*

*Je remercie **M^{me} KHETTAL Bachra**, Docteur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Bejaïa d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.*

*Je remercie **Mr OUCHEMOUKH Salim**, Docteur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Bejaïa, d'avoir accepté d'être parmi les membres du jury de ce mémoire.*

Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous

Sommaire

| | |
|------------------------|---|
| Résumés | |
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Introduction | 1 |

Partie bibliographique

Chapitre I

Propriétés biologiques de *Teucrium fruticans* L.

| | |
|--|----|
| 1. Propriétés botaniques | 2 |
| 1.1. Généralités | 2 |
| 1.2. Classification | 3 |
| 1.3. Caractéristiques morphologiques..... | 3 |
| 1.4. Nomenclature..... | 5 |
| 1.5. Ecologie et répartition géographique | 5 |
| 2. Usage traditionnel | 5 |
| 3. Propriétés biochimiques et pharmacologiques | 7 |
| 3.1. Données phytochimiques | 7 |
| 3.2. Données pharmacologiques | 12 |

Chapitre II

Les polyphénols

| | |
|---|----|
| 1. Principales substances actives végétales | 13 |
| 2. Les composés phénoliques | 13 |
| 2.1. Généralités | 13 |
| 2.2. Biosynthèse des composés phénoliques | 14 |
| 2.3. Principales classes des polyphénols..... | 16 |
| 3. Les Activités Biologiques..... | 25 |
| 3.1. Activité antioxydante | 25 |
| 3.2. Activité antimicrobienne..... | 28 |

Partie Expérimentale

Chapitre III

Matériel et Méthodes

| | |
|---|----|
| 1. Matériels..... | 32 |
| 1.1. Matériel végétal | 32 |
| 1.2. Préparation des échantillons | 33 |
| 1.3. Appareils et produits chimiques | 34 |
| 1.4. Les souches bactériennes utilisées | 34 |
| 2. Méthodes d'analyses | 36 |
| 2.1. Préparation des extraits | 36 |
| 2.2. Evaluation des dosages en polyphénols..... | 39 |
| 2.3. Activité antioxydante | 42 |
| 2.4. Activité antimicrobienne..... | 45 |
| 2.5. Activité antifongique | 47 |

Chapitre VI

Résultats et discussion

| | |
|---|----|
| 1. Résultats et discussion..... | 47 |
| 1.1. Rendements des extractions..... | 47 |
| 1.2. Composition chimique..... | 47 |
| 1.3. L'activité antioxydante et antiradicalaire | 51 |
| 1.4. L'activité antimicrobienne | 58 |
| Conclusion | 74 |
| Références bibliographiques..... | 76 |
| Annexes | 82 |

Liste des abréviations

AAR : Activité antioxydante relative.

Abs : Absorption.

ALT : Alanine aminotransférase.

ATCC : American type culture collection.

BHT : Butylhydroxytoluène.

BUN : Azote uréique (Urée sanguine).

CK : Créatine kinase.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

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

EAC : Equivalent en acide caféique.

EAG : Equivalent en acide gallique.

EATF : Extrait aqueux tiges et feuilles.

EBr : Extrait brut.

EMTF : Extrait méthanolique tiges et feuilles.

EQ : Equivalent en quercétine.

ERO : Espèces réactifs de l'oxygène.

GSH : Glutathion forme réduite.

GSSG : Glutathion forme oxydée.

HPLC : Chromatographie en Phase liquide à Haute Performance.

IC₅₀: Concentration inhibitrice 50 %.

KDa: kilo Dalton.

m/m : Masse par masse.

MS : Matière sèche.

Phe : Phénylalanine.

R² : Coefficient de corrélation.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

SOD : Superoxyde dismutase.

UFC : Unité Formant Colonie.

UV : Ultraviolet.

V/V : Volume par volume.

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Schémas de la morphologie des différents organes de <i>T. fruticans</i> L.,..... | 4 |
| Figure 2: Structure générale des composés polyphénoliques..... | 8 |
| Figure 3: Dérivatives de fruticolone de <i>T. fruticans</i> L., | 9 |
| Figure 4 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes <i>T. fruticans</i> L., | 9 |
| Figure 5 : Structure générale des néoclérodanes diterpénoides isolés de <i>T. fruticans</i> L.,..... | 10 |
| Figure 6 : Structure des abiétanes diterpénoides dans les racines de <i>T. fruticans</i> L., | 11 |
| Figure 7 : Composés de <i>T. fruticans</i> L., | 11 |
| Figure 8 : Structure de l'acide shikimique (a) et acides cinamique (b)..... | 15 |
| Figure 9 : Principaux acides hydroxycinnamiques..... | 17 |
| Figure 10 : Principaux acides hydroxybenzoïques | 17 |
| Figure 11 : Principaux types de coumarines..... | 17 |
| Figure 12 : Structure chimique de base des flavonoïdes. | 19 |
| Figure 13 : Les diverses classes des flavonoïdes..... | 20 |
| Figure 14 : Exemples de Tannoïdes. | 23 |
| Figure 15 : les systèmes de défense contre les radicaux libres..... | 27 |
| Figure 16 : Photographie de <i>Teucrium fruticans</i> L., dans son site de récolte. | 32 |
| Figure 17 : Photographie des différents organes de <i>T. fruticans</i> | 33 |
| Figure 18 : Différentes étapes de la préparation de la poudre de <i>T. fruticans</i> L. | 33 |
| Figure 19 : Protocole de préparation de l'extrait aqueux..... | 37 |
| Figure 20 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique..... | 38 |
| Figure 21 : Forme libre et réduite du DPPH..... | 44 |
| Figure 22 : Comparaison des rendements des deux extraits de <i>T. fruticans</i> L..... | 48 |
| Figure 23: Teneurs en polyphénols des deux extraits de <i>T. fruticans</i> L..... | 49 |
| Figure 24 : Teneurs en flavonoïdes totaux des deux extraits de <i>T. fruticans</i> L..... | 50 |
| Figure 25 : Teneurs en flavones et flavonols des deux extraits de <i>T. fruticans</i> L. | 51 |
| Figure 26 : Comparaison des diamètres des halos de rétention..... | 53 |
| Figure 27 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 470..... | 54 |
| Figure 28 : Activité anti-oxydante relative des extraits de <i>T. fruticans</i> L.,..... | 55 |
| Figure 29 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT. | 56 |
| Figure 30 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait EATF. | 56 |
| Figure 31 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait EMTF..... | 57 |
| Figure 32 : Activité anti-radicalaire des extraits de <i>T. fruticans</i> L., et le BHT..... | 57 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Classification scientifique de <i>T. fruticans</i> L..... | 3 |
| Tableau 2 : Classification des composés phénoliques..... | 16 |
| Tableau 3 : Résultats du test visuel de β -carotène | 52 |
| Tableau 4 : Diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de quelques antibiotiques..... | 59 |
| Tableau 5 : Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées..... | 60 |
| Tableau 6 : Effet de l'extrait aqueux de <i>T. fruticans</i> sur les bactéries étudiées. | 66 |
| Tableau 7 : Effet de l'extrait méthanolique de <i>T. fruticans</i> sur les bactéries | 68 |
| Tableau 8 : Effet de l'extrait aqueux de <i>T. fruticans</i> sur les champignons étudiés..... | 70 |
| Tableau 9 : Effet de l'extrait méthanolique de <i>T. fruticans</i> sur les champignons..... | 71 |

INTRODUCTION

Introduction

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (Baharun et al., 1996).

Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies liées au stress oxydatif ; expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (Bruneton, 1999).

Cependant, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, anti-oxydante et antimicrobienne demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (Teixeira da Silva, 2004).

Le genre *Teucrium* (*Lamiaceae*) inclut des espèces végétales médicinales bien connue possédants diverses propriétés biologiques (El Oualidi et al., 1999 ; Coll et Tandron, 2005 ; Menichini et al., 2009). Les propriétés thérapeutiques de l'espèce *Teucrium fruticans* L. ont été mises en évidence *in vitro*, elles sont dues à des composés actifs telles que les huiles essentielles, et dans une moindre mesure en polyphénols (Piozzi et al., 2005).

Quoique certains auteurs de pays méditerranéens ont entrepris des études limitées sur cette plante, surtout sur la composition des polyphénols et de ses huiles essentielles (Ulubelen et al., 2000 ; Menichini et al., 2009), en Algérie, du moins à notre connaissance cette espèce végétale n'a pas fait l'objet d'études antérieures.

L'objectif de notre étude est d'estimer la teneur de cette espèce végétale en ces composés actifs, notamment les polyphénols contenus dans la partie aérienne de l'extrait aqueux et méthanolique de la plante et d'en évaluer leur pouvoir biologique.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

**Aspect Botanique et
les Propriétés Biologiques de
Teucrium fruticans L.**

1. Propriétés botaniques

1.1. Généralités

La famille des Labiées (*Lamiaceae*) du latin *Labia* (lèvre), ont des fleurs à forme caractéristique à deux lèvres. C'est une famille cosmopolite d'arbre, arbustes et herbacées qui contient environ 6970 espèces, réparties en 240 genres. En Algérie, 140 espèces végétales appartenant à 29 genres sont répertoriées dans diverses régions et classées selon leurs caractéristiques morphologiques (Quezel et Santa, 1963).

Le genre de *Teucrium* fait partie des genres les plus importants de la famille des Lamiacées, et est réparti en 340 espèces et variétés environs. D'un point de vue taxonomique, elles sont identifiables grâce à la forme du calice et de leur inflorescence. Un grand nombre de travaux ont été publiés récemment sur la taxonomie de ce genre basée sur des études morphologiques (inflorescences et calice), micro morphologiques (trichomes) (El Oualidi et *al.*, 1999), mais les relations au sein du groupe restent confuses. Nous pouvons citer parmi les espèces qui appartiennent à ce genre, *Teucrium fruticans* L.

Les plantes de la famille des Lamiacées bien que répandues dans diverses régions du monde, sont essentiellement localisées dans le bassin méditerranéen (Piozzi et *al.*, 1998). La richesse et la diversité des *T. fruticans* sont largement méconnues, ces plantes se remarquent par leur odeur pénétrante d'où le nom de plantes aromatiques qui leur est attribué. Elles sont utilisées en médecine traditionnelle et en préparation culinaire (Menichini et *al.*, 2009).

1.2. Classification

La classification de *Teucrium fruticans* L., est la suivante (Tab. 1).

Tableau 1 : Classification scientifique de *T. fruticans* L., (Muinby, 1847).

| | |
|-------------------------------|--|
| Règne | <i>Plantae</i> |
| Embranchement | Spermatophytes |
| Sous embranchement (Division) | Angiospermes (<i>Magnoliophyta</i>) |
| Classe | Dicotylédones (<i>Magnoliopsida</i>) |
| Sous classe | <i>Asteridae</i> |
| Ordre | Lamiales |
| Famille | <i>Lamiaceae</i> |
| Genre | <i>Teucrium</i> |
| Espèce | <i>Teucrium fruticans</i> L. |

1.3. Caractéristiques Morphologiques

La famille des Labiées est l'une des premières à être distinguées par les botanistes, et ceci par la particularité de ses caractères : Ce sont des plantes herbacées odorantes, à tiges quadrangulaires, et feuilles en général opposées sans stipules. Le plus souvent hermaphrodites, leurs fleurs pentamères, sont généralement réunies en cymes axillaires plus ou moins contractées simulant souvent des verticilles, ou encore condensées au sommet des tiges, et simulant des épis fruits constitués par 4 akènes plus ou moins soudés par leur face interne (Kästner, 1989).

Le genre *Teucrium*, ou Germandrées, ne diffère des autres genres que par ses corolles formées d'une seule lèvre (Beni Maleci et Servettaz, 1991).

T. fruticans L. est une plante herbacée tapissante (sous arbrisseau bas), vivace, ligneuse, à odeur poivrée par frottement, toujours vers de la zone côtière. Cette végétation naturellement ramifiée et compacte à feuilles persistantes et pétiolées, peut atteindre jusqu'à 120 cm de haut. Elle possède des branches quadrangulaires, de couleur blanc feutré, et des jeunes rameaux sont étalés. Les feuilles grandes presque aussi longues que larges, opposées sessiles, vertes et luisantes en dessus, velues-tomenteuses en dessous, et à tomentum blanc ou brunâtre (Debeaux, 1894). Les feuilles ovales, entièrement cotonneuses en dessous, de courts pétioles sont linéaires-lancéolées à ovoïdes. Elles présentent des bractées sur les tiges. Les tiges sont de 10-30 cm de hauteur, carrées et portent des feuilles allongées et des fleurs bleu violacées. Leur

calice, d'environ de 8 mm de long, est cotonneux et de couleur blanc feutré à l'extérieur, et nu et de couleur bleu à lilas à l'intérieur (Beni Maleci et Servettaz, 1991). La fleur en tube et corolle sans anneau de poils, possède 4 étamines très saillantes. De croissance rapide, la plante peut mesurer jusqu'à 2 m de hauteur sur autant de large. Sa floraison se fait en mars-avril-mai (Fig. 1) (Boullard, 2003).

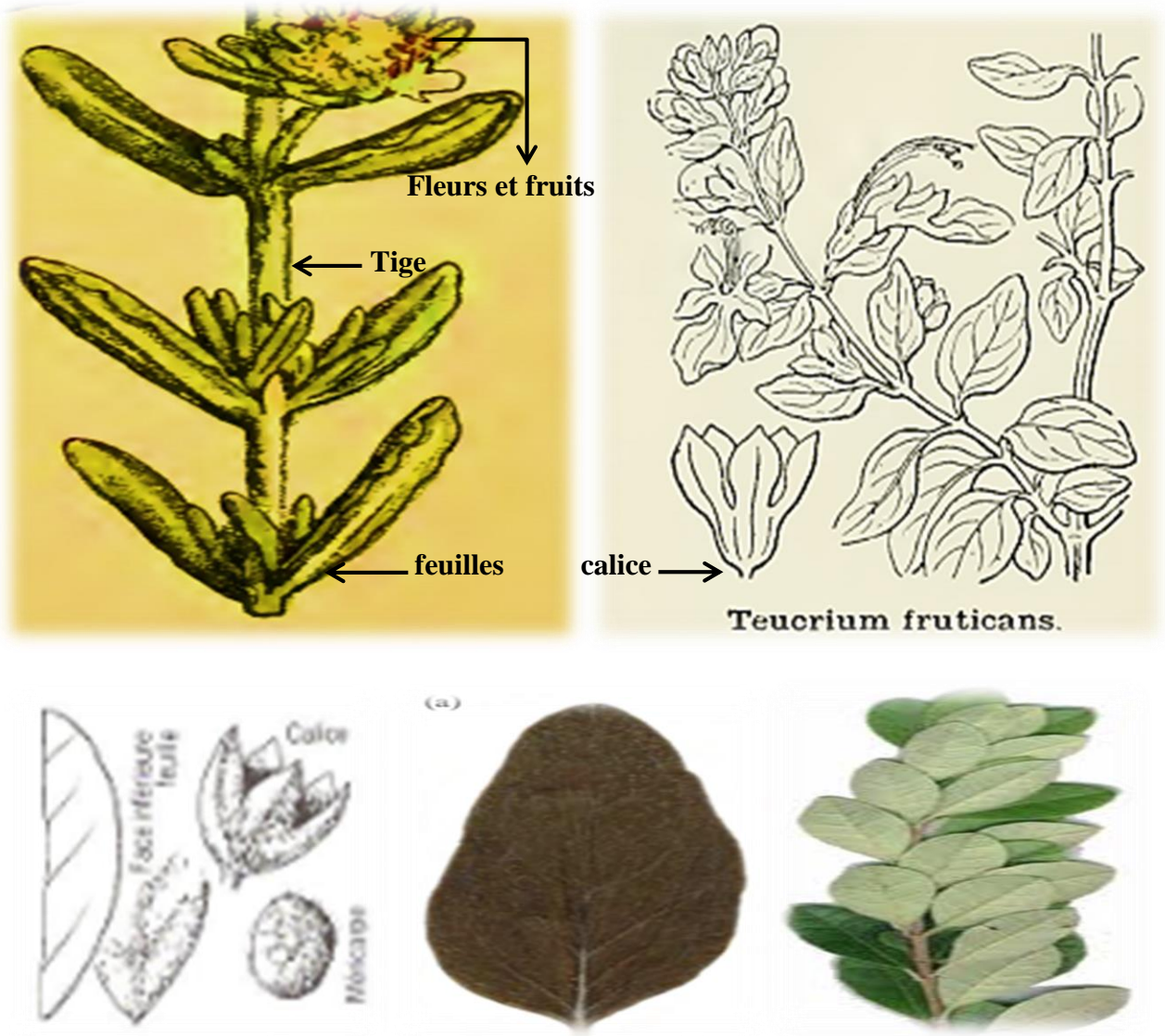


Figure 1 : Schémas de la morphologie des différents organes de *T. fruticans* L., (Lakušić et al., 2010).

1.4. Nomenclature

1.4.1. Nom latin

Le nom générique des Germandrées (Labiées), ou *Teucrion* en latin qui dérive du grec (*τευκρion*), en référence à *Teukris azureum* prince troyen qui aurait découvert les propriétés médicinales de la plante.

Teucrium fruticans L, possède divers synonymes : *Teucrium latifolium*, *Teucrium rotundifolium* (Muinby, 1847 ; Kisiel et *al.*, 2001).

1.4.2. Nom commun

Le nom vernaculaire de *T. fruticans* diffère selon les régions et les pays. En Arabe : Bayyada. En Kabyle : Rihane dhe larde. (Debeaux, 1894). En Anglais : Germander ligneous, arbuste Germander. En Français : Germandrée ligneuse, Germandrée en arbre, Germandrée d'Espagne, Germandrée arbrisseau. En Allemand : Gamander holzigen. En Espagnol : cuquera Leñosa. En Italien : Tomillo legnoso (Beni Maleci et Servettaz, 1991).

1.5. Ecologie et répartition géographique

Ce genre des plantes se développant aussi bien dans les zones méditerranéennes que sahariennes, la *T. fruticans* est largement distribuée dans l'Europe, l'Asie, l'Amérique et l'Australie. Elles sont largement réparties dans le bassin méditerranéen, dans la région du Nord-Ouest de l'Afrique du nord (l'Algérie et le Maroc), et la Serbie et à Monténégro (Lakušić, 2000).

2. Usage traditionnel

Dans la pharmacopée traditionnelle, les Labiées (*Lamiaceae*) sont utilisées dans le traitement de nombreuses affections telles que les problèmes intestinaux, le météorisme (ballonnement du ventre, dû à des gaz). On note également l'utilisation comme diurétique ou antisiphilitique, Anti-diarrhéique, antiseptique. Plusieurs études scientifiques ont confirmé l'intérêt pharmacologique d'un grand nombre d'espèces de la famille des Lamiacées (Menichini et *al.*, 2009).

Le genre *Teucrium* est la plupart du temps très utilisé en pharmacopée traditionnelle depuis plus de 2000 ans. Dans de nombreuses régions particulièrement dans les pays en voie de développement, les propriétés pharmacologiques de certaines espèces utilisées en médecine traditionnelle ont été démontrées par des études scientifiques, portant sur différents types d'extraits (méthanolique, éthanolique) de divers organes de la plante.

Ce genre est l'une des principales sources de culinaire, légumes et de plantes médicinales du monde entier (Maccioni et *al.*, 2007), L'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle revient surtout à leur composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes communs à de nombreuses espèces de ce genre. Les maladies pour lesquelles ces espèces sont utilisées sont très diverses, beaucoup d'entre elles sont utilisées dans la médecine populaire comme inotropique, chronotropique, antipyrétique, cholagogue (Khleifat et *al.*, 2002), anthelminthique, anorexiques, antibactériens (Camarda, 1990), diaphorétique, tonifiant et des effets analgésiques. Elle est utilisée comme cicatrisant, anti-inflammatoire (Menichini et *al.*, 2009) et dans le traitement du cancer. L'activité antioxydante a été également démontrée (Özkan et *al.*, 2007), ainsi que antidiabétique et carminative (Gharaibeh et *al.*, 1988).

T. fruticans en particulier a démontré son efficacité dans de nombreuses affections. on peut citer à titre d'exemples son utilisation en tant que antispasmodique, hypolipidémique (Ulubelen et *al.*, 2000), et cas de désordres stomacaux et gastro-intestinaux tels que la colite. La plante peut être utilisée soit sous forme de poudre, soit sous forme sirop herbacée ou de décoction (fleurs et feuilles) pour entre autres stimuler l'appétit des enfants et comme une boisson rafraîchissant ou épices (Bosisio et *al.*, 2004). L'utilisation de la plante a aussi été signalée dans le traitement symptomatique de trouble digestifs et dans celui des états neurotoniques des adultes et des enfants notamment en cas de trouble mineurs de sommeil, a été signalé (Bruneton, 1993).

Elle est utilisée dans les périodes de stress, car elle permet de se relaxer, de se détendre, d'être serein et plein d'énergie, par la diminution de l'anxiété et la lutte contre la fatigue et l'agressivité. De plus, elle favorise le sommeil et permet également de stimuler la mémoire, d'augmenter sa concentration et sa lucidité. Elle possède également une action bénéfique sur la digestion, ses propriétés anti-stress et antioxydantes permettent de lutter contre le vieillissement de la peau, elle est aussi bien conseillée pour les personnes stressées, que les personnes de plus de 50 ans et les sportifs (Lagnika, 2005).

3. Propriétés biochimiques et pharmacologiques

3.1. Données phytochimiques

Le genre *Teucrium* a fait l'objet de plusieurs enquêtes dans les dernières années, il a été démontré la présence de différentes classes de composés tels que les esters d'acides gras, diterpènes, divers groupes de composés sont étudiés du point de vue chimique ce qui permet d'isoler un grand nombre de substances connues pour leur diverses activités biologiques, à titre d'exemple : les alcaloïdes, les terpenoïdes, les iridoides, les monoterpènes, sesquiterpènes hydrocarbonés, triterpènes et stéroïdes et les composés phénoliques et flavonoïdes (De Vincenzi et al., 2003).

La plupart des plantes contiennent les composés polyphénoliques, qui sont les meilleurs antioxydants (Fig. 2) (Rice-Evans et al., 1997). Les flavonoïdes et les tannins se trouvent en grande quantité dans *T. fruticans* (Kisiel et al., 2001), qui contient aussi des huiles essentielles, des acides phénoliques et d'autres substances, en particulier les diterpènes (Fig. 3) (Sosa et Tonn, 2006). Plusieurs chercheurs ont évalué la composition chimique de *T. fruticans* issues de différents secteurs géographiques. La plupart de ces études basées sur l'analyse des extraits par les méthodes chromatographiques en phase gazeuse ont indiqué la présence de plusieurs composés incluant principalement les flavonoïdes, polyphénols (Sosa et Tonn, 2006), Diterpènes (Menichini et al., 2009), les huiles essentielles (Wile et Chichester, 2001), iridoides, tannins et alcaloïdes. Une recherche sur les fractions chromatographiques plus polaires d'un extrait acétonique de la partie aérienne de cette plante a permis l'isolement des acides esters β -D-glucopyranoside (24S)-24-ethylcholesta-5,25-dien-3b-yl et steryl glucoside esters (Fontana et al., 1999).

Les flavonoïdes qui ont été isolées de *T. fruticans* comprennent flavonoïdes aglycones, flavone aglycone, cirsiol. La présence (cirsimaritin et steryl glucoside esters), antioxydants potentiels, a été signalée (Harborne et al., 1986). Une étude menée sur l'extrait acétonique de l'espèce *T. fruticans* a permis d'obtenir 4 composés de la famille des flavonoïdes qui ont été isolés et identifiés à savoir : le 5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetraméthoxyflavone, 5, 4'-dihydroxy-6, 7, 3'-triméthoxyflavone (cirsilinoléol), 5, 4'-dihydroxy-6, 7-diméthoxyflavone (cirsimaritin), 5, 3', 4'-trihydroxy-6, 7-diméthoxyflavone (cirsiol) (Fig. 4) (Kisiel et al., 2001).

T. fruticans L. constitue une source riche en néoclerodane diterpénoïdes, (Piozzi et al., 2005). Particulièrement les furano néoclerodanes (Piozzi, 1998), l'un de ces composants majeurs est la Teucriinée A, le carbure, l'acide spanosidique et la choline. Certains terpénoïdes de courte chaîne et les huiles essentielles sont responsables de l'odeur et du goût de ces plantes

(Harborne et *al.*, 1986). La Fruticulin A et Demethyl fruticulin A sont deux diterpènes quinone isolés de l'espèce *T. fruticans* ces structures ont été déterminées par RMN (Fig. 5) (Valantvetschera et *al.*, 2003).

Dans les racines de *T. fruticans* deux nouveaux diterpénoïdes réarrangés d'abiétane (Savona et *al.*, 1978), les teuvincenones F et G ce sont des dérivés de la teuvincenone E, ont été isolés (Bruno et *al.*, 1990) ; et aussi les trois composés précédemment connus (ferruginol et teuvincenones A et B) (Fig. 6) (Coll et Tandrón, 2005). Quatre néoclerodanes ont été retrouvés dans les extraits de *T. fruticans*, fruticolone, isofruticolone (Bruno et *al.*, 1999), fruticolide, 8b-hydroxyfruticolone (Fig. 7) (Piozzi et *al.*, 1998). Plusieurs travaux, réalisés *in vitro* et *in vivo*, rapportent des résultats intéressants pour certaines molécules antioxydantes d'origine végétale telle que les dicatéchols, la curcumine, les triterpènes pentacycliques et les flavonoïdes (Coll et Tandrón, 2004).

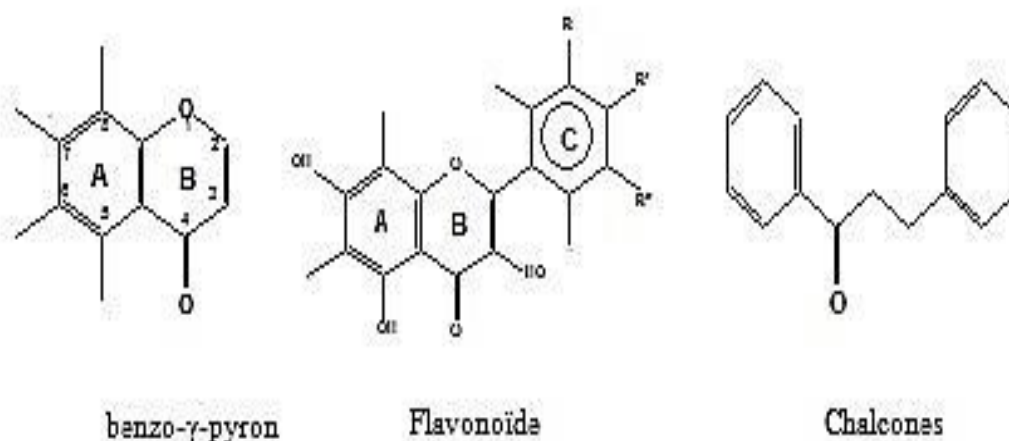


Figure 2: Structure générale des composés polyphénoliques (Yao et *al.*, 1995).

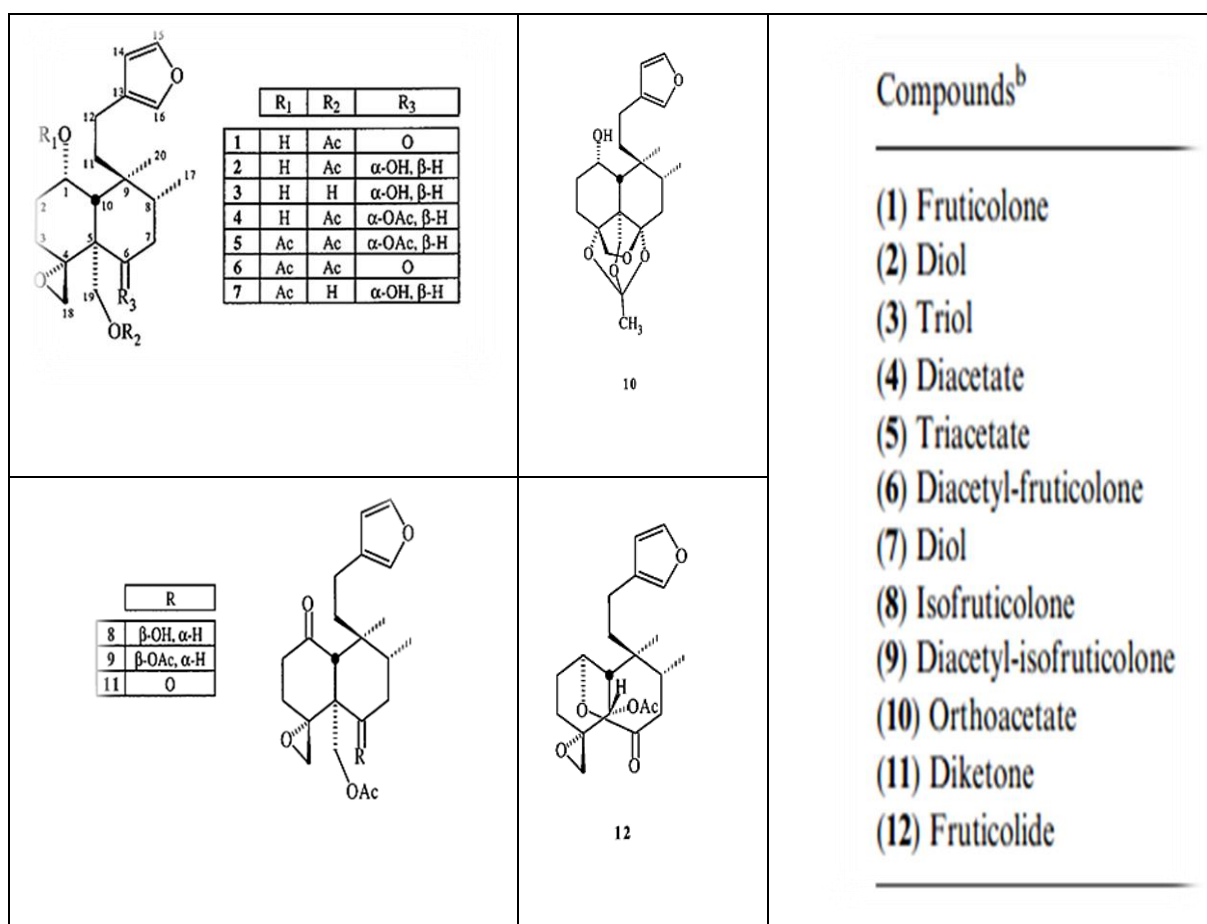


Figure 3: Dérivatives de fruticolone de *T. fruticans* L., (Bruno et al., 1999 ; Coll et Tandron, 2004).

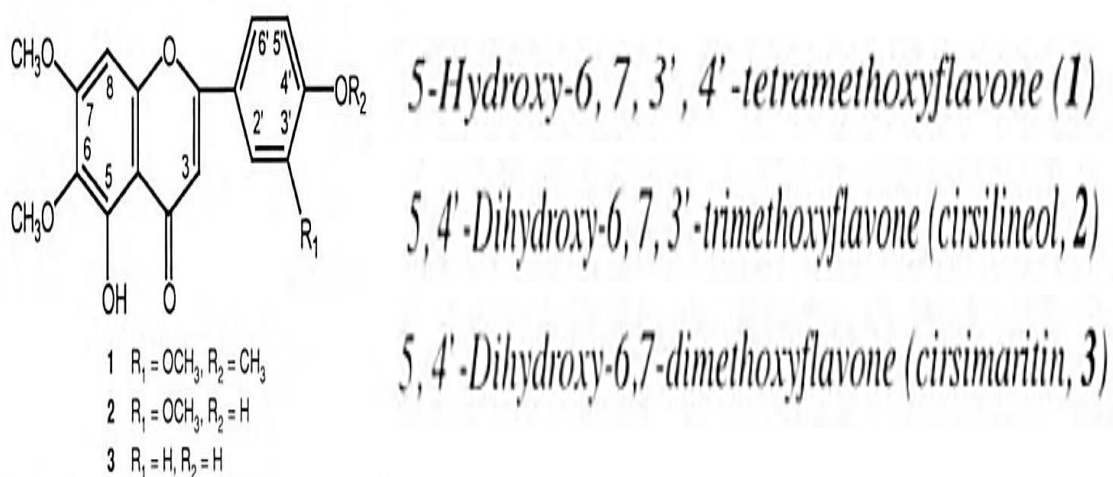


Figure 4 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes *T. fruticans* L., (Kisiel et al., 2001).

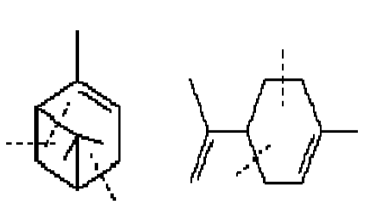
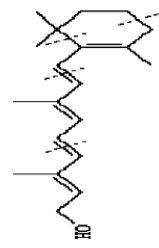
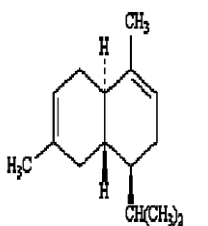
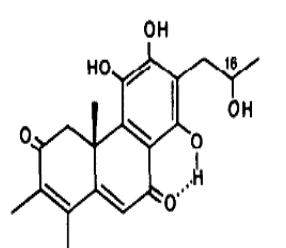
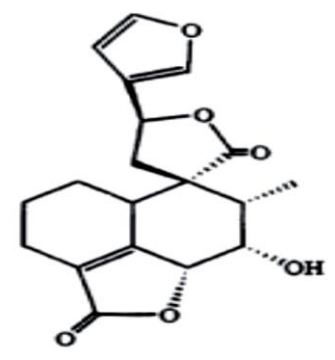
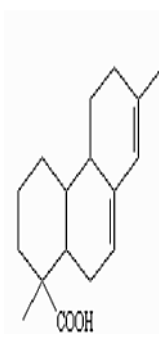
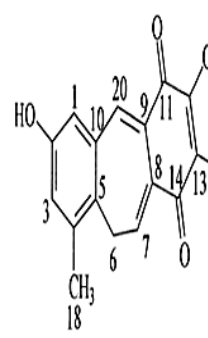
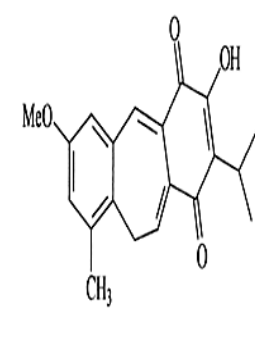
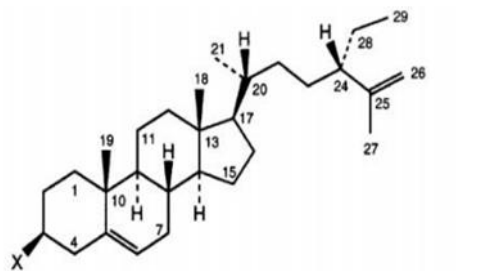
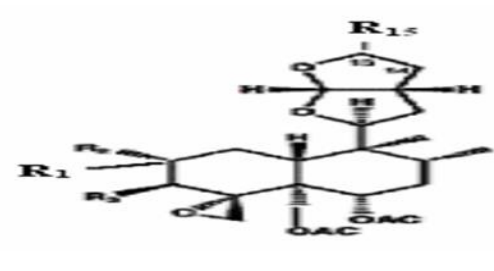
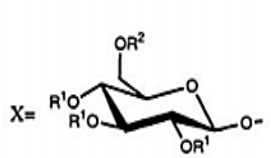
|  <p>α-Pinène Limonène</p> |  <p>Vitamine A</p> |  <p>β-Cadinène</p> |  <p>2 (16S) 3 (16R)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|--|-----------------|-----------------------------------|-------------------|---|----|-------------------|---|---|---|---|----|----|--|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------------------------|----------|---|----|-------------|---|-----------------------------------|-------------------------|---|----|-------------|---|----------------------------------|
| <p>Monoterpènes (Wile et Chichester, 2001)</p> | <p>Diterpène (Coll et Tandrón, 2004)</p> | <p>Sesquiterpène (Wile et Chichester, 2001)</p> | <p>(16S)- et (16R)-plectrinone A (Bruno et al., 1990)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|  <p>Teucrine A</p> |  <p>Acide abiétique</p> |  <p>Fruticulin A</p> |  <p>Demethyl fruticulin A</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|  |  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|  <p>X=</p> <table border="1" data-bbox="542 1512 766 1736"> <thead> <tr> <th></th> <th>R¹</th> <th>R²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>H</td> <td>Fatty acid esters</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Ac</td> <td>Fatty acid esters</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Ac</td> <td>Ac</td> </tr> </tbody> </table> <p>5 X=OAc</p> | | R ¹ | R ² | 1 | H | Fatty acid esters | 2 | Ac | Fatty acid esters | 3 | H | H | 4 | Ac | Ac | <table border="1" data-bbox="861 1523 1372 1736"> <thead> <tr> <th>Diterpénoïdes</th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> <th>R₁₅</th> <th>C₁₄-C₁₅</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ivain IV</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>EtCH(Me)COO</td> <td>H</td> <td>-CH₂-CH₂</td> </tr> <tr> <td>14,15-dihydroajugapitin</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>EtCH(Me)COO</td> <td>H</td> <td>CH₂-CH₂</td> </tr> </tbody> </table> | Diterpénoïdes | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₁₅ | C ₁₄ -C ₁₅ | Ivain IV | H | OH | EtCH(Me)COO | H | -CH ₂ -CH ₂ | 14,15-dihydroajugapitin | H | OH | EtCH(Me)COO | H | CH ₂ -CH ₂ |
| | R ¹ | R ² | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | H | Fatty acid esters | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Ac | Fatty acid esters | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | H | H | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | Ac | Ac | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Diterpénoïdes | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₁₅ | C ₁₄ -C ₁₅ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ivain IV | H | OH | EtCH(Me)COO | H | -CH ₂ -CH ₂ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14,15-dihydroajugapitin | H | OH | EtCH(Me)COO | H | CH ₂ -CH ₂ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Fatty acid esters, Steryl glucoside esters, β-D-glucopyranoside (Fontana et al., 1999)</p> | <p>Diterpénoïdes (Savona et al., 1978)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figure 5 : Structure générale des néoclérodanes diterpénoïdes isolés de *T. fruticans* L., (Bruno et al., 2003).

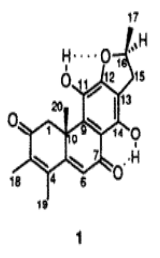
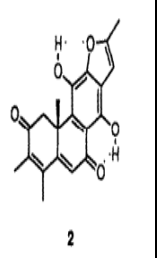
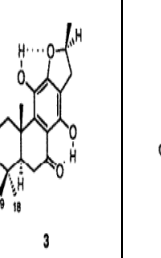
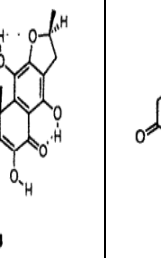
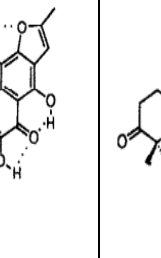
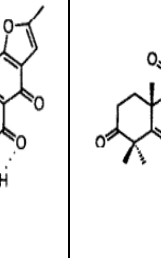
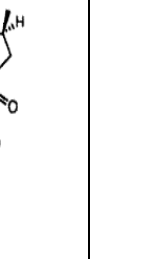
| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
|  |  |  |  |  |  |  |
| teuvinenone E | teuvinenone F | teuvinenone G | teuvinenone A | teuvinenone H - | teuvinenone I | ortho-benzoquinone |

Figure 6 : Structure des abiétanes diterpénoides dans les racines de *T. fruticans* L., (Bruno et al., 1990).

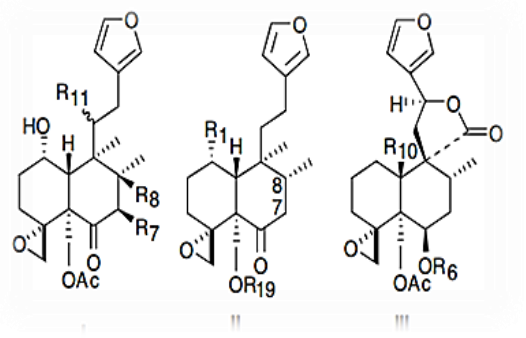
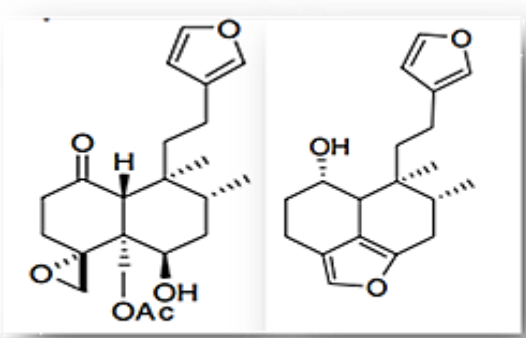

|  | <table border="1"> <thead> <tr> <th>I</th> <th>R₇</th> <th>R₈</th> <th>R₁₁</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Fruticolone</td> <td>1</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>8β - Hydroxyfruticolone</td> <td>3</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>7β - Hydroxyfruticolone</td> <td>4</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>11 - Hydroxyfruticolone</td> <td>5</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> </tbody> </table> | I | R ₇ | R ₈ | R ₁₁ | Fruticolone | 1 | H | H | 8β - Hydroxyfruticolone | 3 | H | OH | 7β - Hydroxyfruticolone | 4 | OH | H | 11 - Hydroxyfruticolone | 5 | H | OH |
|---|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------------------|---------------------|----|-----------------------|---|--------------------------|-------------------------|----|----|-------------------------|----|----|----|-------------------------|---|---|----|
| I | R ₇ | R ₈ | R ₁₁ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fruticolone | 1 | H | H | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8β - Hydroxyfruticolone | 3 | H | OH | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7β - Hydroxyfruticolone | 4 | OH | H | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 - Hydroxyfruticolone | 5 | H | OH | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|  | <table border="1"> <thead> <tr> <th>II</th> <th>R₁</th> <th>R₁₉</th> <th>7,8</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Deacetylfruticolone</td> <td>6</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>7,8-Didehydrofruticolone</td> <td>10</td> <td>OH</td> <td>Ac</td> </tr> <tr> <td>Deoxyfruticolone</td> <td>11</td> <td>H</td> <td>Ac</td> </tr> </tbody> </table> | II | R ₁ | R ₁₉ | 7,8 | Deacetylfruticolone | 6 | OH | H | 7,8-Didehydrofruticolone | 10 | OH | Ac | Deoxyfruticolone | 11 | H | Ac | | | | |
| II | R ₁ | R ₁₉ | 7,8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Deacetylfruticolone | 6 | OH | H | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7,8-Didehydrofruticolone | 10 | OH | Ac | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Deoxyfruticolone | 11 | H | Ac | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|  | <table border="1"> <thead> <tr> <th>III</th> <th>R₆</th> <th>R₁₀</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6-Acetyl-10-hydroxy-teucjaponin B</td> <td>7</td> <td>Ac</td> </tr> <tr> <td>6-Acetylteucjaponin B</td> <td>8</td> <td>Ac</td> </tr> <tr> <td>10-Hydroxyteucjaponin B</td> <td>12</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table> | III | R ₆ | R ₁₀ | 6-Acetyl-10-hydroxy-teucjaponin B | 7 | Ac | 6-Acetylteucjaponin B | 8 | Ac | 10-Hydroxyteucjaponin B | 12 | H | | | | | | | | |
| III | R ₆ | R ₁₀ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6-Acetyl-10-hydroxy-teucjaponin B | 7 | Ac | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6-Acetylteucjaponin B | 8 | Ac | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10-Hydroxyteucjaponin B | 12 | H | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Isufruticolone Difuranofruticol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figure 7 : Composés de *T. fruticans* L., (Coll et Tandron, 2005).

3.2. Données pharmacologiques

Plusieurs recherches ont démontré certains effets pharmacologiques attachés à l'utilisation du genre *Teucrium*, parmi lesquelles l'action antipyrétique, antispasmodique, diurétique, diaphorétique (Ulubelen et al., 2000), anti-inflammatoire, hypolipidémique et cytotoxique (Ricci et al., 2005). La germandrée est largement utilisée en médecine grâce à ses propriétés amères et astringentes, analgésiques, désinfectantes, toniques, bactéricides et fongicides (Teixeira da Silva, 2004). Des études ont montré que certains monoterpènes contenus dans la plante exercent une activité anti-insecte, l'activité antipaludique a été signalée d'après les années 80 (Menichini et al., 2009).

Les effets antioxydants des extraits bruts de *T. fruticans* ont été rapportés, mais d'autres investigations sont nécessaires pour élucider le mécanisme de l'action pharmacologique et identifier les composants bioactifs responsables de telles actions afin d'expliquer leur efficacité thérapeutique (Özkan et al., 2007). Des extraits éthanoliques de *T. polium* ont démontré un effet antifongique à l'égard de culture *Saccharomyces cerevisiae*, *in vitro*, par dégradation des acides gras membranaires. L'utilisation de la plante sur une culture d'érythrocytes humaines conduit au blocage de leur peroxydation, ces effets sont des signes de l'hépatotoxicité de cette plante (Shahraki et al., 2007).

Actuellement, cette plante est utilisée comme plante alimentaire, dans la préparation des vins aromatisés, tisanes, amers et liqueurs, ainsi que la feuille et infusions de fleurs sont utilisées pour aromatiser la bière dans certains pays (Bosisio et al., 2004 ; Maccioni et al., 2007). Le feuillage de la plante était couramment utilisé pour parfumer les fromages de chèvres, Une infusion des feuilles et des fleurs était aussi consommée comme boisson régénératrice (Boullard, 2003). Ses feuilles sont utilisées en cuisine et à des fins médicinales, en particulier pour le traitement des troubles intestinaux et gastriques, et ont montré une certaine promesse dans le traitement de la douleur viscérale. Bien qu'elle soit souvent utilisée pour traiter les troubles de sucre dans le sang (comme le diabète), les études n'ont pas réussi à prouver l'avantage de l'utilisation de *T. fruticans* pour les diabétiques (Ashnagar et al., 2007).

Chapitre II

Les polyphénols

1. Principales substances actives végétales

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

Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, on recense plusieurs milliers de métabolites (au moins 30000 structures caractérisées), et sont classés selon leur appartenance chimique. Parmi ces substances on trouve les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les huiles essentielles et les alcaloïdes qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. L'activité de ces substances dépend principalement de leur nature chimique et de leur concentration (Bodas et *al.*, 2008).

2. Les composés phénoliques

2.1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Ils sont fort répandus dans le règne végétal, on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'arôme, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les tissus et les stades physiologiques (Urquiaga et Leighton, 2000).

C'est une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, qui dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzène. Ils se caractérisent par la présence d'un noyau benzénique, portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles libres ou engagées dans une fonction sous forme d'esters, éthers ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000). Leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les tissus et les stades physiologiques, ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques et constituent un bon témoin de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes, capacité qui permet à l'homme de les utiliser dans des domaines variés (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des épidémiologistes, des industriels, de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés et leurs activités biologiques très diversifiées. Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien leur permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel, les bénéficiaires effets dérivés de composés phénoliques a été attribué à leur activité anti-oxydante. En plus de leur activité antioxydante, ces composés sont douées également de propriétés antivirales et antibactériennes. D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (Macheix et *al.*, 2005).

2.2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les noyaux aromatiques des polyphénols peuvent être synthétisés soit par la voie du Shikimate, soit par celle de l'acétate qui conduit par cyclisation d'un polyacétate aux chromones, orcinols et autres quinones, ce qui permet de différencier deux classes de composés phénoliques. La grande majorité de composés phénoliques dérivent de l'acide cinnamique formé par la voie du shikimate, la voie de biosynthèse de composés aromatiques à partir de cinnamate est spécifique des végétaux. Par ailleurs, la voie des polyacétates intervient chez les végétaux supérieurs pour des composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie des Shikimates. Les composés obtenus sont dits mixtes (flavonoïdes) (Boulangier et Polonvski, 1969).

2.2.1. La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle essentiel pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde. La voie de l'acide shikimique conduit aux acides cinamiques et à leurs dérivés : acides benzoïques, phénylpropanoïques, acétophenones, coumarines, lignanes et lignines (Fig. 8) (Yao et *al.*, 1995).

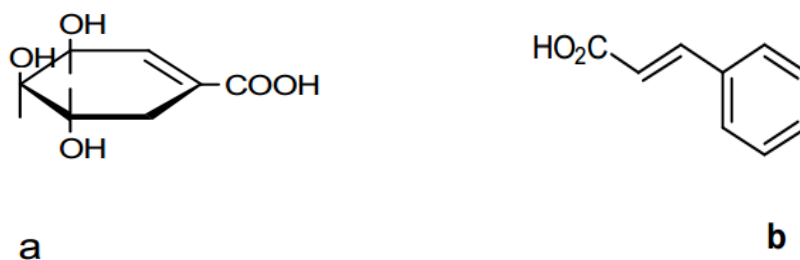


Figure 8 : Structure de l'acide shikimique (a) et acides cinamique (b) (Yao et *al.*, 1995).

2.2.2. La voie des phénylpropanoïdes

La voie des phénylpropanoïdes commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, elle est devenue quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Grotewold, 2006).

2.2.3. La voie des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base. L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, d'une unité phényle propanoïde avec trois unités malonyl-CoA, cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes (Grotewold, 2006).

2.3. Principales classes des polyphénols

Le terme de composés phénoliques couvre un groupe très vaste et diversifié de produits chimiques. Ils peuvent être classés dans un certain nombre de façons dans les groupes en fonction du nombre d'atomes de carbone dans la molécule (Tab. 2) (Bruneton, 1999).

Tableau 2 : Classification des composés phénoliques (Bruneton, 1999).

| Structure | Classe |
|---------------------------------------|--|
| C_6 | phénols simples |
| $C_6 - C_1$ | Acides phénoliques et composés dérivés |
| $C_6 - C_2$ | Acétophénonnes et acides phénylacétiques |
| $C_6 - C_3$ | Acides cinnamiques, coumarines, isocoumarines, chromones |
| C_{15} | Flavanols, flavanones, flavonols, flavonones, anthocyanines et anthocyanidines |
| C_{30} | Biflavonyles |
| $C_6 - C_1 - C_6$, $C_6 - C_1 - C_6$ | Benzophénonnes, xanthonnes et stilbéne |
| C_6 , C_{10} , C_{14} | Quinones |
| C_{18} | Bétacyanines |
| Lignanes, neolignanes | Dimères ou oligomères |
| Lignine | Polymères |
| Tanins | Condensé et hydrolysable |

2.3.1. Les acides phénoliques simples

2.3.1.1. Acides hydroxy-cinnamiques

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C_6-C_3). Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (Fig. 9) (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

2.3.1.2. Acides hydroxy-benzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C_6-C_1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxy-benzoïques les plus abondants sont répertoriés dans la figure (10) (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

2.3.1.3. Coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxy-cinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (Fig. 11) (Macheix et *al.*, 2005).

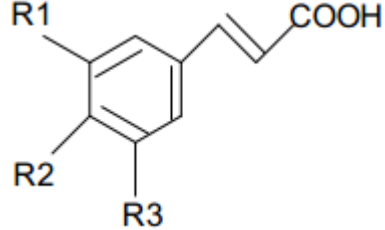
| | R1 | R2 | R3 | Acides phénoliques |
|---|------------------|----|------------------|--------------------|
|  | H | H | H | Acide cinnamique |
| | H | OH | H | Acide p coumarique |
| | OH | OH | H | Acide caféique |
| | OCH ₃ | OH | H | Acide férulique |
| | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | Acide sinapique |

Figure 9 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

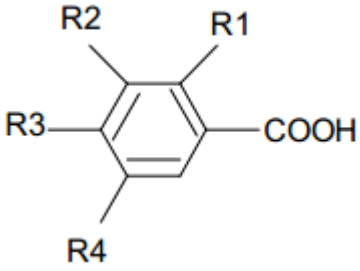
| | R1 | R2 | R3 | R4 | Acides phénoliques |
|---|----|------------------|----|------------------|---------------------------|
|  | H | H | H | H | Acide benzoïque |
| | H | H | OH | H | Acide p hydroxy benzoïque |
| | H | OH | OH | H | Acide protocatechique |
| | H | OCH ₃ | OH | H | Acide vanillique |
| | H | OH | OH | OH | Acide gallique |
| | H | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | Acide syringique |
| | OH | H | H | H | Acide salicylique |
| | OH | H | H | OH | Acide gentisique |

Figure 10 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

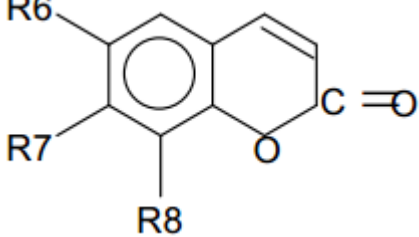
| | R6 | R7 | R8 | Acides phénoliques |
|---|------------------|----|----|--------------------|
|  | H | OH | H | Umbelliférol |
| | OH | OH | H | Aescultol |
| | OCH ₃ | OH | H | Scopolétol |
| | OCH ₃ | OH | OH | Fraxétol |
| | H | OH | OH | Daphnéol |

Figure 11 : Principaux types de coumarines (Macheix et *al.*, 2005).

2.3.2. Les flavonoïdes

2.3.2.1. Généralités

Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes. Le terme "flavonoïde", est utilisé pour la première fois par Geissman et Hinreiner. Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme générique de flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus, « jaune » en latin) (Male-Év et Kunti, 2007).

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E. Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, auronnes, flavonol jaunes), des antyocyanosides rouges, bleus ou violets. Quand ils ne sont pas directement visibles, on les trouve dans les fruits, légumes, graines, tiges et fleurs. Occupant une place prépondérante dans le groupe de produits naturels phénoliques, les flavonoïdes sont une classe de composés ubiquitaires dans les plantes vasculaires. A ce jour, plus de 4000 structures des flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2% environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 10^9 tonnes par an, sont convertis en flavonoïdes (Nijveldt et *al.*, 2001).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (Ghedira, 2005).

2.3.2.2. Structure chimique et classification

Structuralement les flavonoïdes ont un squelette de base commun constitué de 15 atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B., qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Le pont en C₃ entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Grotewold, 2006).

La structure de base des flavonoïdes est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo- γ -pyrane) mais de point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2-chromane. (Bruneton, 1999), Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (Fig. 12) (Krishna et al., 2001).

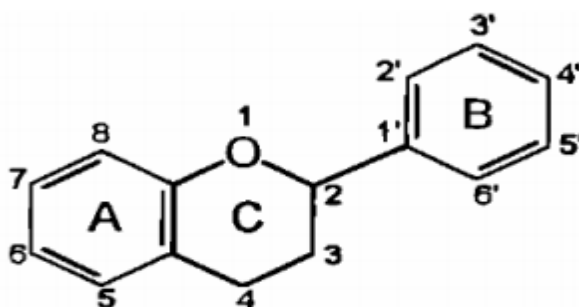


Figure 12 : Structure chimique de base des flavonoïdes (Krishna et al., 2001).

Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone (Bruneton, 1999).

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, flavonols, flavanones, isoflavones, proanthocyanidols, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols (Balasundram, 2006).

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison (s) hétérosidique (s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation (Fig. 13) (Aleman, 2000).

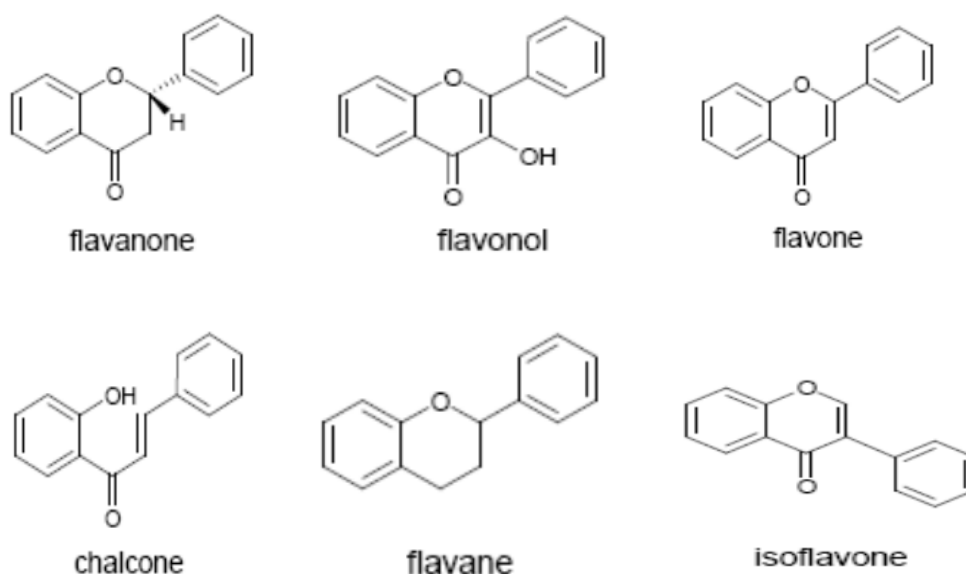


Figure 13 : Les diverses classes des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

2.3.2.3. Localisation et distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique, ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans tous les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles et boutons floraux). Sur le plan tissulaire, les flavonoïdes sont rencontrés plus précisément dans les vacuoles des cellules ainsi que dans les chloroplastes (Bruneton, 1987).

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (Bruneton, 1993).

En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Ils sont largement abondants dans les légumes feuillés (salade, choux, épinards, etc...), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri. Des nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones (Crozier et *al.*, 1997).

2.3.2.4. Biodisponibilité des flavonoïdes

Les effets des flavonoïdes sur la santé ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être absorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes absorbés, Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des flavonoïdes est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs sur la santé (Walle, 2004).

2.3.2.5. Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent être intéressants puisque quelques-uns d'entre eux sont utilisés en pharmacie pour leurs effets anti-inflammatoires et antispasmodiques ou en cosmétologie comme c'est le cas de certains composés dérivés essentiellement de la lutéoline pour réduire l'hyperpigmentation de la peau. L'industrie alimentaire utilise elle aussi ce genre de produits comme antioxydants et inhibiteurs d'enzymes (Havsteen, 2002).

En plus de ce qui a été décrit ces dernières années, plusieurs travaux de recherche ont porté sur les flavonoïdes pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antiallergique, et leurs effets

hépatoprotecteurs, antiviraux et anti-tumoraux. Une étude de relation structure-activité a été effectuée ainsi qu'un éventuel mécanisme d'action (Iniesta-Sanmartin et *al.*, 1990).

Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, ils sont également impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales. Ils agissent comme des pigments ou des co-pigments, peuvent moduler la distribution d'auxine, comme ils fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Les flavonoïdes agissent aussi sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits. Ils sont à l'origine des goûts amers et astringents des feuilles afin de repousser les animaux herbivores (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

D'un point de vue pharmacologique, les flavonoïdes semblent intervenir dans la prévention de cancers, démences, athérosclérose, hypertension et Certains peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires. Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (Chaudhry et *al.*, 1983).

2.3.3. Les tannins

2.3.3.1. Généralités

Le terme tannin vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes. Le poids moléculaire des tannins varie entre 500 et 2000 KDa (3000 pour les structures les plus complexes).

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités (Harborne, 1997).

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins, elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) (Larwence et *al.*, 1984).

2.3.3.2. Types et structures chimique

Selon la structure, on a deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines.

On distingue les tanins hydrolysables ou tannoïdes qui sont des polymères de l'acide gallique (Fig. 14) (Seigler, 1998), et les tannins vrais non hydrolysables (condensés), qui sont

des polymères de certains flavanols, les catéchines ou catéchols et de proanthocyanidols (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

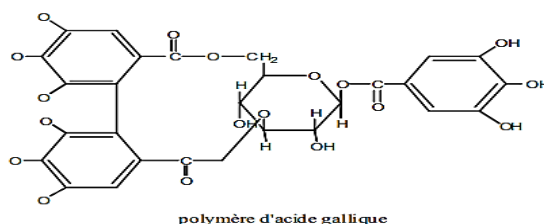


Figure 14 : Exemples de Tannoïdes (Seigler, 1998).

2.3.3.2.1. Les tannins hydrolysables

Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallotannins. Aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C_3 de l'acide gallique ; et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins. Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres).

L'acide gallique provient de la β -oxydation des composés $C_6 - C_3$, comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur (Seigler, 1998).

2.3.3.2.2. Les tannins condensés

Ce sont des proanthocyanidines, composés phénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères du flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelphinidines. Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou des sucres, généralement en position 3 ou plus rarement en position 7. Ces monomères de prodelphinidines sont la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, mais on distingue également des monomères de quercétine et de myricétine (Andersen et Markham, 2006).

En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme c'est le cas pour les tannins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines (Andersen et Markham, 2006).

2.3.3.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques des tannins

Plusieurs observations, chez les humains comme chez les animaux de laboratoires suggèrent que les tannins exhibent un large spectre de propriétés pharmaceutiques, thérapeutiques et chimio-protectrices dues à leur propriété anti-radicalaire (Tohge et *al.*, 2005).

En effet, les tannins protègent contre les toxicités induites par différents agents (hydrogène peroxyde, acétaminophène, extraits contenus dans la fumée du tabac...), contre l'hypercholestérolémie et les changements de la formule sanguine (ALT, BUN et CK). Ils jouent aussi un rôle dans la prévention contre les deux formes de mort cellulaire connues, apoptose et nécrose, diminuant ainsi les dommages causés dans l'ADN lors de ces deux dernières. L'action cyto-protectrice des proanthocyanidines est supérieure à celle des vitamines C, B et β -carotène (Ray et *al.*, 2000).

Les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique (antibactérien et antifongique) clairement démontré de ces molécules est intéressant (diarrhées infectieuses, dermatose,...). D'autres tanins sont aussi connus pour leurs propriétés antimicrobiennes par la présentation de nombreuses activités à l'encontre de souches pathogènes de l'homme, comme *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* (Mazza et *al.*, 1993).

3. Les Activités Biologiques

3.1. Activité antioxydante

De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (Guinebert et *al.*, 2005).

3.1.1. Oxydation et radicaux libres

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique, mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques (Lesgards, 2000).

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réapparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules, les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

Il existe plusieurs types de radicaux libres, mais tous sont constitués de molécules comprenant un électron impair dans leur orbite extrême. Chacune de ces molécules dotées d'une charge négative cherche une autre molécule avec laquelle elle peut se combiner. Particulièrement instables et actives, ces molécules sont en collision constante avec d'autres particules et les tissus. Les radicaux libres ne sont pas toujours néfastes ; en fait, ils permettent au corps de contrôler la tonicité des muscles lisses, de combattre les inflammations et de lutter contre les bactéries. Cependant, l'opération bénéfique des radicaux libres dépend d'un équilibre délicat qui peut être détruit par de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac, l'exercice excessif et le stress sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (Favier, 2003).

3.1.2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxyde ROO^{\bullet} , radical alkoxyde RO^{\bullet}), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

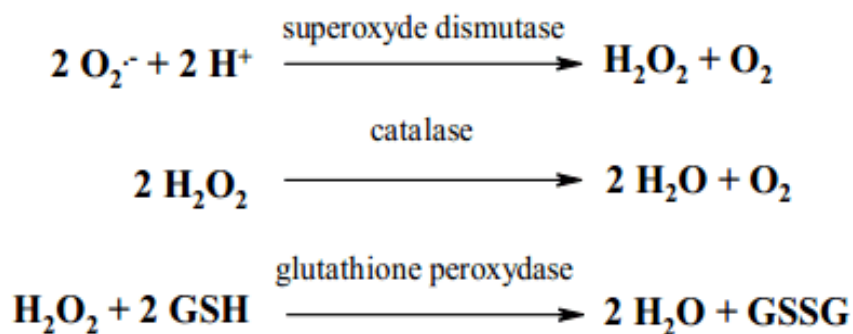
L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ERO). Cette appellation n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde O_2^- , radical hydroxyle OH^{\bullet} , monoxyde d'azote NO^{\bullet} , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet O_2 , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxydinitrite $ONOO^-$ (Favier, 2003).

3.1.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances endogènes ou exogènes capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme. Le corps produit des antioxydants, et on en trouve également dans plusieurs aliments. Les principaux antioxydants sont les vitamines C et E, les caroténoïdes et le sélénium. Les antioxydants permettent, également de faire en sorte que les produits alimentaires conservent leur goût et leur couleur et demeurent longtemps comestibles. Leur utilisation est particulièrement importante si l'on veut éviter l'oxydation des lipides et des produits contenant des lipides, et aussi permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ERO. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

3.1.3.1. Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes anti-oxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (Favier, 2006), ce sont des enzymes ou protéines anti-oxydantes élaborées par notre organisme avec l'aide de certains minéraux, elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge. Ces enzymes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

3.1.3.2. Les antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes, contrairement aux enzymes anti-oxydantes, Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposées. Ils sont présents dans l'alimentation tels que les vitamines A, C, E et les polyphénols en particuliers les flavonoïdes (Kohen et Nyska, 2002), ainsi que les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes antioxydants endogènes comme le sélénium, le zinc et le manganèse. Une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau. Ces antioxydants nutritionnels sont indispensables mais leur action est limitée jusqu'à ce qu'ils soient régénérés par d'autres systèmes (Fig. 15) (Dacosta, 2003).

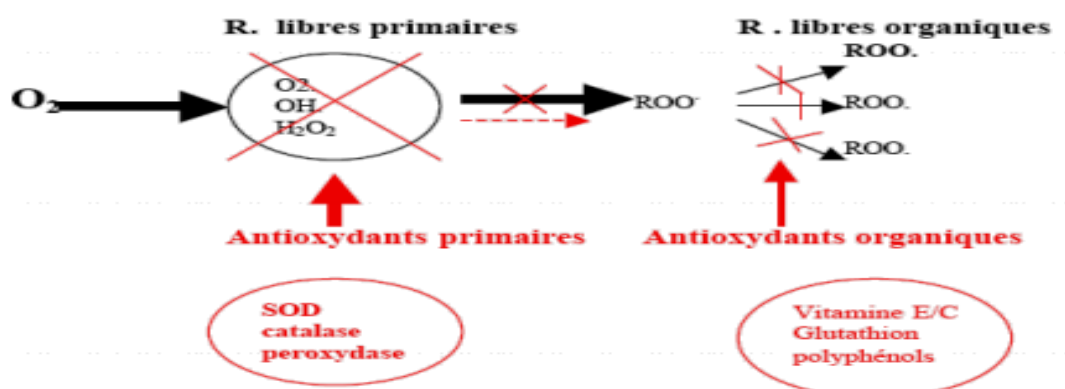


Figure 15 : les systèmes de défense contre les radicaux libres (Kohen et Nyska, 2002).

3.1.4. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

Les ERO ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation (Favier, 2003).

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses anti-oxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution,...) ou d'une diminution des capacités anti-oxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif.

Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) (Kohen et Nyska, 2002).

3.1.5. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

3.2. Activité antimicrobienne

3.2.1. Généralités

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux, pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann, 1997). L'activité antimicrobienne des extraits à base des plantes médicinales se trouve à la base des médecines dites alternatives, de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou cuits, de substances actives exploitées dans les produits pharmaceutiques.

De ce fait, la découverte de nouvelles molécules possédant une activité anti-infectieuse, sans toutefois, être compétitives avec les antibiotiques déjà existants, serait plus appréciable. Une des stratégies possibles adoptées pour la découverte d'un nouveau remède anti-infectieux, consiste en la recherche à partir des plantes supérieures, des composés ayant une activité chimiothérapeutique supplémentaire, et avec une structure largement différente de ceux en cours d'utilisation. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage

des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

3.2.2. Les principales substances antimicrobiennes

3.2.2.1. Les 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. 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).

Des flavonoïdes, une flavone et une flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montrés comme possédant l'activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (Wächter et al., 1999).

Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont exhibé une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus* une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseurs (Valsaraj et al., 1997).

PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre III

MATERIEL ET METHODES

1. Matériels

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne de la plante *Teucrium fruticans* L., (Fig. 16, 17) qui a été collectée dans ses habitats naturels au mois d'Avril 2014 dans la région de Béjaïa, l'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du département de biologie et physiologie végétale par Mr Bouadam, Université Abderrahmane Mira, Béjaïa.



Figure 16 : Photographie de *Teucrium fruticans* L., dans son site de récolte.



Figure 17 : Photographie des différents organes de *T. fruticans* (tiges, feuilles, fleurs, fruits).

1.2. Préparation des échantillons

Les échantillons de la partie aérienne (tiges et feuilles) de la plante *T. fruticans* sont nettoyés et séchés à l'ombre de la lumière et de l'humidité, à température ambiante. Après séchage, la plante a été broyée et tamisée pour obtenir une poudre d'une granulométrie de 250 μm puis stockée soigneusement le Broyat dans un endroit sec en vue des analyses ultérieures (Fig. 18).



Figure 18 : Différentes étapes de la préparation de la poudre de *T. fruticans* L.

1.3. Appareils et produits chimiques

1.3.1. Réactifs et Appareillages

Les différents réactifs et appareillages utilisés dans cette étude sont cités dans l'annexe I.

1.4. Les souches bactériennes utilisées

Elles sont responsables de nombreuses maladies qui affectent actuellement l'homme, les animaux et les plantes qui, dans certaines conditions, se comportent en contaminants, provoquant ainsi d'importantes mycoses, des allergies et des intoxications.

1.4.1. Les bactéries

Les souches utilisées sont des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC), gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie des centres hospitalo-universitaires (CHU) de Sétif et Tlemcen puis conservées à 4 °C dans des tubes à essais contenant de la gélose inclinée.

1.4.1.1. Les bactéries à Gram –

Acinetobacter baumannii ATCC 19606, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Proteus mirabilis* ATCC 35659.

1.4.1.2. Les Bactéries à Gram +

Lysteria monocytogenes ATCC 15313, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.4.2. Les champignons

La levure *Candida albicans* et les moisissures *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* sont respectivement obtenues du laboratoire de microbiologie CHU Sétif et du laboratoire de microbiologie appliquée université Ferhat Abbas Sétif.

2.1.1. Quelques micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens

2.1.1.1. *Escherichia coli*

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm, *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle

provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Percival, 2004).

2.1.1.2. *Staphylococcus aureus*

Ce sont des cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 μm , de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë, intoxication alimentaire (Dworkin et Falkow, 2006).

2.1.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine : jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques. *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8% des infections suites aux blessures chirurgicales (Percival, 2004).

2.1.1.4. *Candida albicans*

Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levuriformes. *Candida albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo-vaginal, (ou de la bouche). Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *Candida albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80% des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco-cutanées (Delorme et Robert, 1997).

2.1.1.5. *Aspergillus sp*

Aspergillus sp. Sont les espèces fongiques les plus communes qui sont capables de produire des mycotoxines dans les produits alimentaires. Les mycotoxines sont connues pour être une cause puissante capable de produire un cancer hépatique chez les animaux et les humains. La présence et la croissance des champignons peuvent entraîner la détérioration et la réduction de la qualité et la quantité des aliments (Rasooli et Abyaneh, 2004).

Dans différentes parties du monde, il y a une inquiétude croissante au sujet de la contamination des aliments, l'exposition environnementale et professionnelle aux spores fongiques de différentes espèces, en particulier à l'aflatoxine produit par ces espèces fongiques

comme le cas d'*A. flavus* et *A. niger* ; qui sont des ascomycète filamenteux qui ont une distribution ubiquitaire dans l'environnement. Ils sont connus par ses implications dans les infections opportunistes humaines. Le mode de la transmission principal aux humains est par l'inhalation des conidies.

En plus de l'inhalation, une voie secondaire de transmission a été rapportée soit par contact avec la peau ou à travers une blessure (Krishnan et *al.*, 2009).

2. Méthodes d'analyses

Comme il a été décrit dans le 2^{ème} chapitre les principaux métabolites secondaires du genre *Teucrium* sp sont, les polyphénols, les flavonoïdes et les huiles essentielles. Dans ce qui suit nous nous intéressons à l'espèce, *T. fruticans* dont nous allons déterminer les principaux métabolites secondaires en adoptant un protocole d'extraction basé sur la solubilisation de nos extraits dans l'eau et le méthanol.

2.1. Préparation des extraits

2.1.1. Extrait aqueux

L'extrait aqueux de *T. fruticans* a été obtenu par décoction de 10 g de broyat de la partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) dans 100 ml d'eau distillée pendant 10 minutes sous agitation magnétique. La solution est laissée reposer sur la plaque chauffante pendant 20 minutes pour faire bouillir, après la centrifugation le mélange est d'abord filtré sur une gaze et ensuit sur papier Whatman (n°3) (Fig. 19). Des aliquotes du filtrat sont placées dans une étuve à 40.2°C pour sécher. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur (Ben Ammar et *al.*, 2007). Le résidu obtenu est déterminé en poids pour calculer le rendement.

2.1.2. Extrait méthanolique

Nous avons suivi la méthode de Markham (1982) ; L'extrait méthanolique de la partie aérienne de *T. fruticans*, a été préparé à partir de 100 g de broyat des tiges et des feuilles, qui ont été mis à macérer dans 1L d'un mélange hydro-alcoolique (méthanol / eau distillée) (85/15 % : v/v) à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures, avec un maximum d'agitation, puis laissés reposer quelques heures. Le mélange est ensuite filtré sur la gaze et une deuxième fois sur papier Whatman (n°3). La fraction flottante a été par la suite filtrée (N°03) pour obtenir le filtrat 1 et conservée. L'extraction a été répétée une fois et le précipité a été complété à 1 litre par le méthanol 50% pour obtenir le filtrat 2 qui a été mélangé avec le filtrat 1 (Fig. 20). Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à sec dans une étuve à 40.2°C pour

sécher et pour obtenir l'extrait brut (EBr). L'extrait sec est conservé au réfrigérateur (Ben Ammar et *al.*, 2008).

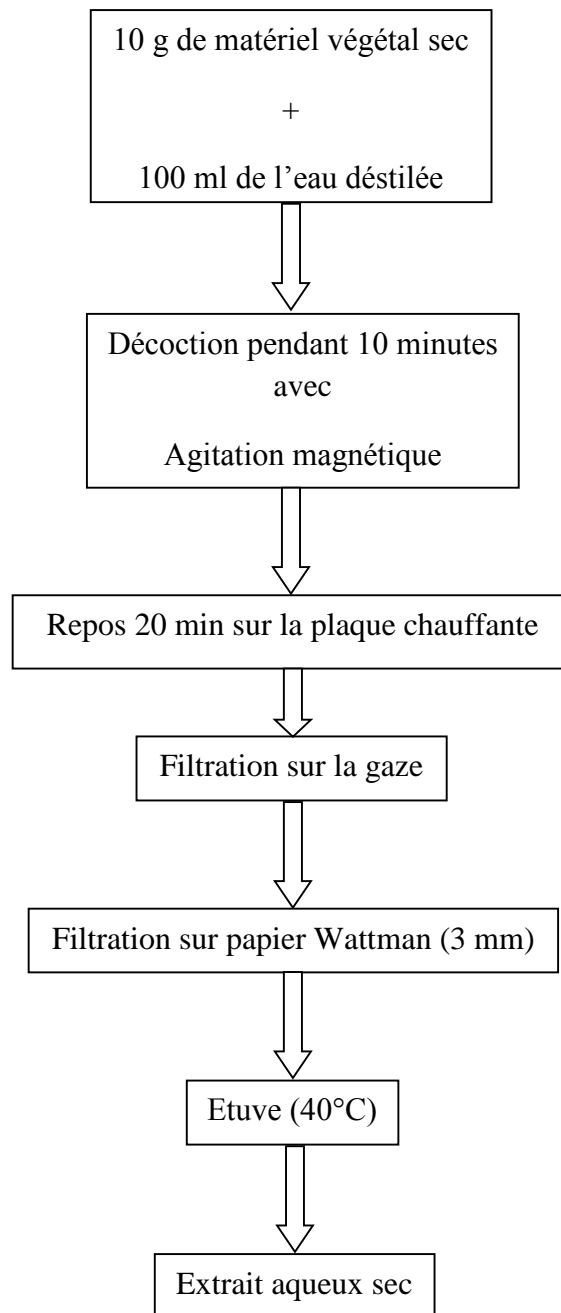


Figure 19 : Protocole de préparation de l'extrait aqueux (Ben Ammar et *al.*, 2007).

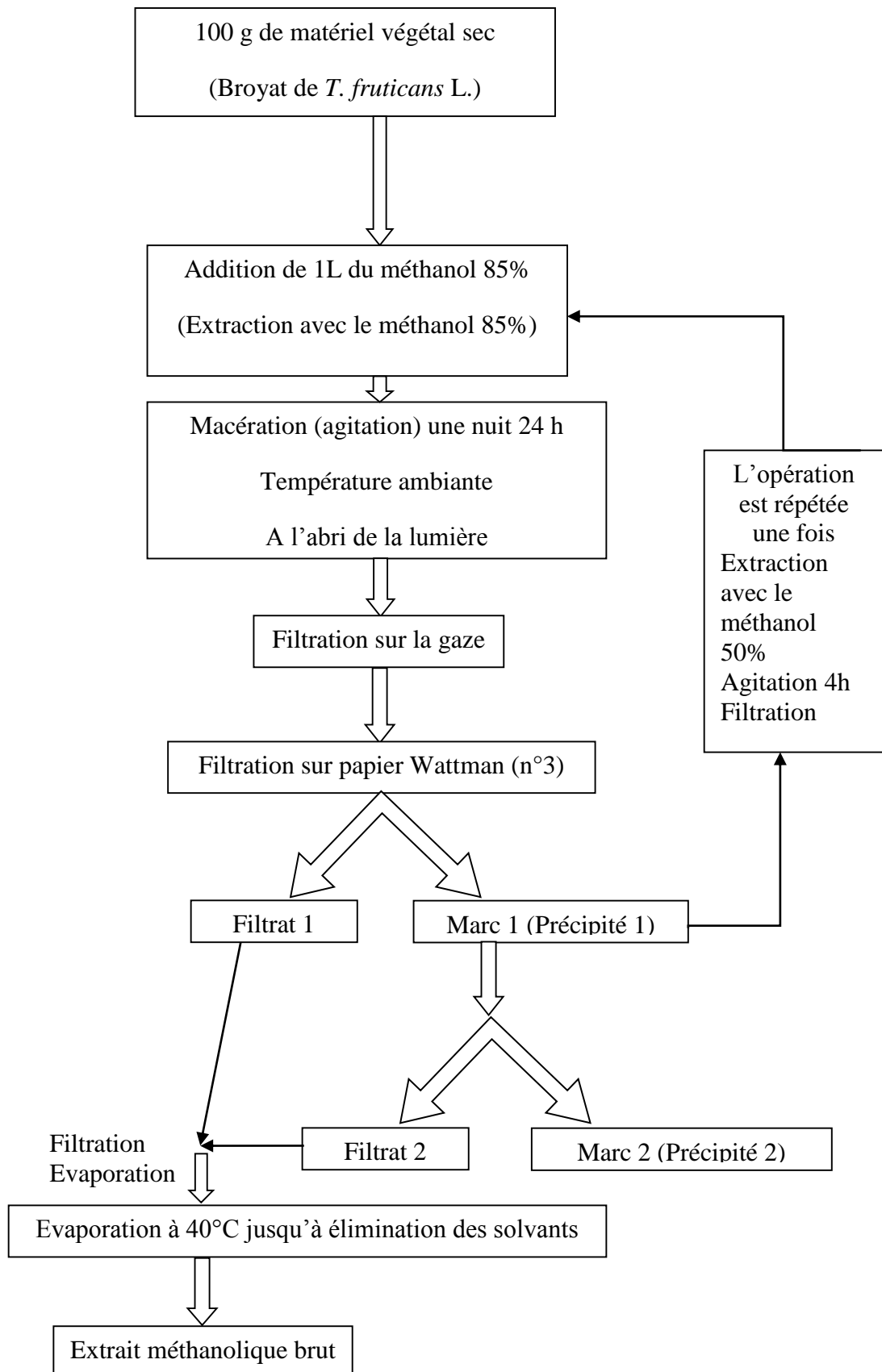


Figure 20 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique de la partie aérienne *T. fruticans* L., par macération par les méthodes de Markham (1982) (Ben Ammar et *al.*, 2008).

2.2. Evaluation des dosages en polyphénols

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux de l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Rossi (1965) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Özkan et *al.*, 2007), tandis que les flavonoïdes ont été quantifiés par le dosage direct par le trichlorure d'aluminium 2 % d'après une méthode adaptée de Lamaïosn et Carnat (Hung et *al.*, 2009), et la méthode utilisée pour l'estimation de taux des flavones et flavonols par le trichlorure d'aluminium 10 % est celle décrite par Kosalec et *al.* (2004).

2.2.1. Calcul du rendement

Le pourcentage en extrait bruts sec méthanolique et aqueux a été calculé par la formule suivante (Carré, 1953) :

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

R (%) : Rendement exprimé en %.

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

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

2.2.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Özkan et *al.*, 2007).

2.2.2.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué de polyheterocycles acides contenant un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃) (Ribéreau-Gayon et *al.*, 1972). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm. Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide caféïque.

2.2.2.2. Mode opératoire

Mettre 20 µl de chaque extrait de *T. fruticans* dans des tubes à essais ; ajouter 1.58 ml d'eau distillée et 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dans H₂O distillée (V/V) dans chaque tube ; agiter vigoureusement puis laisser agir 6 min avant d'ajouter 300 µl de carbonate de sodium à 7.5%.

Après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 760 nm.

Effectuer la même opération pour l'acide caféique à différentes concentrations en introduisant 20 µl de ces dernières dans une série de tubes et ajout des autres réactifs.

Le blanc est représenté par l'éthanol additionné du Folin-Ciocalteu, de l'eau distillée et de carbonate de sodium.

Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits de *T. fruticans* sont calculées en se référant à la droite d'étalonnage ($y = ax + b$) obtenue en utilisant l'acide caféique comme standard à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide caféique/ g de matière sèche.

En appliquant la formule suivante :

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

C : La teneur en phénols totaux (mg d'acide caféique / g de matière sèche).

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

V : Volume de l'extrait méthanolique ou aqueux

m : Le poids de la matière sèche (g).

2.2.3. Dosage des flavonoïdes totaux

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits bruts méthanolique et aqueux de *T. fruticans* est réalisée par la méthode de Bahorun et al. (1996).

2.2.3.1. Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau-Gayon et al., 1972).

Les phénols sont estimés par une spectroscopie UV, dont la quercétine est utilisé comme un standard à une longueur d'onde $\lambda = 430$ nm.

2.2.3.2. Mode opératoire

Mettre 1 ml d'extrait de *T. fruticans* dans un tube à essai ; Ajouter 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2% ; laisser incuber à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante.

Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 430 nm.

Effectuer la même opération pour la quercétine à différentes concentrations en introduisant 1 ml de ces dernières dans une série de tubes et ajout de 1 ml d'AlCl₃ à 2%.

Le blanc est représenté par l'éthanol additionné à l'AlCl₃, toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits de *T. fruticans* sont calculées en se référant à la droite d'étalonnage ($y = ax + b$) obtenue en utilisant la quercétine comme standard à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercétine/ g de matière sèche.

2.2.4. Dosage des flavones et flavonols

La méthode utilisée pour l'estimation de taux de flavonols est celle décrite par Kosalec et al. (2004).

2.2.4.1. Principe

Le dosage des flavones et flavonols est basé sur le même principe que celui des flavonoïdes totaux (Ribéreau-Gayon et al., 1972).

2.2.4.2. Mode opératoire

Mettre 0.50 ml d'extrait de *T. fruticans* dans un tube à essai ; ajouter 1.5 ml d'éthanol, 0.1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 10 % puis 0.1 ml d'acétate de sodium et 2.8 ml d'eau, laisser incuber 30 min à température ambiante.

Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 415 nm.

Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

La concentration des flavones et flavonols contenus dans les extraits de *T. fruticans* est calculée en se référant à la droite d'étalonnage ($y = ax + b$) obtenue en utilisant la quercétine comme standard à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercétine/g de matière sèche.

2.3. Activité antioxydante

2.3.1. Test qualitatif au β -carotène

2.3.1.1. Principe

Ce test permet de mettre en évidence le pouvoir antioxydant des extraits de *T. fruticans*. En effet, l'acide linoléique oxydé en radical peroxy agit sur le β -carotène de couleur orange qui devient incolore. La présence d'antioxydant, extrait de plante par exemple inhibe cette décoloration dans le milieu gélosé (Belhattab, 2007).

2.3.1.2. Mode opératoire

Préparer le milieu gélosé, dans un bécher, en dissolvant 0,75 % (m/v) d'agar dans l'eau distillée ; chauffer en agitant sur une plaque chauffante. Laisser refroidir jusqu'à environ 50°C, y transvaser 7,5ml de solution acétonique de β -carotène (1mg/ml) et 1,5 ml de solution éthanolique d'acide linoléique (5 μ l/ml d'éthanol) ; couler dans des boîtes Pétri ; laisser solidifier puis creuser des puits et y verser 30 μ l de chaque extrait (1mg/ml) *T. fruticans*. Laisser incubé 3 à 4 h à 45°C (Belhattab, 2007).

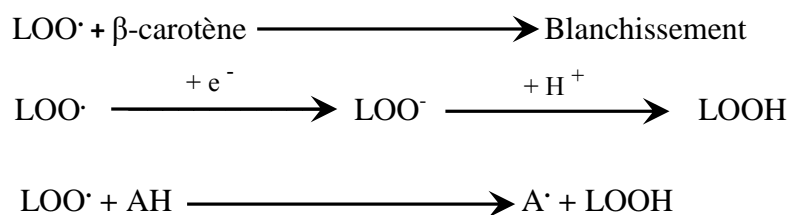
Dans des boîtes témoins les extraits sont remplacés par la quercétine et le BHT (témoins positifs), l'éthanol (témoins négatifs).

Une zone de rétention de la couleur orange autour des puits indique l'activité antioxydante des extraits.

2.3.2. Test de blanchissement du β -carotène

2.3.2.1. Principe

L'activité antioxydante des deux extraits de *T. fruticans* est mesurée selon la méthode de Tepe et *al.* (2006), L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (Tepe et *al.*, 2006).



2.3.2.2. Mode opératoire

Dissoudre 2 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme. La solution obtenue est introduite dans un ballon contenant 2 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution 2.5 ml sont transférés dans des tubes auxquels sont additionnés 350 μ l de chaque extrait ou de BHT (2 mg/l).

Un tube contenant 2.5 ml d'émulsion et 350 μ l d'éthanol servira de témoin négatif.

L'absorbance est immédiatement mesurée à 470 nm, D'autres lectures sont faites à différents intervalles de temps (2h, 4h, 6h, 12h, et 48h) (Tepe et *al.*, 2006), Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

L'activité anti-oxydante relative après 48 heures est calculée selon la relation suivante :

$$(\text{AAR} = (\text{Abs Échantillon} / \text{Abs BHT}) \times 100)$$

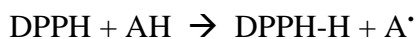
Où :

- **AAR** : activité anti-oxydante relative.
- **Abs Échantillon** : absorbance de l'échantillon après 48 heures.
- **Abs BHT** : absorbance du BHT après 48 heures.

2.3.3. Test au DPPH

2.3.3.1. Principe

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH \cdot) est réalisé par la méthode décrite par (Ammar et *al.*, 2009) qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la IC₅₀ des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H⁺ (Fig. 21) (Molyneux, 2004).



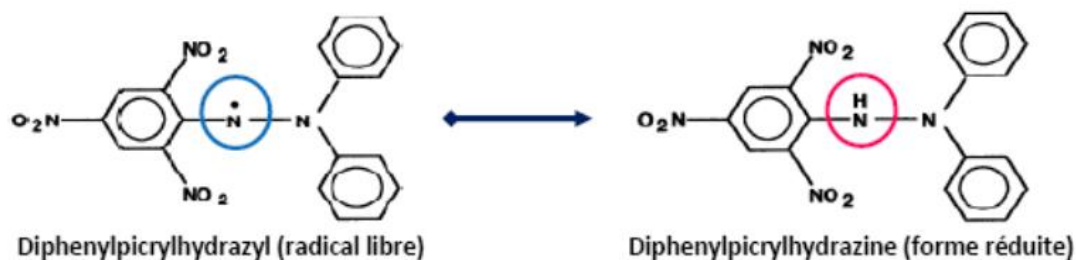


Figure 21 : Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

Où AH est un composé capable de céder un H^+ au radical DPPH.

Le DPPH, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. En présence des piègeurs de radicaux libres, Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques.

2.3.3.2. Mode opératoire

Une solution éthanolique de 0,06 mM de DPPH \cdot est mélangée avec différentes concentrations des extraits de *T. fruticans* (1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g/ml}$). Mettre 1ml de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, ajouter 1ml de solution éthanolique de DPPH, puis laisser incuber 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Lire l'absorbance à 517 nm contre un blanc qui contient de l'éthanol pur.

Répéter les mêmes opérations, en remplaçant l'extrait de *T. fruticans* par le BHT (control positif) et l'éthanol pur (control négatif).

Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$(\% \text{Inhibition}) = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs extrait})}{\text{Abs control}} \times 100$$

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la IC_{50} , sachant que l' IC_{50} est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH \cdot (Samarth et al., 2008).

2.4. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque en milieu gélosé où les disques sont imbibés de 10 µl de chaque extrait (Celiktas et *al.*, 2007).

2.4.1. Activité Antibactérienne

Les tests antibactériens ont pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait des parties aériennes de *T. fruticans* vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries. Les extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes dont ils sont extraits et permettraient, à partir du présent travail, d'ouvrir d'autres pistes à la recherche.

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

2.4.1.1. Principe

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 10 µl de chaque extrait (Sokmen et *al.*, 2004).

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Broadasky et *al.*, 1976).

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

2.4.1.2. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton en surfusion préparé comme suit :

Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton (Annexe II) dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

2.4.1.3. Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

2.4.1.4. Préparation des dilutions d'extraits de *T. fruticans* L.

Les extraits de *T. fruticans* ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 200 mg/ml.

2.4.1.5. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, Après 18 heures d'incubation à 37°C, nous avons effectué des dilutions de la suspension afin de standardiser l'inoculum. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.1 à 625 nm soit environ 10^8 UFC/ml. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort pour obtenir successivement 10^7 UFC/ml et 10^6 UFC/ml.

2.4.1.6. Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif).

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

2.4.1.7. Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques.

2.5. Activité antifongique

Les mêmes opérations sont effectuées avec les souches des champignons, mais dans ce cas le milieu de culture utilisé est le milieu Sabouraud (Annexe II). Les champignons sont activés pendant 7 jours dans des boîtes de Pétrie à une température de 28°C avant le test, après incubation l'inoculum des champignons est préparé et l'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri coulés qui contient du Sabouraud.

Pour la préparation de l'inoculum des souches fongique, L'inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 h / 37°C sur milieu contenant 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identique sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis mise en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.

La lecture des antibiogrammes est faite après 72 heures d'incubation à 28°C.

Chapitre VI

RESULTATS ET
DISCUSSION

1. Résultats et discussion

1.1. Rendements des extractions

1.1.1. La décoction

Le rendement de l'extrait respectif de la partie aérienne EATF (tiges et feuilles) après décoction a été estimé à 9 % (m/m).

1.1.2. La macération

L'opération de l'extraction par macération de la partie aérienne EMTF (tiges et feuilles) de *T. fruticans* dans le méthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brut avec un rendement de 11 % (m/m).

Le rendement de l'extrait méthanolique (11%) est supérieur par rapport à l'extrait aqueux (9%), La différence de rendement entre les extraits est due aux techniques d'extraction utilisées, qui sont totalement différentes et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre (Fig. 22).

Dans une étude réalisée par Coll et Tandrón (2005) sur la même espèce originaire de l'Espagne, des résultats similaires ont été trouvés.

1.2. Composition chimique

1.2.1. Teneur en polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La droite montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque extrait ont été rapportées en équivalent gramme d'acide caféique et déterminé par l'équation de type : $y = 0,0024 x - 0,0165$ sachant que $R^2 = 0,9657$ (Annexe III).

Les teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique EMTF est 7 mg EAC/g de matière sèche, relativement faibles par rapport à l'extrait aqueux 36 mg EAC/g de matière sèche pour EATF. Il paraît clairement que l'eau chaude est le solvant qui permet d'avoir un rendement en polyphénols totaux plus élevé par rapport au méthanol, ce qui peut être expliqué par la lyse des cellules dans l'eau chaude et la libération d'un maximum de molécules poly-phénoliques (Fig. 23).

Bruno et *al.* (1999) ont trouvé une valeur assez proche de notre résultat avec une teneur en polyphénols de 6 mg EAG/g de matière sèche pour un extrait éthanolique de la partie aérienne de la même variété en Sicile dans l'Italie.

Nos résultats sont partis de ceux trouvés par Djabou et *al.* (2012) sur la même espèce végétale, en effet ils ont déterminé 7 mg EAG/ g de matière sèche pour un extrait méthanolique suivi par une extraction dans le butanol saturé en eau des écorces des racines, mais inférieure à une teneur de 13 mg EAG/ g d'un extrait méthanolique suivi aussi par une extraction dans le butanol saturé en eau des feuilles.

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc... (Gmez-Caravaca et *al.*, 2006).

Le solvant d'extraction élue des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Bruno et *al.*, 1999). Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Ricci et *al.*, 2005).

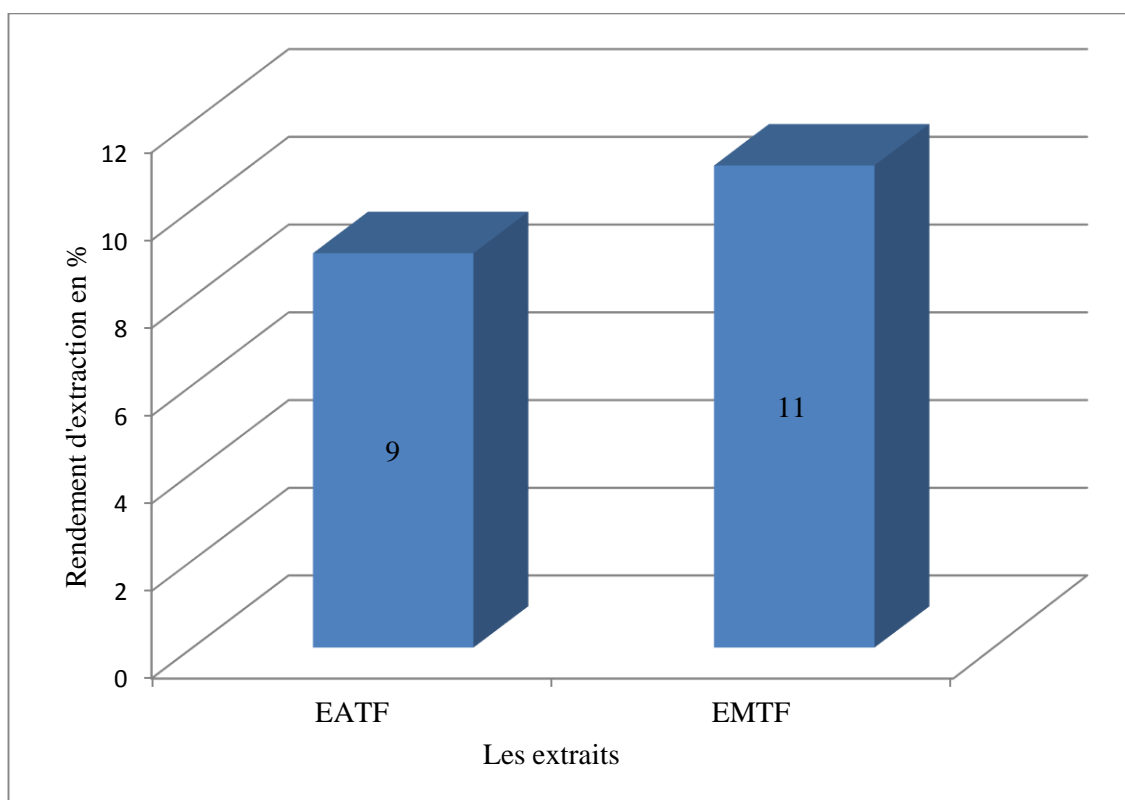


Figure 22 : Comparaison des rendements des deux extraits de *T. fruticans* L.

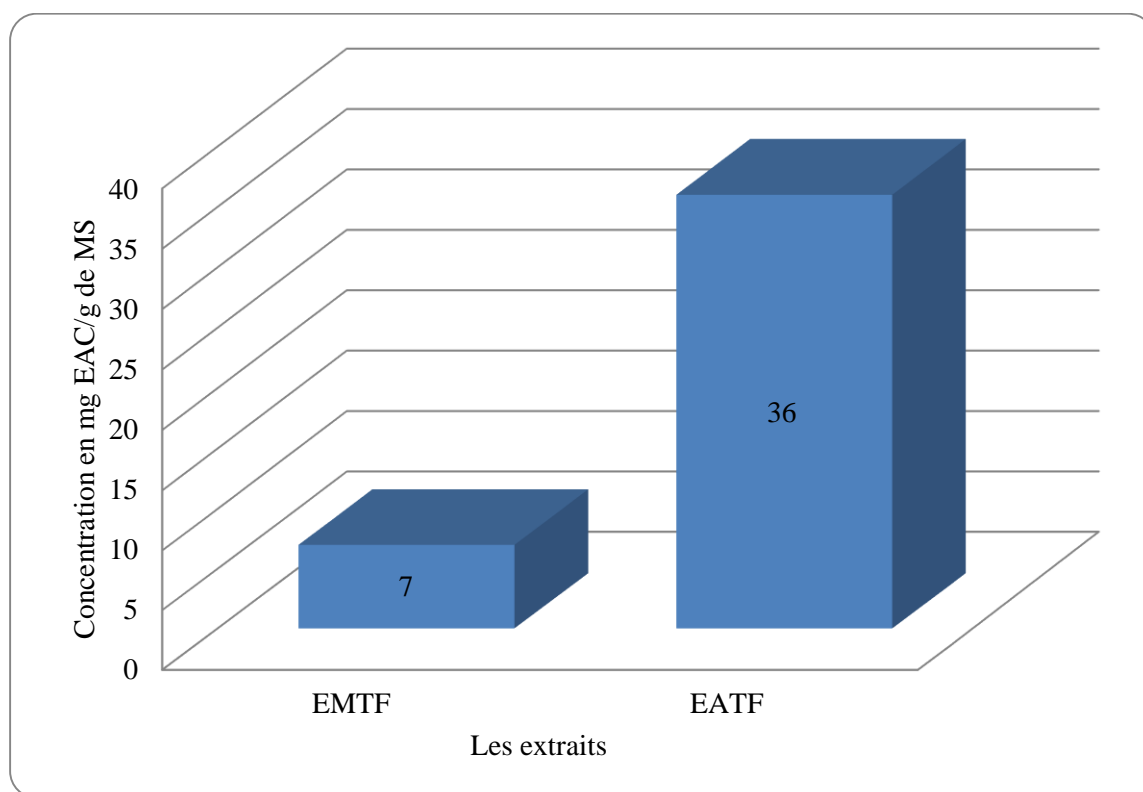


Figure 23: Teneurs en polyphénols des deux extraits de *T. fruticans* L.

1.2.2. Teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et l'étalon utilisé est la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g de MS). Les taux des flavonoïdes des deux extraits ont été obtenus à partir de la droite d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0,0344 x + 0,0181$ sachant que $R^2 = 0,9992$ (Annexe III).

Les concentrations des flavonoïdes sont relativement importantes dans les extraits dans leur majorité, les teneurs en flavonoïdes sont de 18 mg EQ /g de matière sèche dans l'extrait EATF suivie de celle de l'extrait EMTF avec 6 mg EQ /g de matière sèche (Fig. 24).

Ces résultats obtenus sont nettement supérieurs au résultat trouvé par Bruno et *al.* (1999) qui est de 1 mg EQ/g de MS pour un extrait éthanolique de la même variété en Sicile, Italie. De même, ils sont nettement supérieurs aux résultats trouvés par Djabou et *al.* (2012) qui sont respectivement de 28 et 21 mg EQ/100g de matière sèche pour les extraits méthanolique et aqueux des feuilles de la même espèce de la région de Corse et l'ouest Algérien, mais légèrement inférieurs aux résultats trouvés par Djabou et *al.* (2012) soit un teneur de 20 mg EQ/g de matière sèche pour l'extrait méthanolique des feuilles.

1.2.3. Teneurs en flavones et flavonols

La quercétine a été utilisée comme étalon à différentes concentrations, La teneur en flavones et flavonols est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait). Le taux des flavones et flavonols des deux extraits ont été obtenus à partir d'une droite d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0,0066x - 0,004$ sachant que $R^2 = 0,9991$ (Annexe III).

Les teneurs en flavones et flavonols de l'extrait aqueux EATF est supérieur comparé à l'extrait méthanolique EMTF 7 mg EQ/g contre 2 mg EQ/g de matière sèche (Fig. 25).

A notre connaissance, Aucun résultat sur le dosage des flavones et flavonols n'a été rapporté par d'autres auteurs sur *T. fruticans*, pour pouvoir comparer nos résultats.

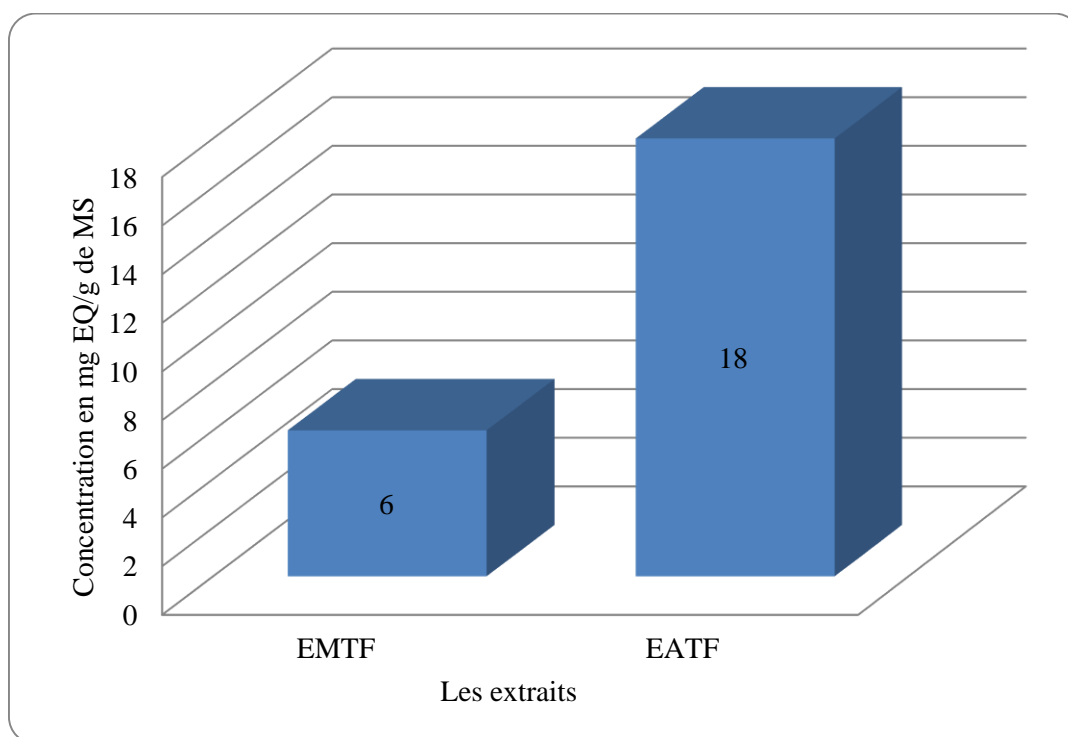


Figure 24 : Teneurs en flavonoïdes totaux des deux extraits de *T. fruticans* L.

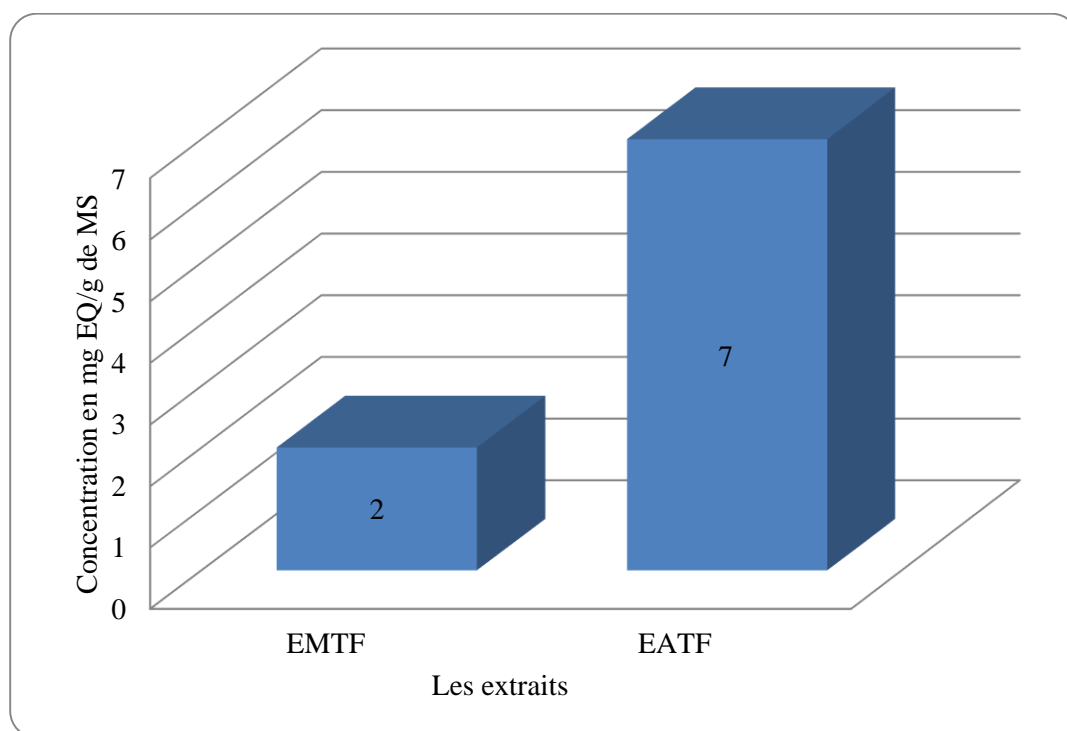


Figure 25 : Teneurs en flavones et flavonols des deux extraits de *T. fruticans* L.

1.3. L'activité antioxydante et antiradicalaire

1.3.1. Mise en évidence de l'activité antioxydante par la méthode du β -carotène

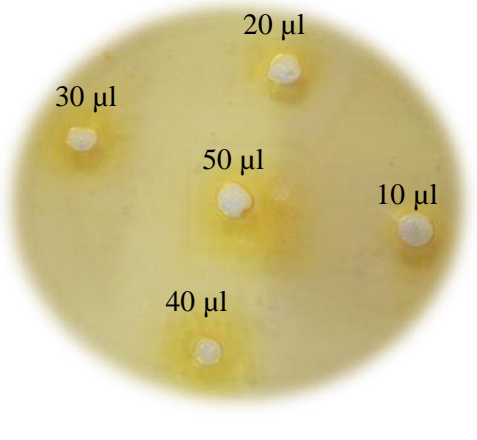
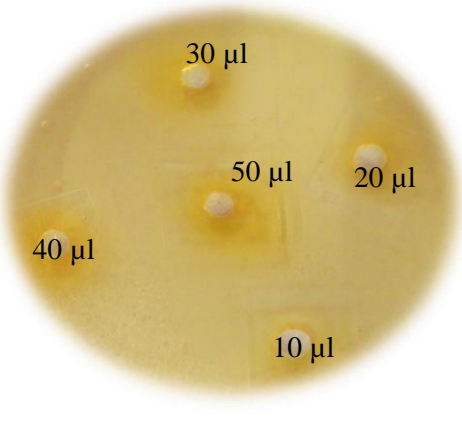
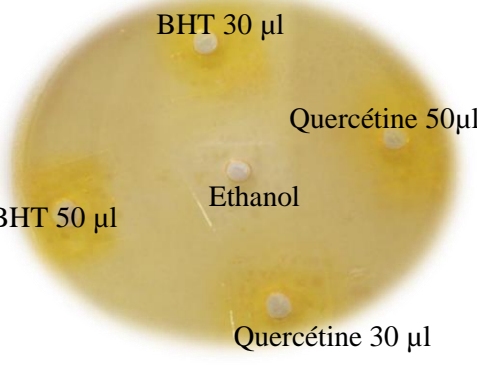
Le test de décoloration du β -carotène, nous a permis de percevoir des halos de couleur orange autour des puits contenant les extraits de *T. fruticans* et les comparer au BHT et la quercétine comme témoin positif, Sachant que la concentration de chaque extrait et témoins positifs est de 1 mg/ml (Tab. 3). Dans chaque boîte cinq puits ont été réalisés à différentes concentrations d'extraits et témoins (10 μ l, 20 μ l, 30 μ l, 40 μ l et 50 μ l).

Le diamètre des halos de rétention de la couleur orange est proportionnel au volume déposé. Cependant, il diffère d'un extrait à un autre. Pour un volume d'extrait de 50 μ l déposé, l'extrait aqueux (EATF) montre le plus petit diamètre (27 mm) soit le plus faible pouvoir antioxydant alors que l'extrait méthanolique de tiges et feuilles (EMTF) a manifesté le plus fort effet avec un diamètre de (32mm) (Fig. 26), les valeurs trouvées restent légèrement inférieures à celles obtenus avec des antioxydants standard tels que la quercétine (38 mm) et le BHT (37 mm) en l'occurrence.

Sharififar et al. (2009) ont étudié l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Teucrium polium*, et ont trouvé un diamètre d'halos de rétention de couleur de 26 mm, Nos valeurs trouvés pour les extraits méthanoliques sont supérieurs à cette valeur.

Ces résultats montrent que les extraits méthanoliques et aqueux de *T. fruticans* possèdent un potentiel antioxydant important dû aux polyphénols notamment les flavonoïdes qui stabilisent le radical peroxyde par donation d'hydrogène.

Tableau 3 : Résultats du test visuel de β -carotène des deux extraits plus les contrôles + et -.

| | |
|--|---|
|  |  |
| EATF | EMTF |
|  | |
| Quercétine et BHT | |

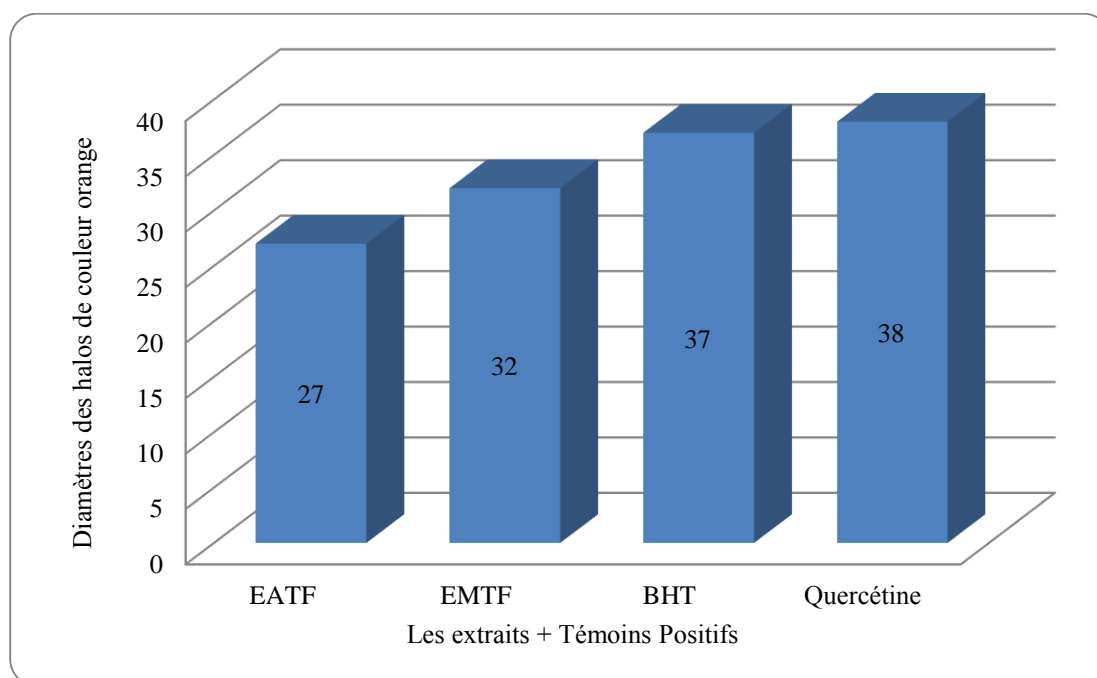


Figure 26 : Comparaison des diamètres des halos de rétention de couleur dans le cas du dépôt de 50 μ l des extraits de *T. fruticans* L., et des témoins positifs (Quercétine et BHT).

1.3.2. Test de blanchissement du β -carotène (the bleaching test)

La technique de décoloration du β -carotène/acide linoléique permet d'évaluer l'activité antioxydante des deux extraits par inhibition de la peroxydation des lipides en suivant l'absorbance dans le temps, Les absorbances des milieux réactionnels en absence des extraits diminuent rapidement dans le temps, alors que l'ajout des extraits ou du BHT ralentit ce déclin.

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. La cinétique de blanchissement du β -carotène en absence et en présence des extraits de *T. fruticans* et d'antioxydant standards (BHT) a été suivie (Fig. 27).

Le BHT à une concentration de 2 mg/ml montre une courbe sous forme d'un plateau ce qui signifie que le pouvoir antioxydant est très efficace. Il est suivi de façon moins importante par l'extrait EMTF, EATF dans l'ordre. En absence d'antioxydant (BHT ou extrait) le déclin est très remarqué. Nos résultats montrent que les extraits les plus riches en polyphénols, par conséquent les plus polaires (l'extrait aqueux EATF) montre l'activité antioxydante la plus

faible par rapport à l'extrait relativement pauvre en polyphénols, qui présente une faible polarité (l'extrait méthanolique EMTF) (Fig. 28).

Nos résultats sont similaires aux résultats d'une étude réalisée par Yang *et al.* (2007) sur des extraits du rhizome du lotus où l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols, 20.1 mg équivalent en catechine/100 g de matière sèche mais ne montre qu'une faible activité antioxydante comparé aux extraits éther de pétrole et dichlorométhane dont les compositions chimiques sont moins riches en composés phénoliques (2.2 et 2.4 mg équivalent en catechine/100g de matière sèche respectivement).

Ceci peut être expliqué par un phénomène énoncé comme le " paradoxe polaire " comme il est décrit par Frankel *et al.* (1994). Étant donné que le test de blanchissement du β -carotène est similaire à un système d'émulsion des lipides dans l'eau, Frankel et Meyer (2000) ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

Selon Haddadi (2005) plusieurs facteurs semblent moduler les résultats d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique à savoir la nature liposoluble ou hydrosoluble des antioxydants et leur concentration.

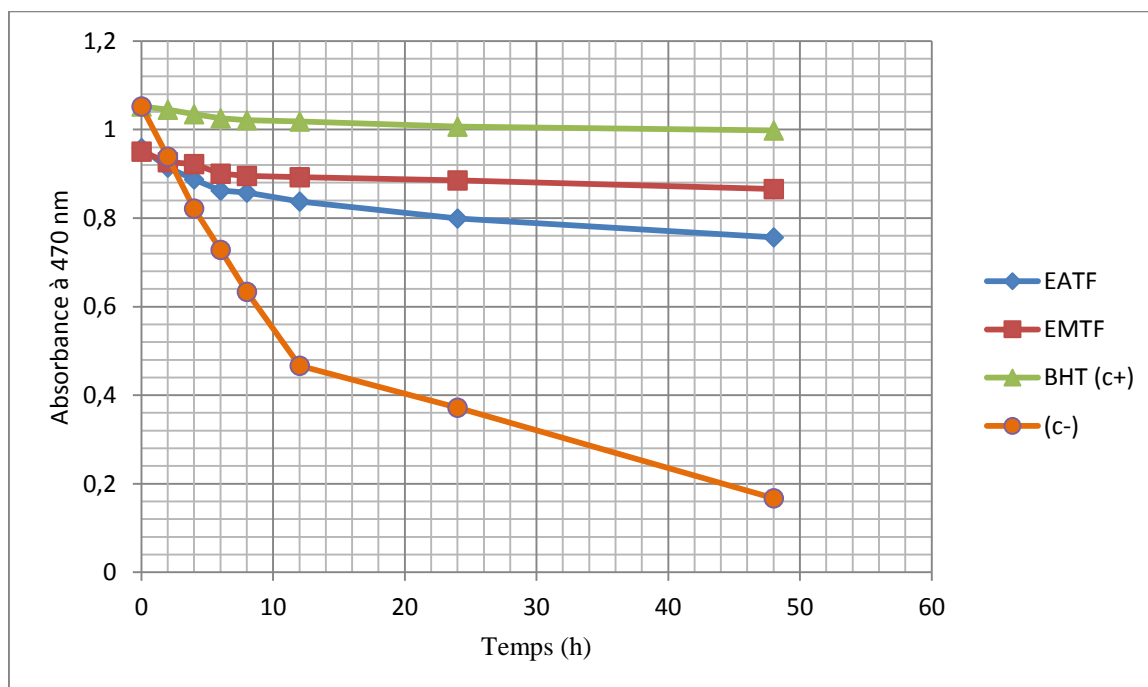


Figure 27 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 470 nm en absence et en présence des extraits de *T. fruticans* L., et du BHT.

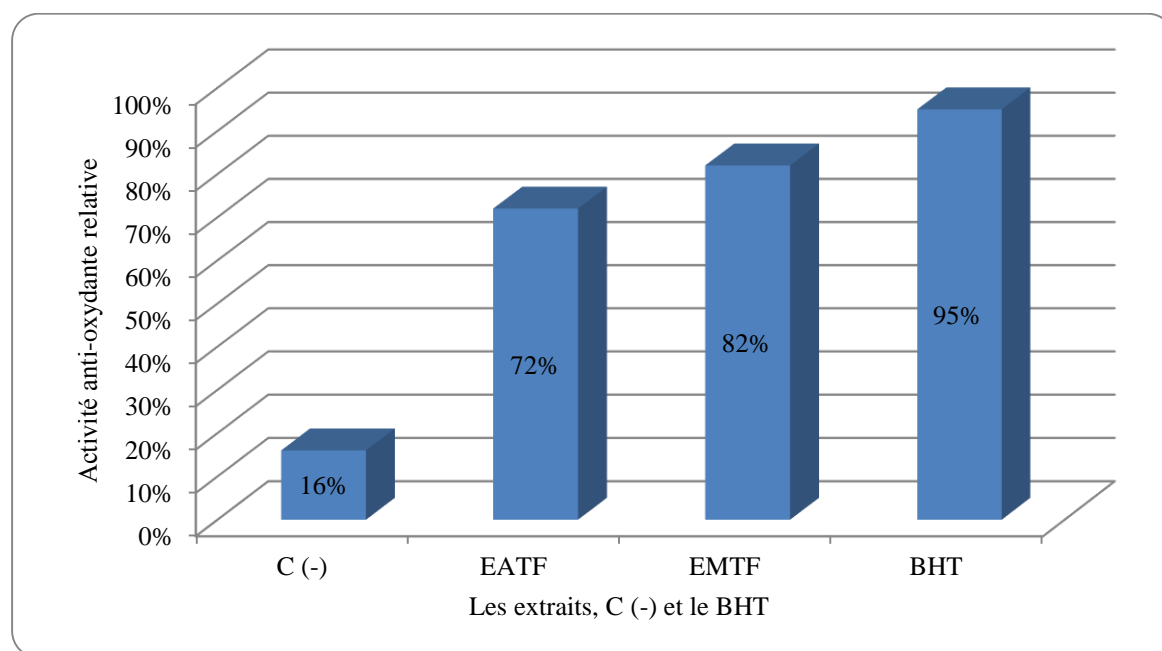


Figure 28 : Activité anti-oxydante relative des extraits de *T. fruticans* L., (EATF, EMTF), BHT et le contrôle négatif C (-) après 48 h.

1.3.3. Test anti-radicalaire (test DPPH)

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée (Bortolomeazzi et *al.*, 2007). L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et du témoin BHT (antioxydant de référence) (1, 3, 10, 30, 100 µg/ml).

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC₅₀, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Abdulmajed et *al.*, 2005; Ahmad et *al.*, 2012), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH· (Couleur). Ces IC₅₀ sont déterminées à partir des graphes (Fig. 29, 30 et 31) dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. Elle est de 71 pour l'extrait EMTF et 66 µg/ml pour l'extrait aqueux EATF, alors que la valeur du BHT qui est de 37 µg/ml.

Tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH· (Fig. 32), plus la valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Une étude menée par Djabou et *al.* (2012) sur la même espèce de plante de la région de Corse et l'ouest Algérien a montré des IC₅₀ de 19 µg/ml des feuilles, lorsque l'extraction a été

menée par le méthanol suivie par une extraction dans le butanol saturé en eau. Cette valeur est nettement inférieure à celle trouvée avec nos extraits.

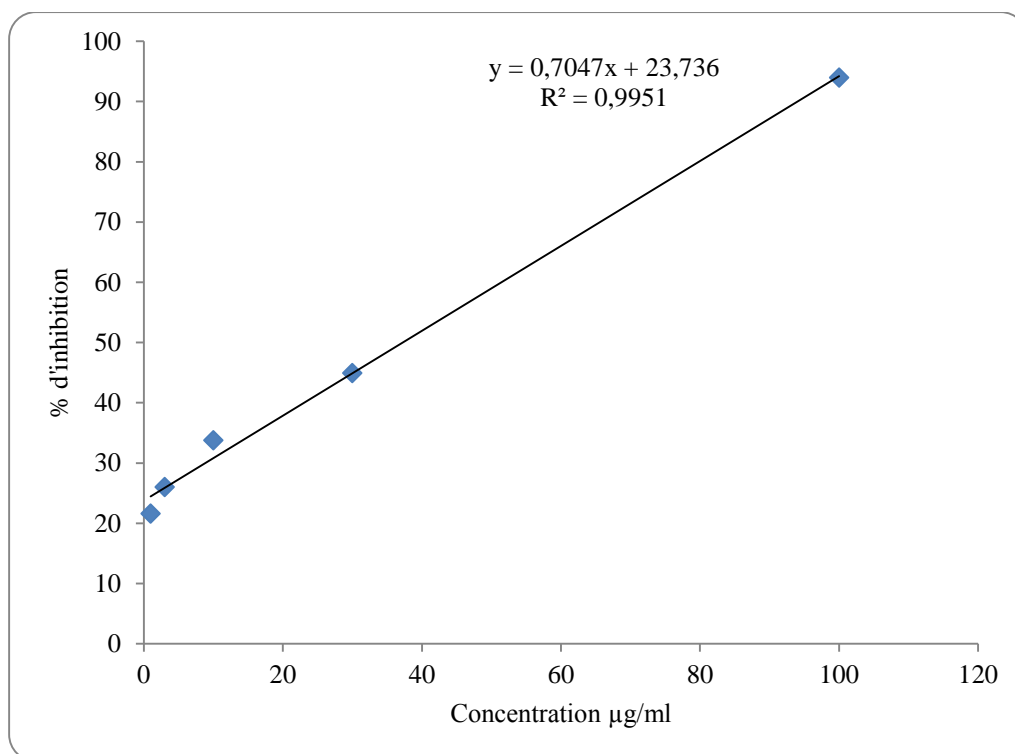


Figure 29 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT.

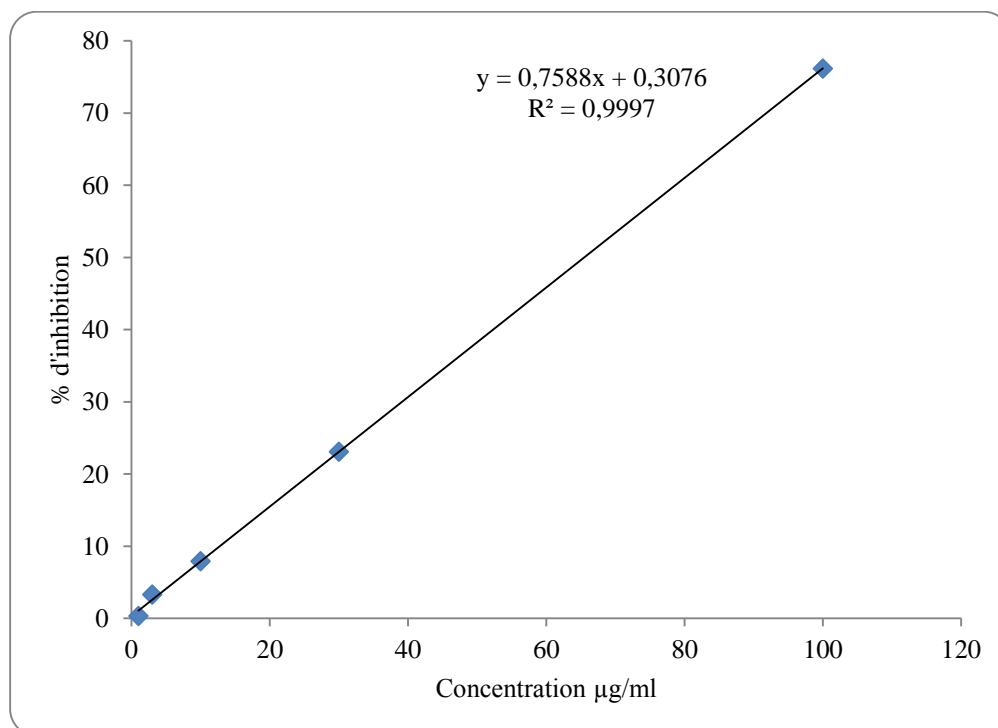


Figure 30 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait EATF.

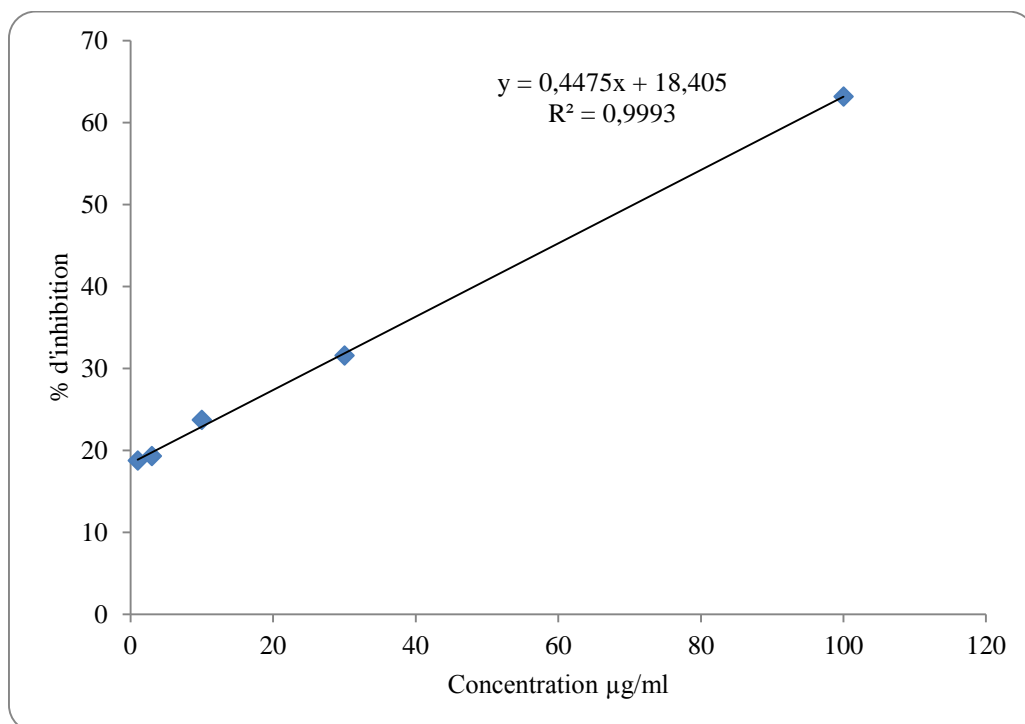


Figure 31 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait EMTF.

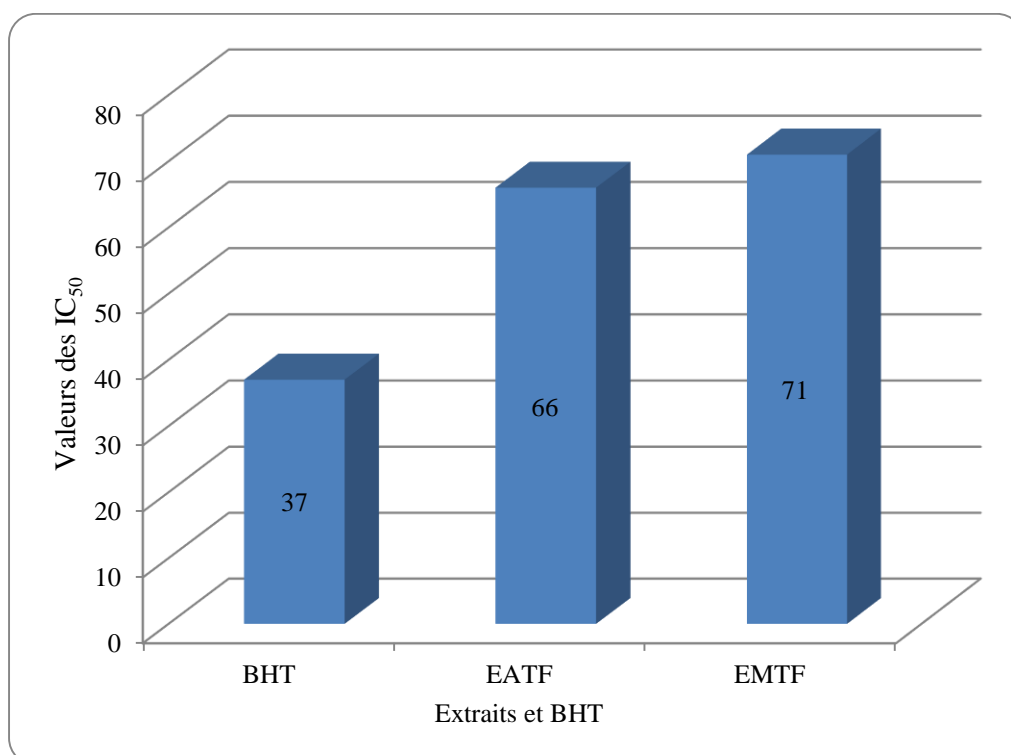


Figure 32 : Activité anti-radicalaire des extraits de *T. fruticans* L., et le BHT.

1.4. L'activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits isolés de *T. fruticans* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons.

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de quatorze (14) germes pathogènes d'origine hospitalière dont onze (11) bactéries Gram + et Gram - et trois (3) champignons à savoir deux moisissures et une levure.

1.4.1. Résultats du test préliminaire

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés (Yrjöen, 2004).

Pour cela le DMSO a été testé comme solvant, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes (Annexe IV, V).

1.4.2. Les antibiogrammes

Les souches de bactéries à Gram + et à Gram - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques standards testés : amoxicilline + Ac. clavulanique (AMC), norfloxacin (NO), imipénème (IPM), céfotaxime (CTX), céfoxitine (FOX), acide nalidixique (NA), ciprofloxacine (CIP), fosfomycine (FOS), gentamicine (G), colistine (CS), ticarcilline (TIC), aztréonam (ATM), pipéracilline (PIP), erythromycine (E), chloramphénicol (C), rifampicine (RA), vancomycine (VA), pristnamycine (PT), acide fusidique (FA), kanamycine (K), benzylpénicilline (P), oxacilline (OX). En plus des bactéries suscitées, la gentamicine a été testée contre le reste des bactéries (Tab. 4).

La bactérie *E. coli* est sensible à ciprofloxacine, imipénème et céfoxitine avec des diamètres de zones d'inhibition de 42, 36 et 32 mm respectivement, alors qu'elle est plus ou moins résistante à la gentamicine, fosfomycine et colistine avec un diamètre de 24 mm.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram -, elle est relativement résistante à certains antibiotiques tels que G, NA et CS (diamètres des zones d'inhibition de 14, 14 et 12 mm respectivement) alors qu'elle a montré une certaine sensibilité vis-à-vis de IPM, CIP et FOS (diamètres des zones d'inhibition de 29, 30 et 34 mm respectivement).

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram +, elle est plus ou moins sensible aux différents antibiotiques la CIP (38 mm), FOX, NA (34 mm) et la G (26 mm).

Enterococcus faecalis, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii* et *Listeria monocytogenes* et *Klebsiella pneumoniae* ont montré une sensibilité décroissante à l'antibiotique gentamicine 30, 18, 15, 13, 11 et 9 mm, alors que la gentamicine n'a donné aucun effet sur *Proteus mirabilis* (Tab. 5).

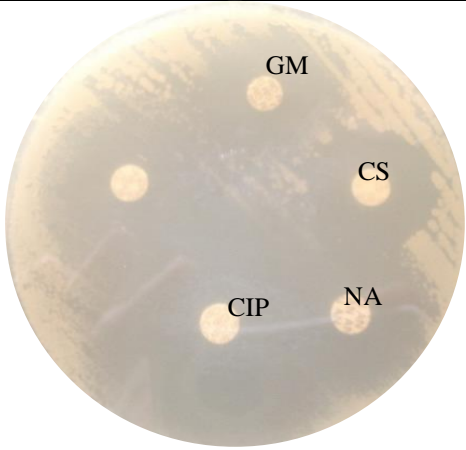
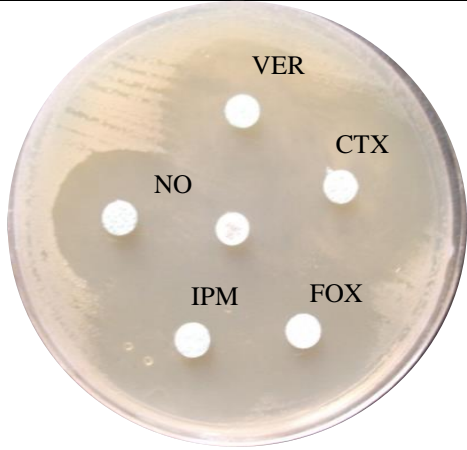
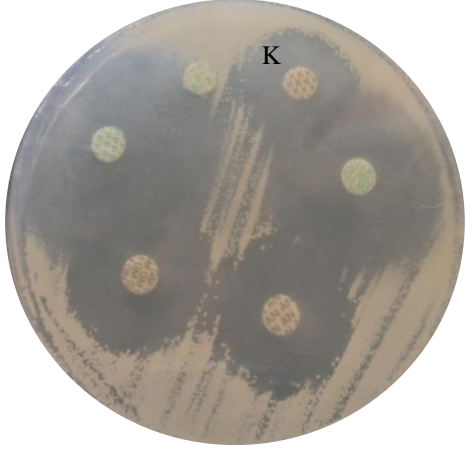
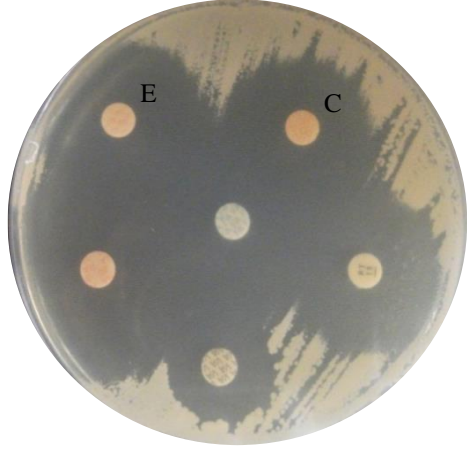
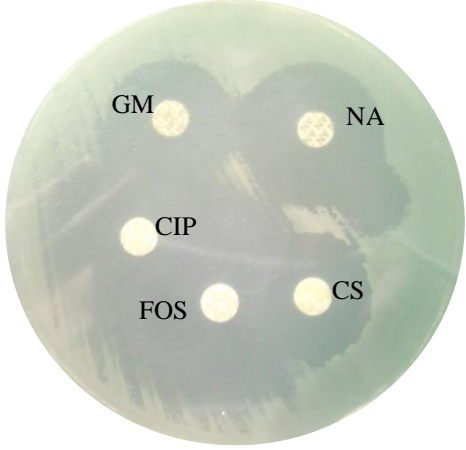
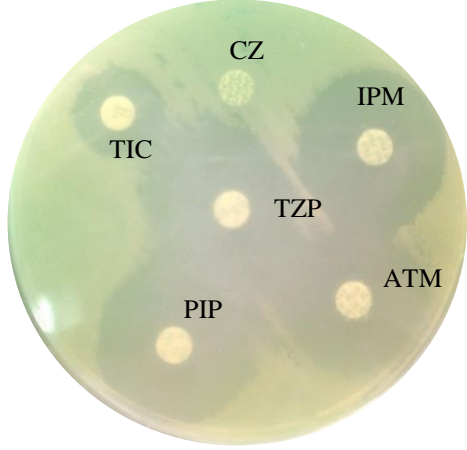
Tableau 4 : Diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de quelques antibiotiques.


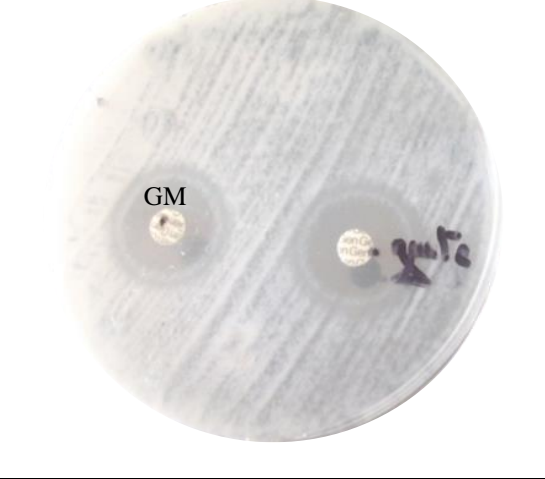
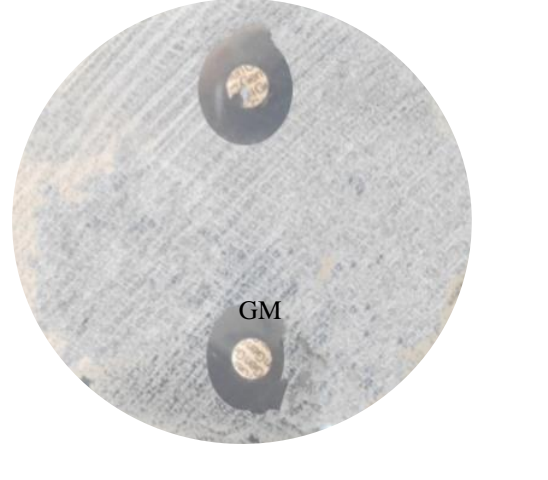
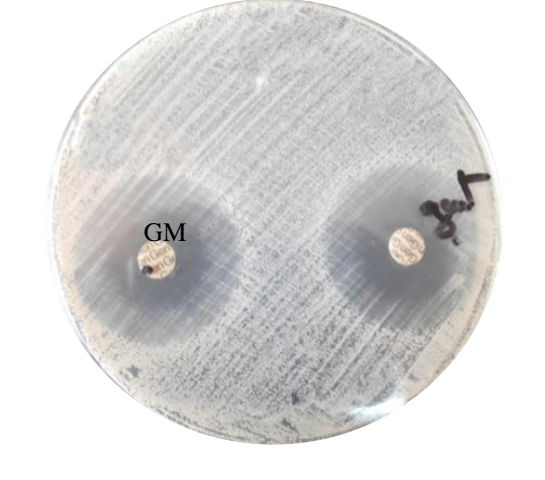
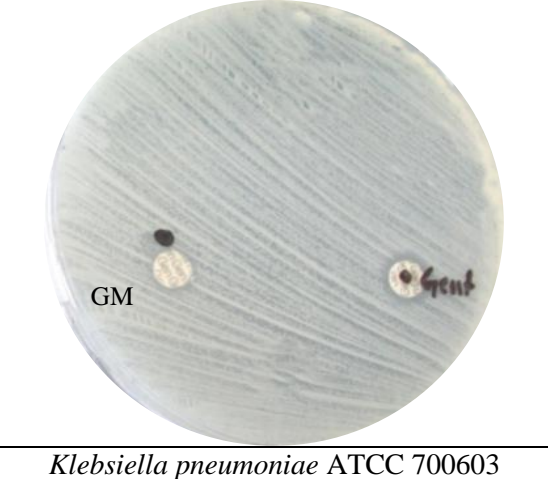
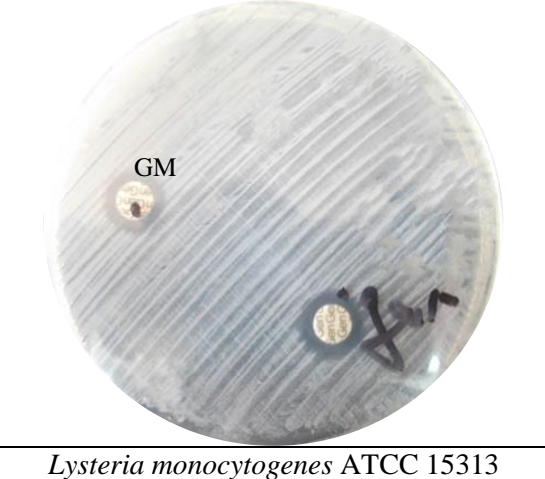
| Antibiotiques Souches | G | IPM | FOX | NA | CIP | FOS | CS |
|--|----|-----|-----|----|-----|-----|----|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 24 | 36 | 32 | 24 | 42 | 24 | 24 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 14 | 29 | ND | 14 | 30 | 34 | 12 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 26 | ND | 34 | 34 | 38 | ND | ND |

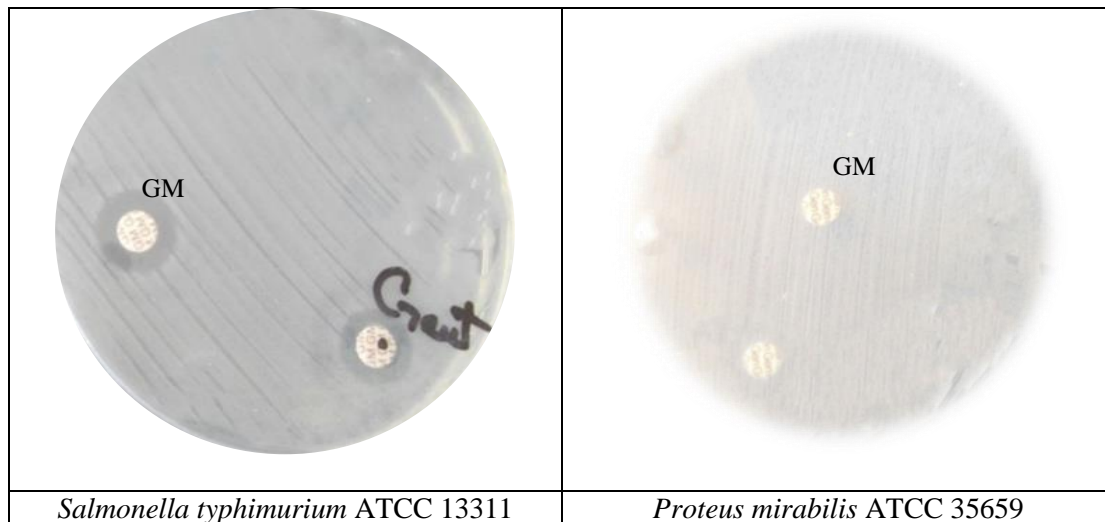
| Souches Antibiotiques | <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 | <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452 |
|--------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------------------|---|
| G | 11 | 18 | 13 | 30 |

| Souches Antibiotiques | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 | <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659 | <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 |
|--------------------------|--|--|-------------------------------------|--|
| G | 9 | 11 | 0 | 15 |

Tableau 5 : Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées.

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> | |
|  |  |
| <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> | |
|  |  |
| <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p> | |

| | |
|---|--|
|  |  |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 |
|  |  |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452 |
|  |  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 |



1.4.3. Pouvoir antimicrobien des extraits de *T. fruticans*

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien des extraits, les tests ont été effectués sur plusieurs cibles, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier. Le choix des souches bactériennes et fongiques testées dans la présente étude était basé sur le caractère de multi-résistance envers les antibiotiques classiques. Les résultats présentés dans les tableaux ci-dessous (Tab. 6, 7, 8, 9) montrent que les deux extraits (EATF, EMTF) ne possèdent aucun effet antibactérien ou antifongique vis-à-vis des onze souches bactérienne et des trois champignons, c'est-à-dire qu'aucune zone d'inhibition de croissance n'a été observée, ce qui pourrait être expliqué soit par la méthode d'extraction, soit par la structure de la paroi externe des Gram positif et négatif qui s'oppose à la pénétration des molécules bioactives. La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne influe aussi sur les résultats (Fazeli et *al.*, 2007).

On peut expliquer ces résultats par la différence de composition entre les deux extraits. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie, ou addition) de différents composés. La variation de la composition chimique des extraits explique donc les résultats observés dans l'activité antimicrobienne. Pour cela nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires (Essawi et Srour, 2000).

Une recherche supplémentaire sur la composition chimique de chaque extrait est plus que nécessaire pour comprendre l'évaluation de composés présentant l'activité antimicrobienne. De nombreuses études ont montré une relation contradictoire entre la

structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir antimicrobien. Les polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes comme l'épigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine, et lutéoline sont des substances antibactériennes importantes. Des travaux portant sur la composition chimique d'extraits de Germandrée par HPLC (Turkmen et *al.*, 2007) et ont révélé l'absence, dans tous les extraits, de la quercétine et de la catéchine deux flavonoïdes doués d'activité antibactérienne ; ce qui peut expliquer l'inefficacité des extraits de cette plante.

Hatano et *al.* (2005) ont trouvé dans leur étude deux types de composés phénoliques efficaces contre les bactéries qui se sont révélés être soit des composés phénoliques à faible poids moléculaire (les anthraquinones et prenylate des flavonoïdes) soit d'autre de poids moléculaires élevés (proanthocyanidins et tanins hydrolysable).

Bouزيد et *al.* (2011) ont trouvé que l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* renferme une quantité appréciable de polyphénols (notamment les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les terpènes et les pectines) mais il n'a montré qu'une faible activité antibactérienne.

Chabot et *al.* (1992) rapporte que les composés les moins polaires comme les flavonoïdes manquant le groupement hydroxyle sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des microorganismes que ceux portant le groupe OH.

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

Selon Candan et *al.* (2003), les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Cela est dû probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'insérer dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.

Plusieurs études ont rapporté aussi que les extraits aqueux de différentes plantes de la famille des Lamiacées ne présentent aucune activité antibactérienne, alors que les extraits organiques et les huiles essentielles de ces plantes inhibent très significativement la croissance des souches testées (Candan et *al.*, 2003 ; Sokmen et *al.*, 2004).

Il a été rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne semblent vraisemblablement être les diterpénoïdes, qui sont les composés principaux de la fraction apolaire des extraits des plantes. Ces composés sont de nature hautement

lipophile est par conséquent sont extraits par des solvants de faible polarité tel que le chloroforme (Albano et Miguel, 2010). Ceci pourrait expliquer l'absence de l'activité antibactérienne dans l'extrait aqueux et méthanolique de *T. fruticans* dans le cas de notre étude.

Les conditions de séchage et de broyage de la plante peuvent être aussi à l'origine de l'absence de l'activité antibactérienne. Il est rapporté par Seidel (2005) que si la plante est connue par son contenu en composés volatiles ou thermolabiles, il est conseillé de congeler le matériel végétal le plutôt possible après sa collection. Il est aussi recommandé de le broyer subséquemment dans un mortier avec le nitrogène liquide car le broyage est aussi à l'origine de la génération de chaleur responsable de la perte des molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles (Jones et Kinghorn, 2005). Donc, l'activité de l'extrait aqueux et méthanolique pourraient être due à la faible fraction d'huiles essentielles qui s'est solubilisée dans le méthanol, la grande proportion étant perdue à cause des conditions de séchage et d'extraction.

L'activité d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre un nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement (Sarker et *al.*, 2005). Cela est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les térapénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols. Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons.

Ilhami et *al.* (2003) ont par contre obtenu une activité vis-à-vis de onze bactéries et quatre champignons avec l'espèce de *T. polium*, plantes appartenant à la famille Lamiacées, par l'extrait d'acétone et chloroforme (30µg/disque). Ceci pourrait s'expliquer par une différence dans la composition de ces plantes par rapport aux extraits de *T. fruticans* et surtout par le solvant utilisé.

L'activité antimicrobienne des extraits de plante est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, y compris les huiles essentielles, les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique, qui sont classifiés comme composés antimicrobiens très actifs (Marjorie, 1999).

Les résultats de l'activité antifongique ont révélé l'inefficacité de tous les extraits contre l'ensemble des souches testées. Par conséquent, les résultats de Coll et

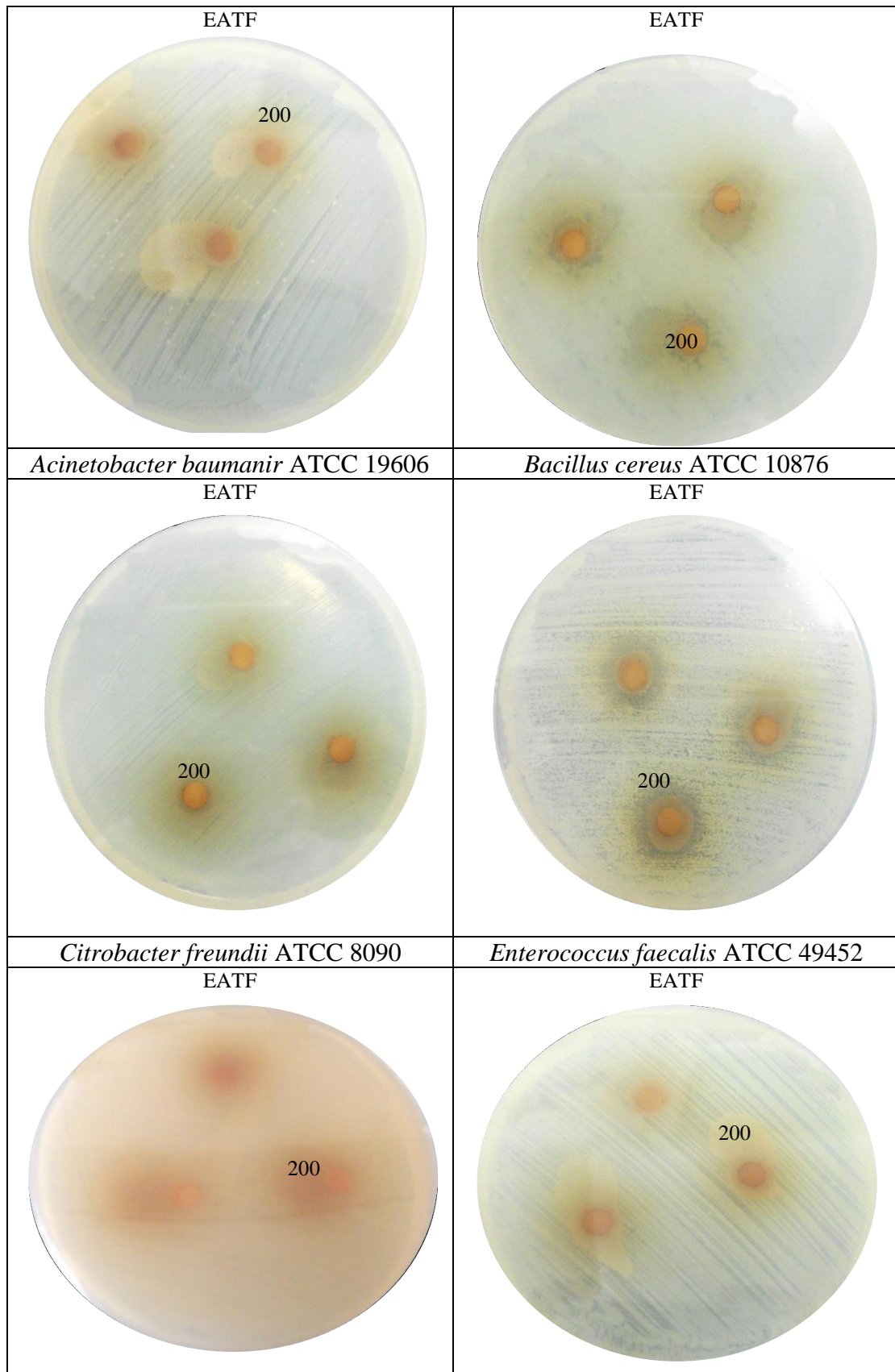
Tandrón (2005), ont enregistré des zones d'inhibition de 5 à 12 mm de l'extrait chlorure de méthylène du *T. fruticans* respectivement vis-à-vis *Rhizoctonia solani*, indiquent que l'activité antifongique dépend du solvant utilisé pour l'extraction.

Les travaux de Sosa et Tonn (2006) sur le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *T. fruticans* sur différentes souches bactériennes de gram positif et négatif ont par contre démontré un effet significatif. Cette efficacité est due à la présence des huiles essentielles qui sont des métabolites secondaires réputés pour leurs effets antibactériens. En fait, Il a été rapporté que les huiles essentielles des plantes, et non leurs extraits, ont la plus grande efficacité dans le traitement des pathologies infectieuses. En fait, les huiles essentielles ont l'avantage de ne pas engendrer une résistance bactérienne du à leur contenu en un large spectre de composés bioactifs (Maggi et al., 2009).

Les activités biologiques des huiles essentielles les plus couramment observées sont les activités antibactériennes. La composition de l'huile essentielle de *T. fruticans* est marquée par la présence surtout d'un très grand nombre de composés à l'état de traces. Notons que les principaux composants observés dans cette essence sont des sesquiterpènes. Des résultats similaires ont été obtenus par différents auteurs (Sosa et Tonn, 2006 ; Djabou et al., 2012). Dans tous les cas, les sesquiterpènes sont majoritaires et semblent être à l'origine de l'activité antibactérienne.

Les résultats d'Ulubelen et al. (2000) révèlent que l'extrait éthanolique des racines de *T. fruticans* est actif contre *Escherichia coli* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, par rapport à l'extrait brut hydro-méthanolique (EBr).

Nos résultats sont similaires aux résultats d'une étude réalisée par Essawi et Srouf (2000) sur des extraits organique et aqueux de *T. fruticans* sur la partie aérienne ; les extraits ne montrent aucun effet vis-à-vis de huit souches bactériennes testées par la méthode diffusion sur disque.

Tableau 6 : Effet de l'extrait aqueux (EATF) de *T. fruticans* sur les bactéries étudiées.

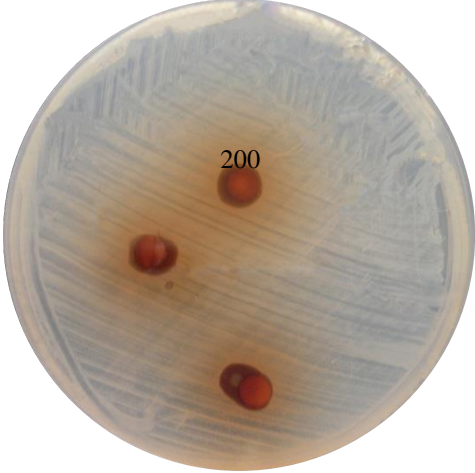
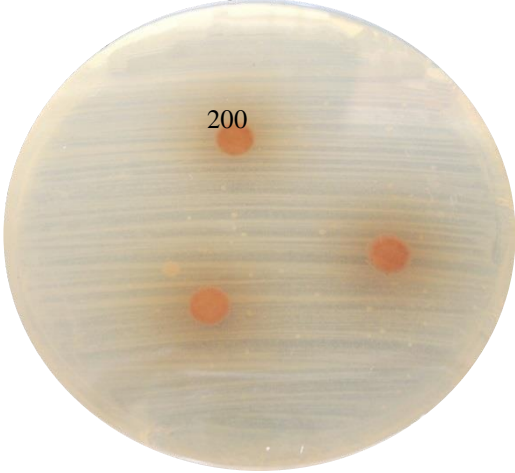
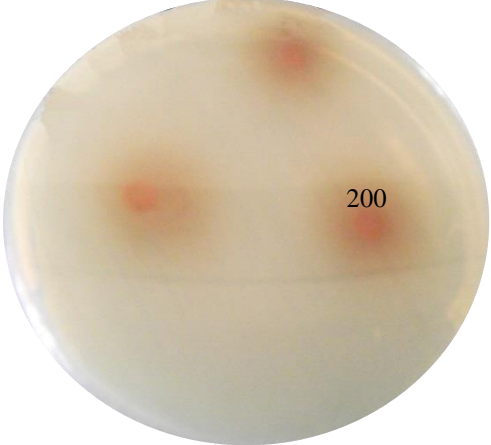

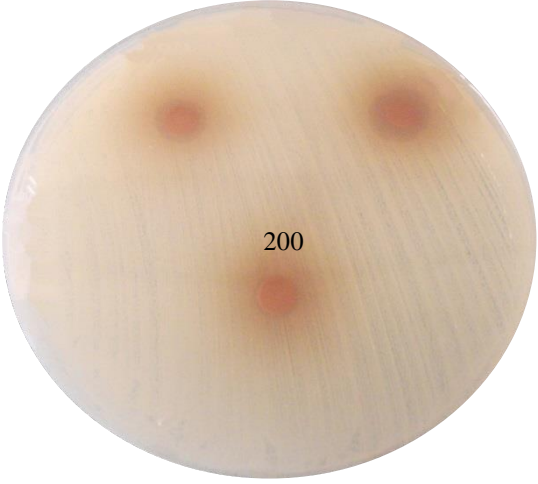
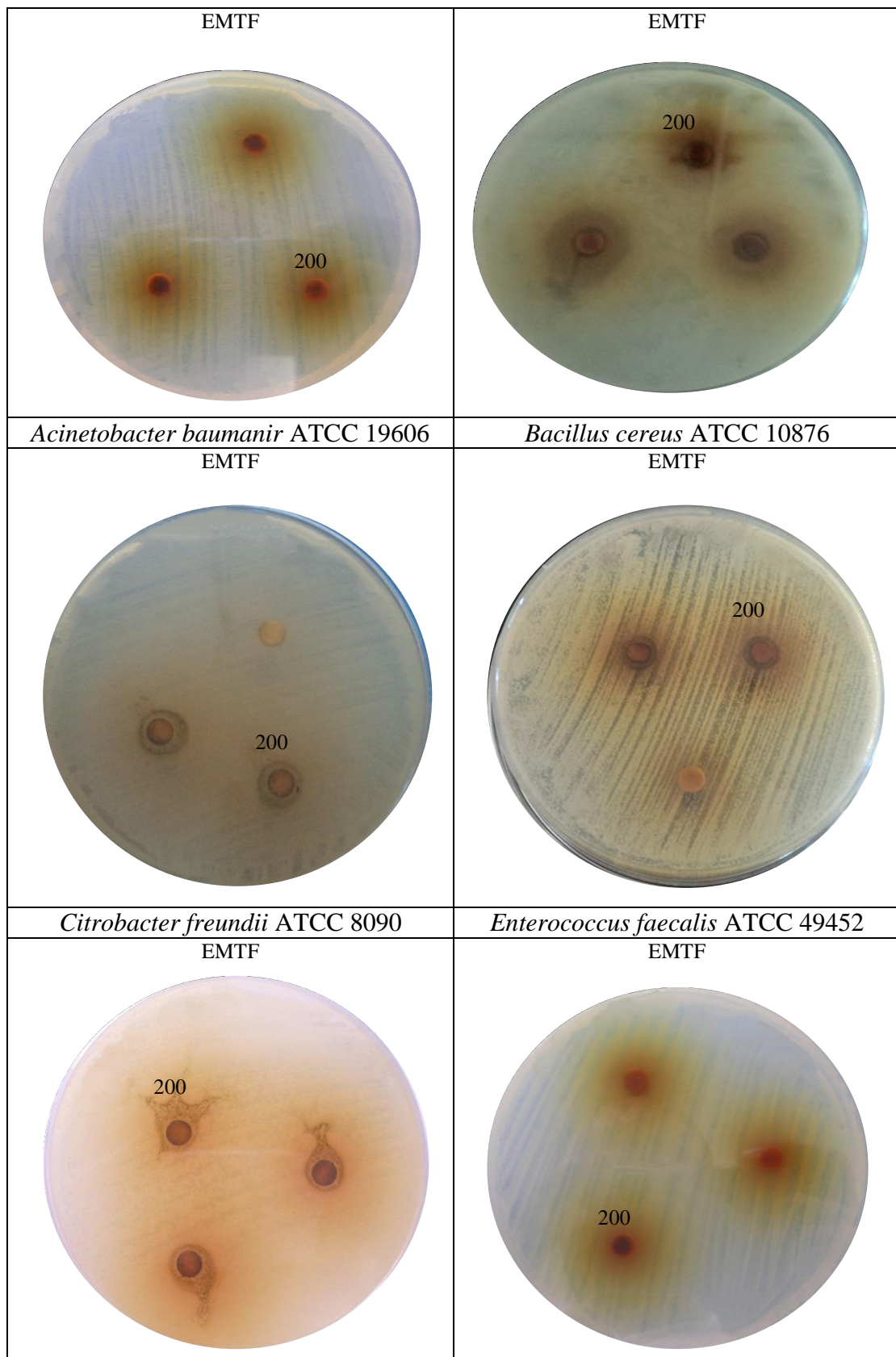
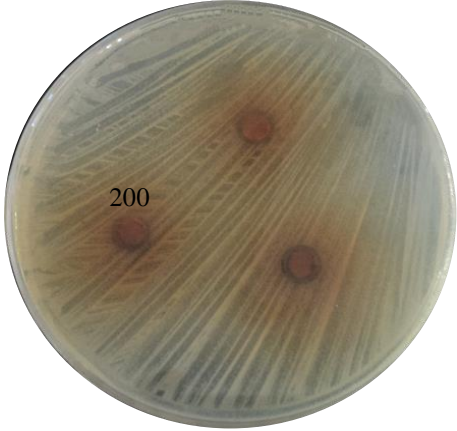
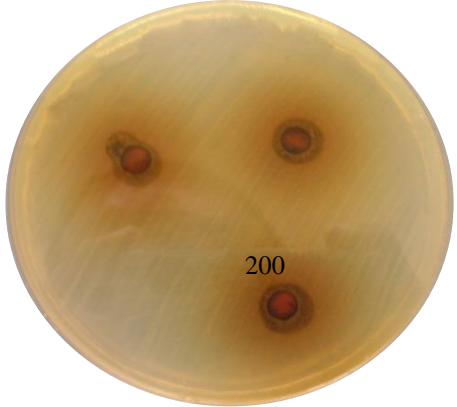
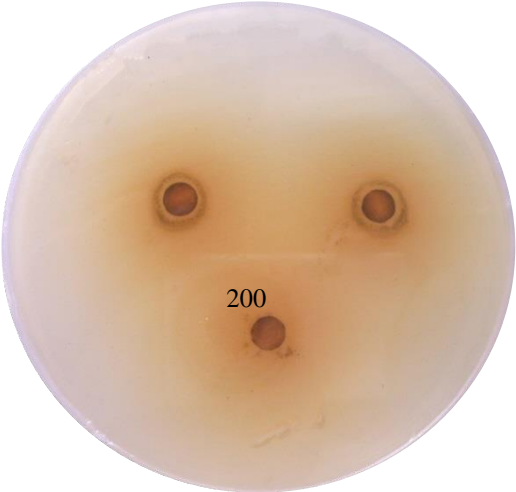
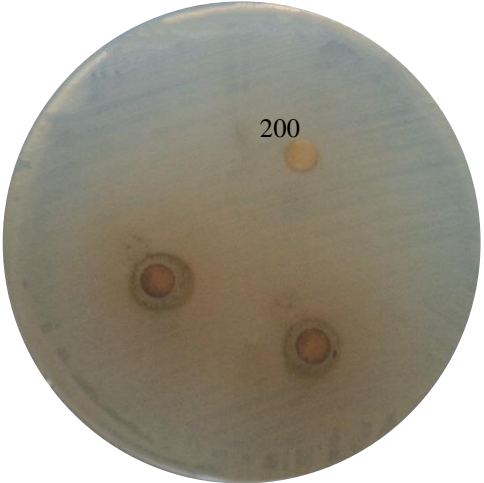
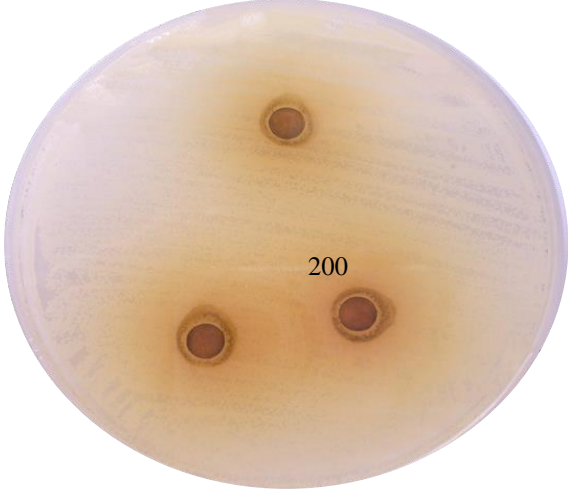
| | |
|--|--|
| <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> <p>EATF</p>  | <p><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603</p> <p>EATF</p>  |
| <p><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313</p> <p>EATF</p>  | <p><i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659</p> <p>EATF</p>  |
| <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p> <p><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311</p> <p>EATF</p>  | |
| <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> | |

Tableau 7 : Effet de l'extrait méthanolique (EMTF) de *T. fruticans* sur les bactéries étudiées.

| | |
|--|--|
| <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> <p>EMTF</p>  | <p><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603</p> <p>EMTF</p>  |
| <p><i>Lysteria monocytogenes</i> ATCC 15313</p> <p>EMTF</p>  | <p><i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659</p> <p>EMTF</p>  |
| <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p> <p><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311</p> <p>EMTF</p>  | |

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Tableau 8 : Effet de l'extrait aqueux (EATF) de *T. fruticans* sur les champignons étudiés.

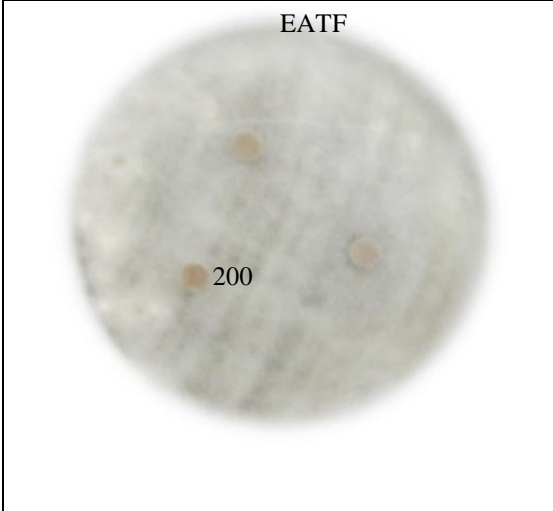
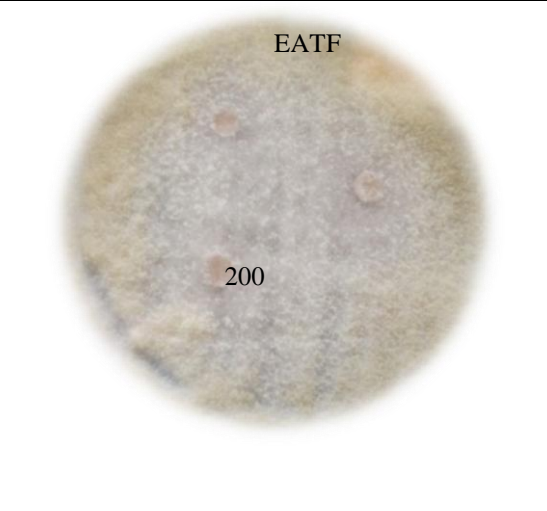
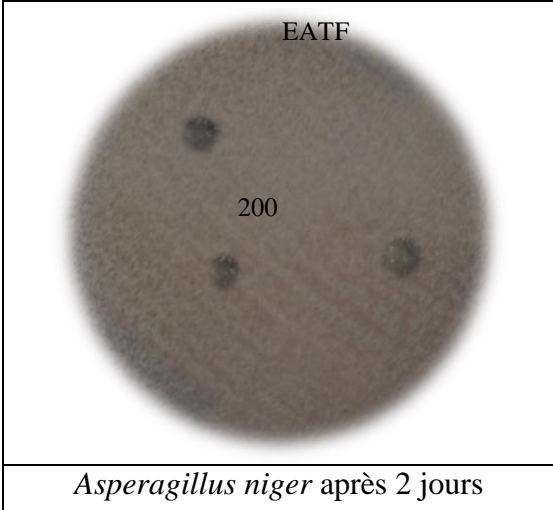
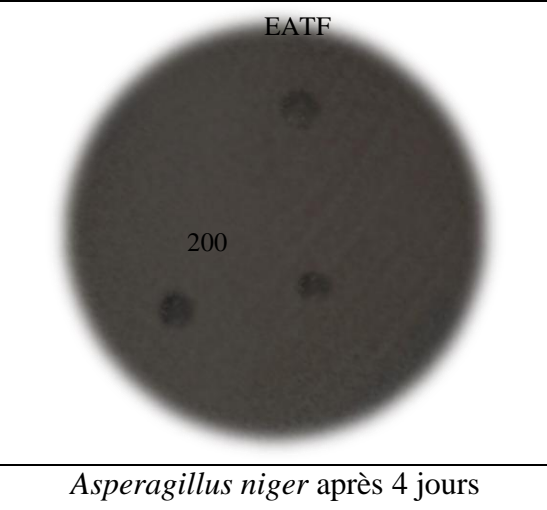
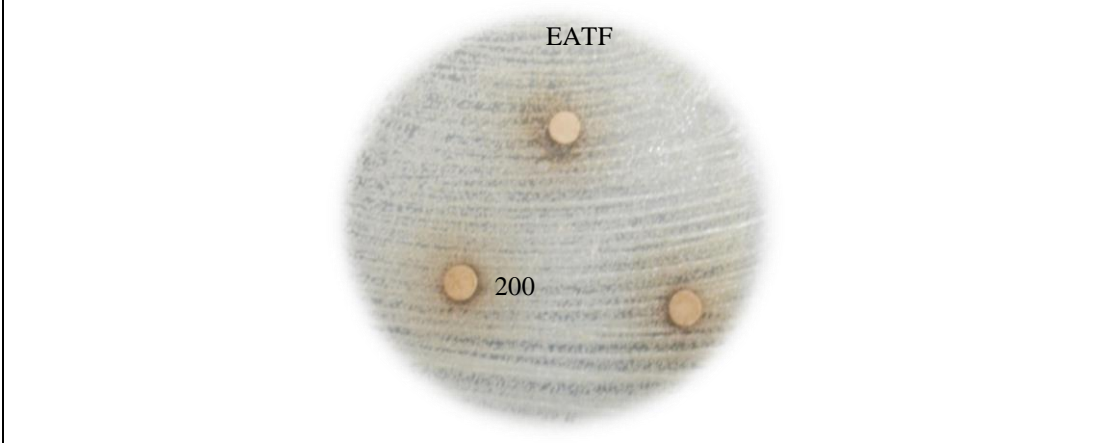
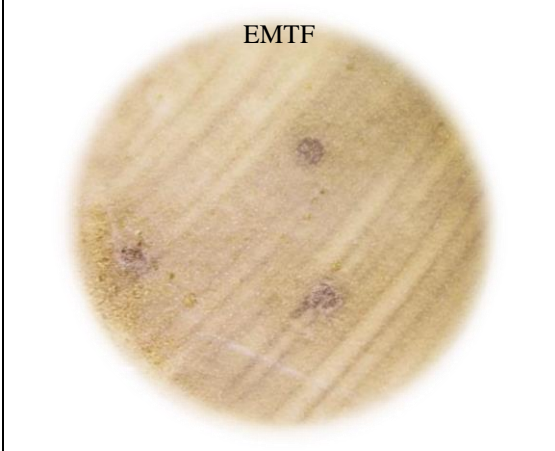
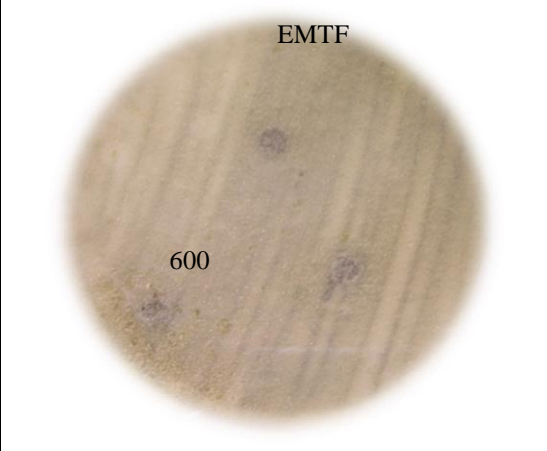
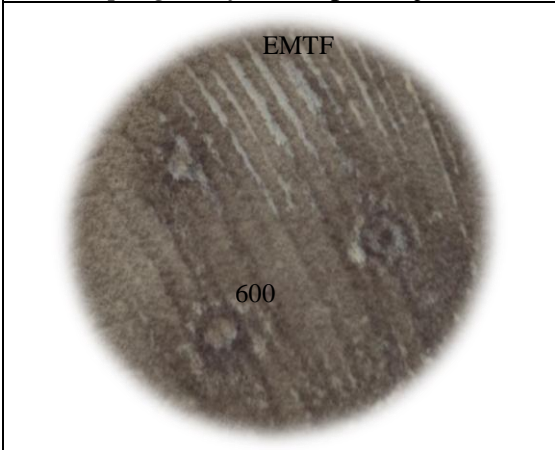
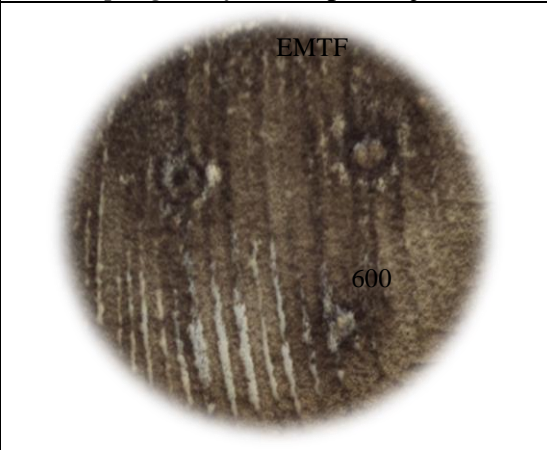
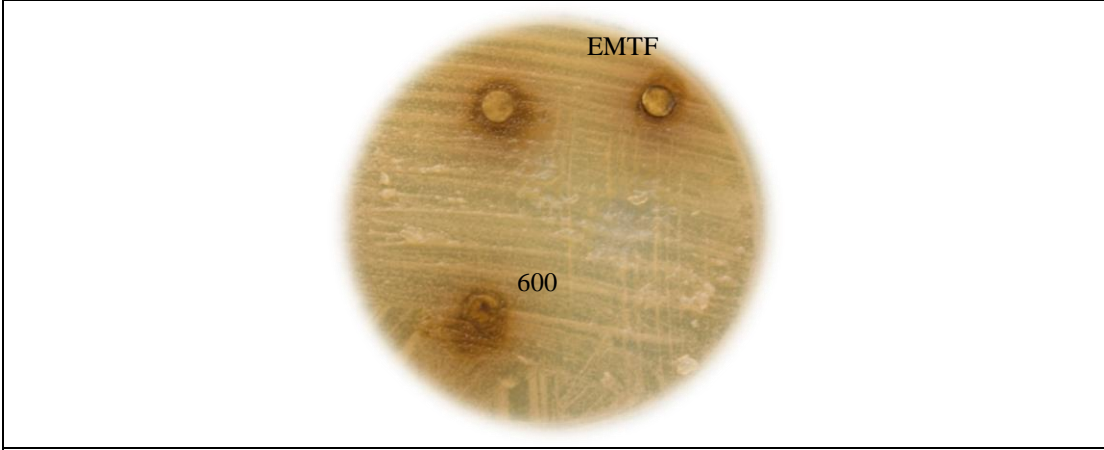
| | |
|--|---|
|  |  |
| <i>Aspergillus flavus</i> après 2 jours | <i>Aspergillus flavus</i> après 4 jours |
|  |  |
| <i>Aspergillus niger</i> après 2 jours | <i>Aspergillus niger</i> après 4 jours |
|  | |
| <i>Candida albicans</i> après 24 heures | |

Tableau 9 : Effet de l'extrait méthanolique (EMTF) de *T. fruticans* sur les champignons étudiés.

| | |
|--|---|
|  |  |
| <i>Aspergillus flavus</i> après 2 jours | <i>Aspergillus flavus</i> après 4 jours |
|  |  |
| <i>Aspergillus niger</i> après 2 jours | <i>Aspergillus niger</i> après 4 jours |
|  | |
| <i>Candida albicans</i> après 24 heures | |

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude des propriétés antioxydante et antimicrobienne a concerné une plante qui appartient à la famille des Lamiacées, *T. fruticans* employée en Algérie grâce à ses propriétés thérapeutiques.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité considérable de flavonoïdes. Il ressort de ces analyses que *T. fruticans* L., est riche en flavonoïdes de types flavones et flavonols.

Le potentiel anti-radicalaire des extraits a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité, donc cette plante contient des molécules qui sont considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires. Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antimicrobienne vis-à-vis 11 bactéries et 3 champignons pathogènes, les résultats microbiologiques ont montré que toutes les souches bactériennes testées sont résistantes. On peut déduire que nos extraits ne sont pas actifs sur les souches bactériennes testées. Ce qui est expliqué par la nature des composés présents dans cette plante.

T. fruticans est riche en métabolites secondaires, une exploitation de leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne implique une recherche plus poussée de ses principes actifs. Dans cette étude nous avons utilisé des extraits bruts, ce qui ne nous renseigne nullement sur les composés actifs responsables des activités antimicrobiennes et antioxydants.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de:

- ✓ Faire une étude biochimique sur les fruits, fleurs et les racines de *T. fruticans*.
- ✓ La confirmation de la capacité antioxydante par des tests *in vivo* ainsi que l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de cette plante et des extraits vis-à-vis d'autres souches bactériennes sont nécessaires.
- ✓ Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- ✓ Développer des médicaments anti-radicalaires à base de plantes, doués d'une activité anti-oxydante.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abdulmajed K., McGuigan C. and Heard C. Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. *Free Radic. Res.* 2005; 39: 491-498.
2. Ahmad N., Fazal H., Abbasi B., Anwar S. and Basir A. DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.). *Toxicol. Ind. Health.* 2012.
3. Albano S. and Miguel M. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products.* 2010, p.1-6.
4. Aleman C. Acid/base properties of flavonoids hydroxylated at positions 2 and 3: a novel quantum mechanical study in gas-phase and solution. *Journal of Molecular Structure (Theochem).* 2000; 528: 65-73.
5. Ammar R., Bhourri W., Sghaier M., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel I., Kilani S., Mariotte A., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M. and Ghedira K. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chem.* 2009; 116: 258-264.
6. Andersen Y. and Markham K. Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. Ed. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2006, p. 553-616.
7. Ashnagar A., Gharib N. and Foroozanfar S. Isolation and identification of the major chemical components found in the upper parts of *Teucrium fruticans* plants grown in Khuzestan province of Iran. *Chinese Journal of Chemistry.* 2007; 25: 1171-1173.
8. Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. and Pinkas M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung.* 1996; 46: 1086-1089.
9. Belhattab R. Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et anti aflatoxinogène d'extraits de *Origanum glandulosum* Desf. et *Marrubium vulgare* L. (famille des Lamiaceae). *Thèse de doctorat d'état Dépt Biologie, UFA Setif 2007.*
10. Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Ezzi L., Skandrani I., Boubaker J., Ben Sghaier M., Naffeti A., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K. Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug. Chem. Toxicol.* 2008; 31: 61-80.
11. Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Skandrani I., Naffeti A., Boubaker J., Ben Sghaier M., Bhourri W., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K. Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Ann. Microbiol.* 2007; 57: 453-460.
12. Beni Maleci L., Pinetti A., Servettaz O. Micromorphological and phytochemical characters of two subspecies of *Teucrium flavum* (Labiatae) from Italian flora. *Flora.* 1995; 190: 237-242.
13. Beni Maleci L., Servettaz O. Morphology and distribution of trichomes in Italian species of *Teucrium* sect *Chamaedrys* (Labiatae). A taxonomical evaluation. *Pl. Syst.* 1991; 174: 83-91.
14. Billing J. and Sherman P. W. Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it *Hot.* *Q. Rev. Biol.* 1998; 73: 3-49.

15. Bodas R., Lopez S., Fernandez M., Garcia-Gonzalez R., Rodriguez A., Wallace R. In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 2008; 145: 245-258.
16. Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R. and Pizzariello A. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem.* 2007; 100: 1481-1489.
17. Bosisio E., Giavarini F., Dell'Agli M., Galli G. and Galli C. Analysis by high performance liquid chromatography of teucriin A in beverages flavoured with an extract of *Teucrium fruticans* L. *Food Additives and Contaminants*. 2004; 21: 407-414.
18. Boulanger P. and Polonvski J. *Traité de biochimie*. Tome III. Ed. Masson, Paris, 1969, p. 760-770.
19. Boullard B. *Plantes médicinales du monde : réalités et croyances*. Paris, 2003, p. 1092-1107.
20. Bouzid W., Yahia M., Abdeddaim M., Aberkane M. and Ayachi A. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *L'Aubepine Monogyne*. *Lebanese Science Journal*. 2011 ; 12(1) : 59-69.
21. Bruneton J. *Elément de phytochimie et de pharmacologie*, Ed. Lavoisier, 1987, p.156-407.
22. Bruneton J. *Pharmacognosie, Photochimie, Plantes Médicinales*, Ed. mdicales internationales Editions Technique & Documentation, Lavoisier, Paris, 1993, p. 915.
23. Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3^{ème}Édition. Medicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.l.], Paris, 1999, p. 647-673.
24. Bruno M., Ciriminna R., Piozzi F., Rosselli S., Simmonds M. Antifeedant activity of neoclerodane diterpenoids from *Teucrium fruticans* and derivatives of fruticolone. *Phytochemistry*. 1999; 52: 1055-1058.
25. Bruno M., Maggio A., Piozzi F., Puech S., Rosselli S., Simmonds M. Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *polium* and their antifeedant activity. *Biochemical Systematic and Ecology*. 2003; 31: 1051-1056.
26. Bruno M., Maria C., De la Torre M., Savona G., Piozzi F. and Rodriguez B. A rearranged abietane diterpenoid from the root of *Teucrium fruticans*. *Phytochemistry*. 1990; 29(8): 2710-2712.
27. Camarda I. Ricerche etnobotaniche nel comune di Dorgali, Sardegna centro orientale. *Bollettino della Societ`a Sarda di Scienze Naturali*. 1990; 27: 147-204.
28. Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A. and Akpulat H. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (*Asteraceae*). *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 87: 215-220.
29. Carré P. *Précis de technologie et de chimie industrielle*. Ed Ballière, Paris, 1953, p.475.
30. Celiktas O., Hames Kocabas E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 2007; 100: 553-559.
31. Chabot S., Bel-Rhlid R., Chênevert R., Piché Y. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally

- specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytol.* 1992; 122: 461-467.
32. Chaudhry P., Cabrera J., Juliani R. and Varma D.). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol.* 1983; 32: p. 1995.
 33. Coll J. and Tandrón Y. Isolation and structure elucidation of three neoclerodane diterpenes from *Teucrium fruticans* L. (*Labiatae*). *Phytochemistry.* 2005; 66: 2298-2303.
 34. Coll J. and Tandrón Y. Neo-clerodane diterpenes from *Teucrium fruticans* L. *Phytochemistry.* 2004; 65: 387-392.
 35. Cowan M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 564-582.
 36. Crozier A., Jense E., Lean M. and McDonald S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography *J.Chromatography A.* 1997; 761: 315-321.
 37. Dacosta Y. Les phyto-nutriments bioactifs: 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, 2003, p. 317.
 38. De Vincenzi M., Maialetti F., Silano M. Constituents of aromatic plants: Teucrium A. *Fitoterapia.* 2003; 74: 746-749.
 39. Debeaux O. Flore kabylie du djurdjura ou catalogue méthodique et raisonné de toutes les plantes vasculaires et spontanées observées jusqu'à ce jour dans cette contrée. Librairie des sciences naturelles, paris, 1894, p. 301-302.
 40. Delorme J. and Robert A. Mycologie médicale. Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique, [Mont-Royal Québec], 1997, p. 184.
 41. Djabou N. Caractérisation et Variabilité des plantes à parfum aromatiques et médicinales de corse et de L'ouest Algérien. *Thèse de doctorat Dépt Chimie, UABB Tlemcen*, 2012.
 42. Dworkin M. and Falkow S. Proteobacteria : Gamma subclass. Ed. Springer, New York, NY, 2006, p. 1248.
 43. El Oualidi J., Verneau O., Puech S., Dubuisson J. Utility of rDNA ITS sequences in the systematics of *Teucrium* sect *Polium*. (*Lamiaceae*). *Plant Syst.* 1999; 1215: 49-70.
 44. Essawi T. and Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2000; 70: 343-349.
 45. Favier A. Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* 2003; 17: 108-117.
 46. Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 2006; 64: 390-396.
 47. Fazeli M., Amin G., Ahmadian-Attari M., Ashtiani H., Jamalifar H., Samadi N. Antimicrobial activities of *Iranian sumac* and *avishan-eshirazi* (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control.* 2007; 18: 646-649.
 48. Fontana G., Savona G., Rodriguez B., Maria C., De La Torre M. Unusual 6'-fatty acid esters of (24S)-24-ethylcholesta-5,25-dien-3Byl B-D-glucopyranoside from *Teucrium fruticans*. *Phytochemistry.* 1999; 50: 283-285.
 49. Frankel E. and Meyer A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 2000; 80: 1925-1941.

50. Frankel E., Huang S. W., Kanner J. and German J. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J. Agric. Food. Chem.* 1994; 42: 1054-1059.
51. Gómez-Caravaca A., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006; 41: 1220-1234.
52. Gharaibeh M., Elayan H., Salhab A. Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*. *J. Ethnopharmacol.* 1988; 24: 93-99.
53. Ghedira K. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytother.* 2005; 3: 162-169.
54. Grotewold E. The Science of Flavonoids. Springer Science+Business Media, Inc Library of Congress Control Number: 2005934296, 2006.
55. Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole 2005; 554-558.
56. Haddadi H. Détermination de l'activité antioxydante de quelques fruits. *Mémoire de magister Université de Béjaïa*, 2005; p. 76.
57. Harborne J. Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep.* 1997; 14: 83-98.
58. Harborne J., Tome-Barberan F., Williams C. and Gil M. A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry.* 1986; 25(12): 2811-2816.
59. Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T., Shiota S., Tsuchiya T. and Yoshida T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Phytochemistry.* 2005; 66(17): 2047-2055.
60. Havsteen B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics.* 2002; 96: 67-202.
61. Hung V., Maeda T., Miyatake K., Morita N. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research International.* 2009; 42: 185-190.
62. Ilhami G., Metin U., Munir O., Suktru B., Irfan K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Teucrium polium* L. *J Food Tech.* 2003; 1: 9-16.
63. Iniesta-Sanmartin E., Tomas-Barberan F., Guirado A., Tomas-Lorente F. Antibacterial flavonoids from *Helichrysum picardii* and *H. italicum*. *Planta Med.* 1990; 56: 648-9.
64. Jones W. and Kinghorn A. Extraction of plant sec on dary metabolites. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press, (Totowa). 2005, p. 323-411.
65. Kästner A. Übersicht zur systematischen Gliederung der Gattung *Teucrium* L. *Bioscosme Mesgeen.* 1989; 6: 63-78.
66. Kaufmann S. Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer; R.G. Landes, New York; Austin, 1997, p. 345.
67. Khleifat K., Shakhaneh J., Tarawneh K. The Chronic Effects of *Teucrium fruticans* L on Some Blood Parameters and Histopathology of Liver and Kidney in the Rat. *Turk J Biol.* 2002; 26: 65-71.
68. Kisiel W., Stojakowska A., Piozzi F., Rosselli S. Flavonoids from *Teucrium fruticans* L. *Acta Societatis botanicorum poloniae.* 2001; 70(3): 199-201.

69. Kohen R. and Nyska A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.* 2002; 30: 620-650.
70. Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. and Vladimir-Knezevic S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta. Pharm.* 2004; 54: 65-72.
71. Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. and Sripal R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 2001; 33: 2-16.
72. Krishnan S., Manavathu E. and Chandrasekar P. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses.* 2009; 52: 206-222.
73. Lagnika L. Etude phyto chimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. *Thèse de doctorat de l'université louis pasteur. France, 2005.*
74. Lakušić B. Morphological variability and ecological differentiation of species of the genus *Teucrium* L. (*Lamiaceae*) in Yugoslavia. *Ph.D. Thesis, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, 2000.*
75. Lakušić B., Stevanović B., Jančić R., Lakušić D. Habitat-related adaptations in morphology and anatomy of *Teucrium* (*Lamiaceae*) species from the Balkan peninsula (Serbia and Montenegro). *Flora.* 2010; 205: 633-646.
76. Larwence A., Hammouda F., Salah A., ABADA S. and oucha__ N. Ñ. Valeur alimentaire des marcs de raisin. III. Rôle des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton : effet d'une addition de polyéthylène glycol 4000. *Ann. Zootech.* 1984; 33: 533-543.
77. Lesgards J. Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme; aspect chimiques et biochimiques. *Thèse de doctorat, 2000, p. 19-20.*
78. Maccioni S., Baldini R., Tebano M. and Cioni P. Essential oil of *Teucrium scorodonia* L. ssp. *Scorodonia* from Italy. *Food Chemistry.* 2007; 104: 1393-1395.
79. Macheix J., Fleuriet A. and Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2005, p. 4-5.
80. Maggi F., Bramucci M., Cecchini C., Coman M., Cresci A., Cristalli G., Lupidi G., Papa F., Quassinti L., Sagratini G. and Vittori S. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (*Asteraceae*) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anticariogenic formulations. *Fitoterapia.* 2009; 80: 313-319.
81. Male_Éev D. and Kunti_ç V. Investigation of metal--flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal--flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc.* 2007; 72: 921-939.
82. Marjorie C. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiol Rev.* 1996; 12: 564-582.
83. Markham K. Techniques of Flavonoid identification. Academic Press, London, 1982, chap. 1 and 2: 1-113.
84. Maurice N. L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, paris, 1997, p. 12-14.

85. Mazza G. and Miniati E. "Anthocyanins in Fruits, Veg etables and Grains", C.Press, *Boca Raton*. 1993; 362: 12- 18.
86. Menichini F., Conforti F., Rigano D., Formisano C., Piozzi F. and Senatore F. Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry*. 2009; 115(2): 679-686.
87. Muinby G. Flore de l'Algérie ou catalogue des plantes indigènes du royaume d'Alger. J-B. BAILLIERE, paris, 1847, p. 57-58.
88. Nijveldt R., van Nood E., van Hoorn D., Boelens P., van Norren K. and van Leeuwen P. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American J. Clinic. Nutr.* 2001; 74: 418-425.
89. Özkan G., Kuleasan H., Çelik S., Gokturk R. and Ünalo S. Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities. *Food Control*. 2007; 18: 509-512.
90. Percival S. Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004, p. 480.
91. Piozzi F. Further researches on the furoclerodanes from *Teucrium* species. *Heterocycles*. 1994; 37: 603-626.
92. Piozzi F., Bruno M., Rosselli S. Further furoclerodanes from *Teucrium* genus. *Heterocycles*. 1998; 48: 2185-2203.
93. Piozzi F., Bruno M., Rosselli S., Maggio A. Advances on the chemistry of furano-diterpenoids from *Teucrium* genus. *Heterocycles*. 2005; 65: 1221-1234.
94. Piozzi F., Rodriguez B., Savona G. Advances in the chemistry of the furanoditerpenoids from *Teucrium* species. *Heterocycles*. 1987; 25: 807-841.
95. Quezel P and Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris, 1963, p. 617-620.
96. Rasooli I. and Abyaneh M. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food. Control*. 2004; 15: 479-483.
97. Ray S. D., Wong V., Rinkovsky A., Bagchi M., Raje R. and Bagchi D. Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride-induced nephrotoxicity, dimethylnitrosamine (DMN)-induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 2000; 107: 105-128.
98. Ribéreau-Gayon J, Peynaud M, Ribéreau-Gayon P and Sudraud P. Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins. Ed. Dunod, Paris, 1972, p. 671.
99. Ricci D., Fraternal D., Giamperil L., Bucchini A., Epifano F., Burini G. and Curini M. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (*Lamiaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 98: 195-200.
100. Rice-Evans C., Miller N. and Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Plant Science*. 1997; 2: 152-159.

101. Samarth R., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A. Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radio-protective plant extract. *Food Chemistry*. 2008; 106: 868-873.
102. Sarker S., Latif Z. and Gray A. Natural Product Isolation. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press, (Totowa), 2005. P. 1-23.
103. Sarni-Manchado P. and Cheynier V. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, 2006, p. 2-10.
104. Savona G., Passannanti S., Paternostro M., Piozzi F., Hanson J., Hitchcock P., Siverns M. Two new diterpenoids from *Teucrium fruticans* L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans* 1978; 1: 356-359.
105. Seidel V. Initial and Bulk Extraction. In: Sarker D., Latif Z. and Gray A. Natural products isolation. Humana Press, (Totowa). 2005, p. 27-37.
106. Seigler D. Plant secondary metabolism. Ed. Kluwer Academic, Boston, 1998, p. 193-205.
107. Shahraki M., Arab M., Mirimokaddam E., Palan M. The effect of *Teucrium fruticans* (Calpoureh) on liver function, serum lipids and glucose in diabetic male rats. *Iranian Biomedical Journal*. 2007; 11(1): 65-68.
108. Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*. 2009; 112: 885-888.
109. Singleton V. and Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965; 16: 144-153.
110. Sokmen A., Gulluce M., Askin-Akpulat H., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M. and Sahin F. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*. 2004; 15: 627-634.
111. Sosa M and Tonn C. Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. *Phytochem Rev*. 2006: DOI 10.1007/s11101-006-9056-7.
112. Teixeira da Silva J. Mining the essential oils of the *Anthemideae*. *African Journal of Biotechnology*. 2004; 3: 706-720.
113. Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. and Sokmen A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem*. 2006; 95: 200-204.
114. Tohge T., Matsui K., Ohme-Takagi M., Yamazaki M. and Saito K. Enhanced radical scavenging activity of genetically modified *Arabidopsis* seeds. *Biotechnol. Lett*. 2005; 27: 297-303.
115. Turkmen N., Velioglu Y., Sari F., Polat G. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of *Germander*. *Molecules*. 2007; 12: 484-496.
116. Ulanowska K., Majchrzyk A., Moskot M., Jak-bkiewicz-Banecka J. and W_Âgrzyn G. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*. 2007; 62: 132-135.
117. Ulubelen A., Topu G., Sönmez U. Chemical and biological evaluation of genus *Teucrium*. Bioactive natural Products (Part D), *Elsevier*. 2000: 591-648.

118. Urquiaga I. And Leighton F. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.* 2000; 33: 55-64.
119. Valant-Vetschera K., Roitman J. and Wollenweber E. Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the *Lamiaceae*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2003; 31: 1279-1289.
120. Valsaraj R., Pushpangadan P., Smitt U., Adsersen A., Christensen S., Sittie A., Nyman U., Nielsen C. and Olsen C. New Anti-HIV-1, Antimalarial, and Antifungal Compounds from *Terminalia bellerica*. *J. Nat. Prod.* 1997; 60: 739-742.
121. Wächter G., Hoffmann J., Furbacher T., Blake M. and Timmermann B. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochem.* 1999; 52: 1469-1471.
122. Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 2004; 36: 829-837.
123. Wile Y. and Chichester M. The composition of the essential oil of a population of *Teucrium fruticans* L (Italia). *Flavour and fragrance journal*. 2001; 16: 367-369.
124. Yang D., Wang Q., Ke L., Jiang J. and Ying T. Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) rhizome. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* 2007; 16: 158-163.
125. Yao K., De Luca V. and Brisson N. Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant, Cell.* 1995; 7: 1787-1799.
126. Yrjöen T. Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. *Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki* 2004, p. 76.

ANNEXES

Annexes

Annexe I

Appareillage

- Bain-marie (MEMMERT).
- Autoclave.
- Balance de précision (RADWAG).
- Etuve BINDR WTB.
- Plaque chauffante agitatrice VELP.
- Spectrophotomètre UV-visible UNICO 1200 et (Spectronic 20 Genysis TM).
- Tamiseur RETCH.
- Haute.
- Vortex.

Solvants

- Méthanol, Chloroforme, Ethanol.
- Eau distillée.
- Eau physiologique : (1 g NaCl dans un litre d'eau distillée).

Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont :

- Acide caféique (Sigma).
- Réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich).
- Acide linoléique (Merck).
- Chlorure d'aluminium $AlCl_3$.
- Carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5 %).
- BHT (Sigma).
- β -carotène (Sigma).
- DPPH (Sigma).
- Quercétine (Sigma).
- Tween 40 (Sigma).
- Acétate de sodium.

Annexe II

Composition du milieu Mueller-Hinton

Extrait de viande de bœuf : 2.0g.

Peptone de caséine : 17.5g.

Amidon de maïs : 1.5g.

Agar : 17.0g.

pH : 7.4.

Composition du milieu Sabouraud

Peptone : 10.0g.

Glucose massé : 20.0g.

Agar : 15.0g.

pH : 6.0.

Annexe III: Courbes d'étalonnages

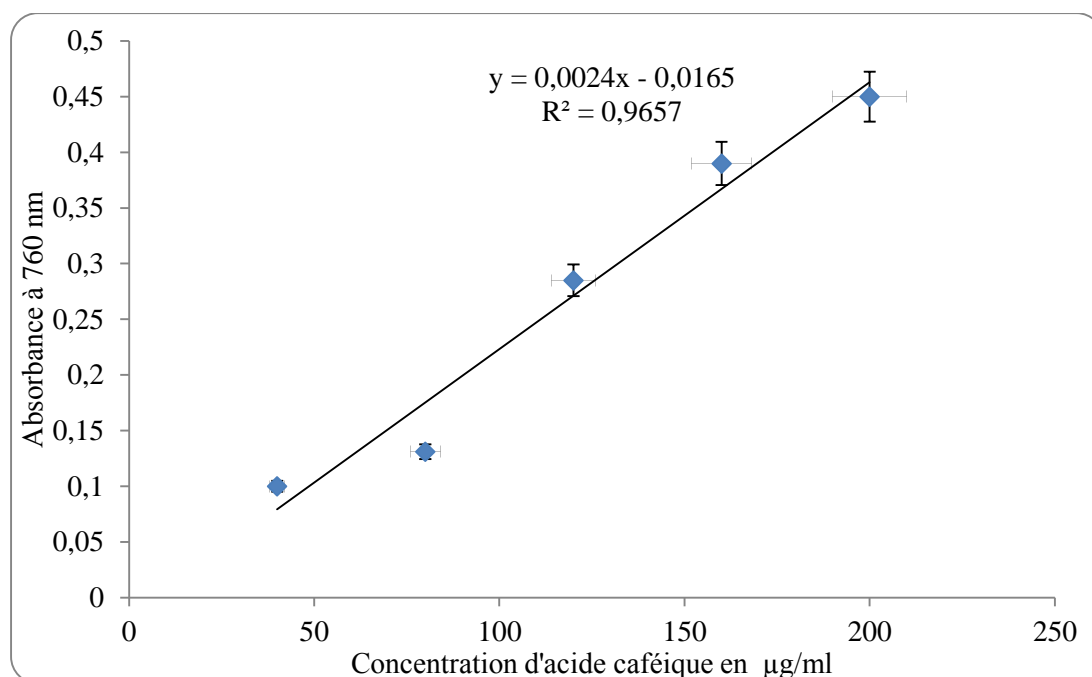


Figure 1 : Droite d'étalonnage d'acide caféique pour le dosage des polyphénols totaux.

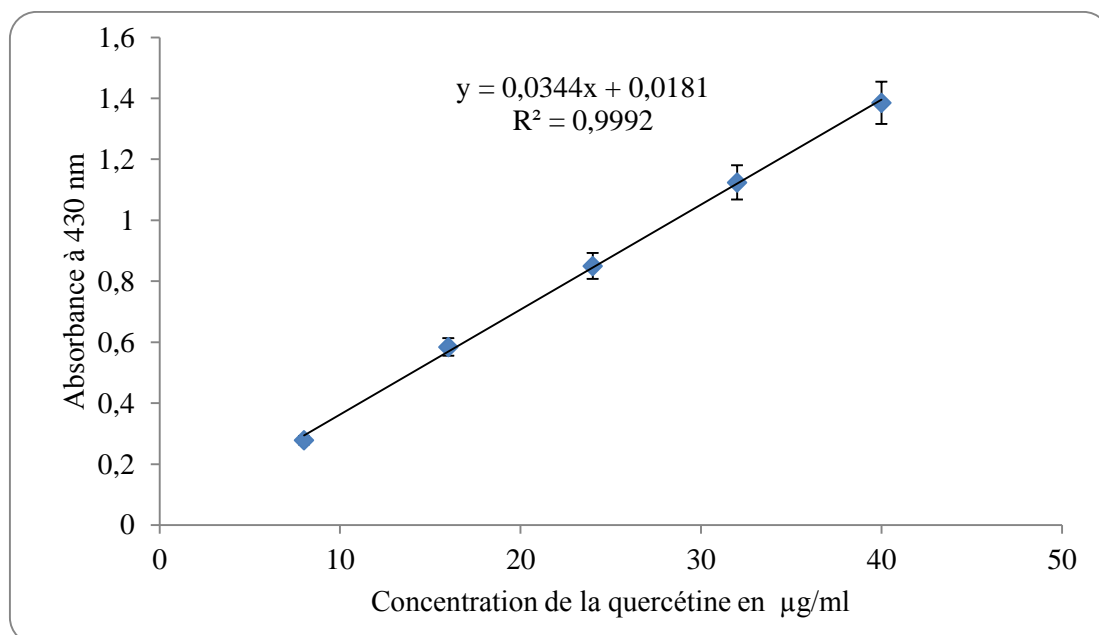


Figure 2 : Droite d'étalonnage de la Quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

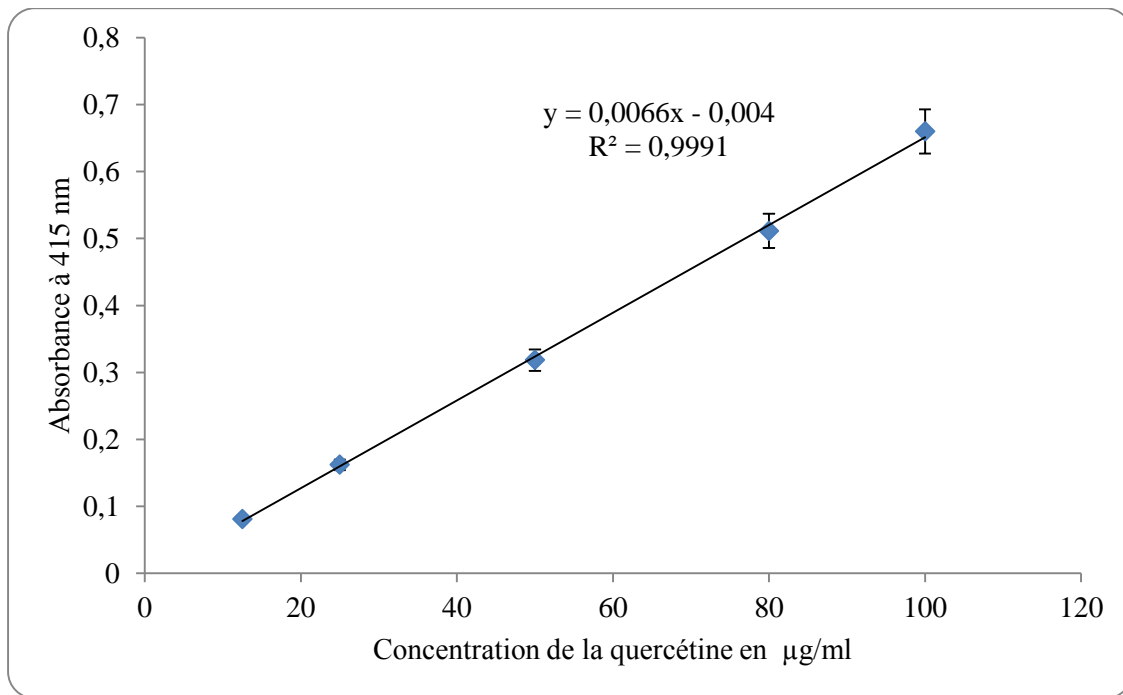
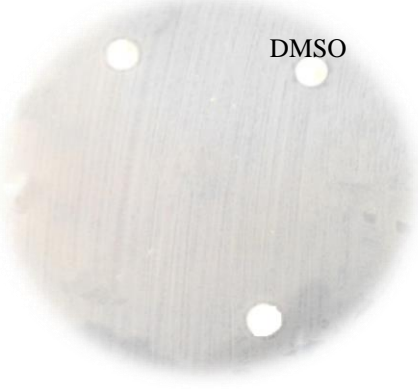
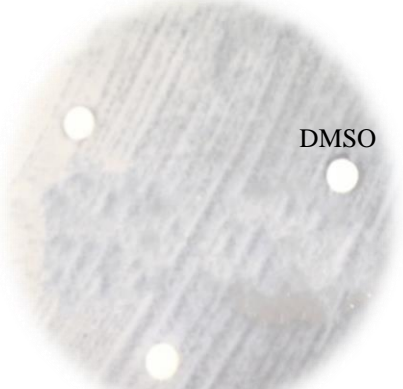
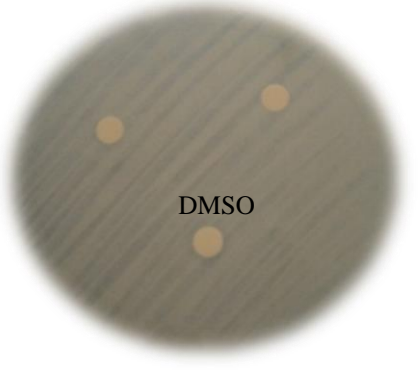
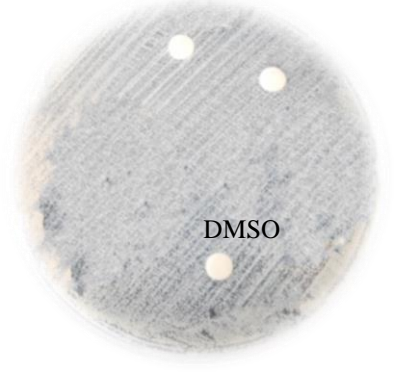
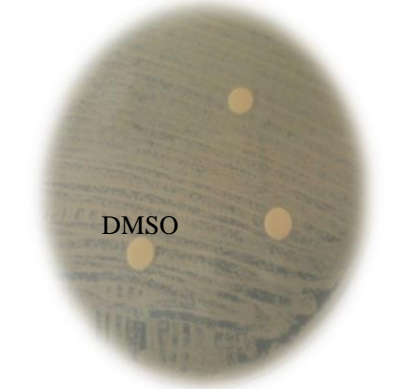
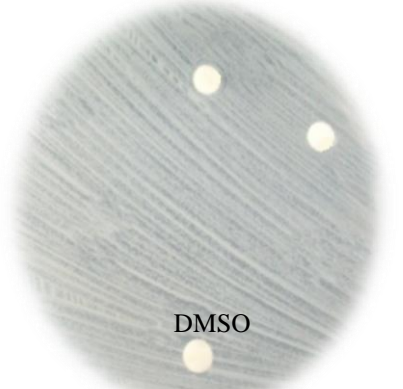
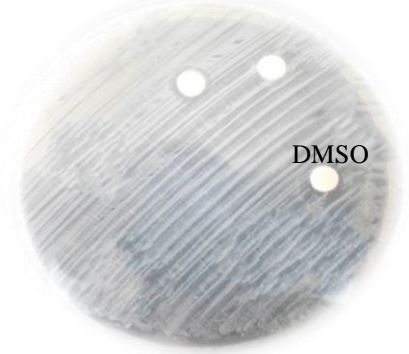
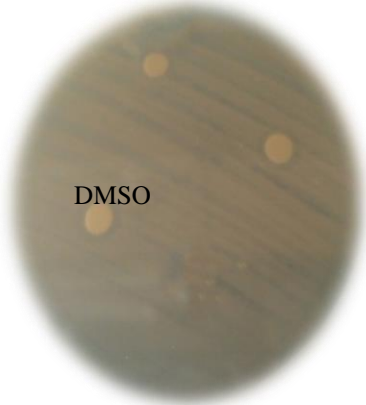
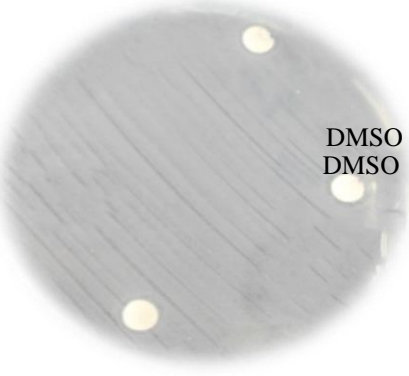

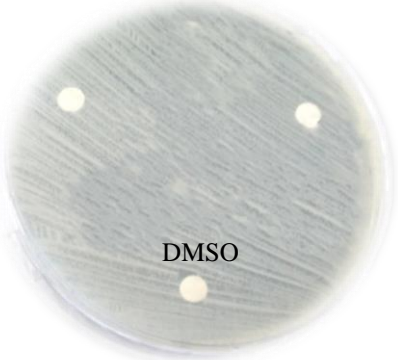


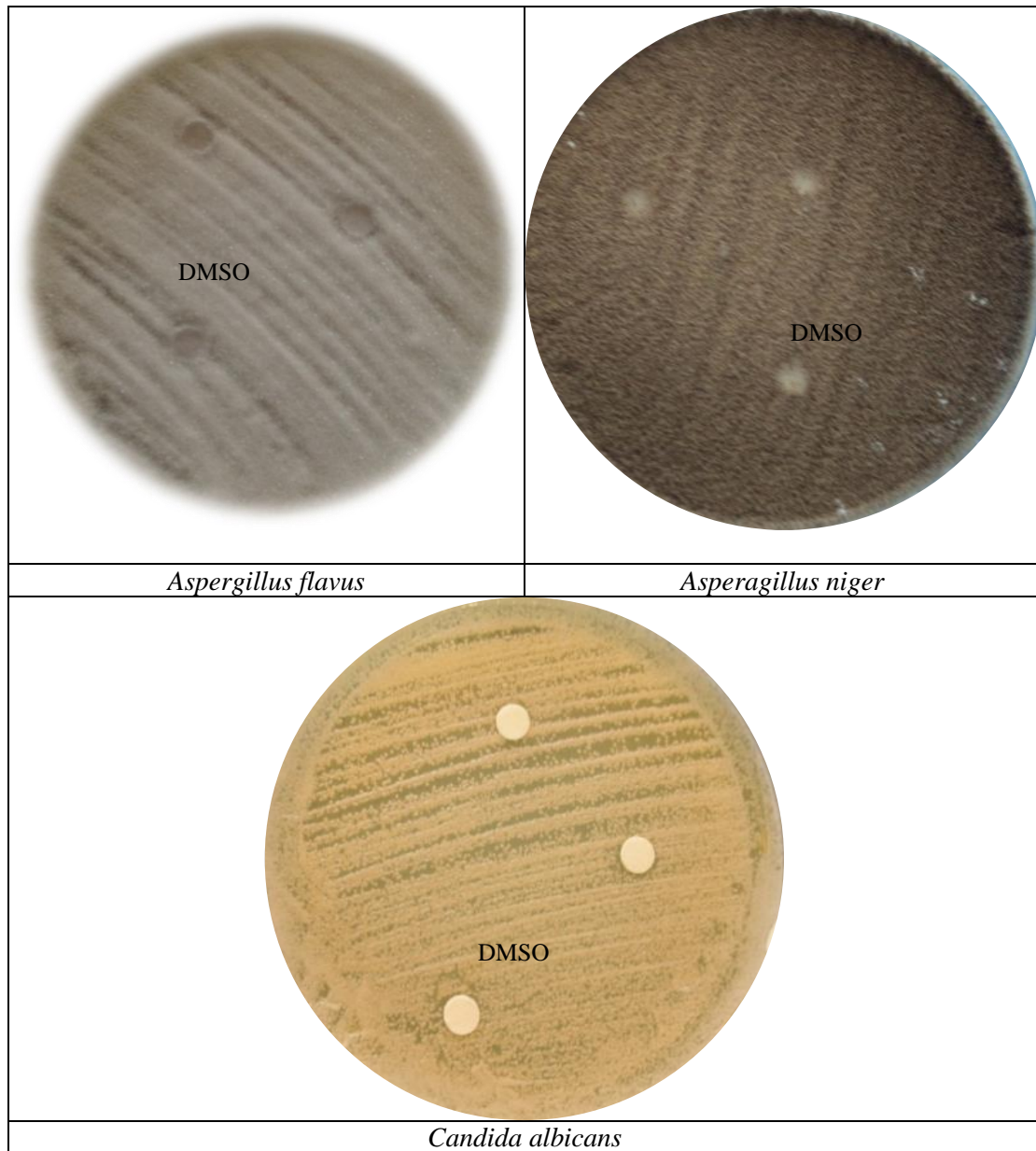
Figure 3 : Droite d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonoles.

Annexe IV: Effet du DMSO sur les bactéries étudiées.

| | |
|---|--|
|  <p>DMSO</p> |  <p>DMSO</p> |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 |
|  <p>DMSO</p> |  <p>DMSO</p> |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452 |
|  <p>DMSO</p> |  <p>DMSO</p> |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 |

| | |
|---|--|
|  <p>DMSO</p> |  <p>DMSO</p> |
| <p><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313</p> | <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p> |
|  <p>DMSO DMSO</p> |  |
| <p><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311</p> | <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> |
|  <p>DMSO</p> | |
| <p><i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659</p> | |

Annexe V : Effet du DMSO sur les champignons étudiés.



ملخص

تنتمي شجيرة *Teucrium fruticans* L. الى عائلة *Lamiaceae* وهي نبتة طبية واسعة الإستعمال في الطب التقليدي في الجزائر. قدر مردود الإستخلاص بالنقع في الميثانول للجزء الهوائي (EMTF) ب 11 % . و كان مردود المستخلص المائي بالنسبة للجزء الهوائي (EATF) عن طريق الغليان 9 % (ك/ك). قدرت عديدات الفينول الكلية في هذه المستخلصات بإستعمال متفاعل Folin-Ciocalteu حيث وجد 36 و 7 ملغ مكافئ حمض الكافيك/غ مادة جافة بالنسبة للجزء الهوائي (EATF) و (EMTF) على الترتيب, في حين وجدت الفلافونويدات الكلية والمقدرة بطريقة $AlCl_3$ 18 و 6 ملغ مكافئ الكرسيتين/غ مادة جافة لكل من EATF و EMTF على الترتيب. و قدر محتوى الفلافونولات والفلافونات ب 7 و 2 ملغ مكافئ الكرسيتين/غ مادة جافة بالنسبة لنفس المستخلصات على الترتيب. ينحصر النشاط المضاد للأوكسدة المقدر بطريقة البيتاكاروتين/حمض اللينولييك ما بين 72 و 82 % وهو قريب من نشاط الشاهد BHT 95 % عند تركيز 2 ملغ/مل. كانت قيم التراكيز المثبطة لـ 50 % (IC_{50}) من الجذر الحر 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) و المعبرة عن النشاط المضاد لهذا الأخير 37 بالنسبة لـ BHT و 66 بالنسبة لكل من EATF و 71 ميكروغرام/مل بالنسبة لـ EMTF. أبدى اختبار النشاط المضاد للجراثيم على 11 سلالة بكتيرية غرام + و غرام - و 3 سلالات فطرية بإستعمال طريقة انتشار الأفراس تأثيرا سلبيا على جميع السلالات البكتيرية والفطرية.

كلمات مفتاحية : متعدد الفينول, *Teucrium Fruticans* L., نشاط مضاد للأوكسدة, نشاط مضاد للجراثيم.

Abstract

Teucrium fruticans L. a shrub which belongs to the *Lamiaceae* family. It's a medicinal plant largely used in Algerian traditional medicine. The aerial parts of the plant (leaves and stems) were subjected to maceration in methanol (EMTF), the decoction has been conducted both on the aerial parts (EATF) using distilled water. The yields were 11 % and 9 % (w/w) for EMTF and EATF respectively. Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent and found to be 36 (EATF) and 7 (EMTF) mg caffeic acid equivalent/ g of dried weight. Flavonoids were evaluated by $AlCl_3$ method and shown to be 18 (EATF) and 6 (EMTF) mg quercetin equivalent/ g of dried weight. The flavones and flavonols were estimated to be 7 (EATF) and 2 (EMTF) mg quercetin equivalent/ g of dried weight. Antioxidant activity was evaluated using β -carotene/linoleic acid system, it ranged between 72 and 82 % for all extracts and seems to be closed to that of BHT 95 % when used at 2 mg/ml. Free radical scavenging effects were evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), The 50 percent inhibitory concentration for DPPH (IC_{50}) were 37 (BHT), 66 (EATF) and 71 μ g/ml (EMTF). The antimicrobial sensitivity of the extracts towards eleven bacterial strains (Gram+ and Gram-) and three fungi strains was assessed using to the disc diffusion agar test; the results was negative against all bacterial and fungi strains.

Key word: phenolic content, *Teucrium fruticans* L., antimicrobial activity, antioxidant activity.

Résumé

Teucrium fruticans L. est un arbuste qui appartient à la famille des *Lamiaceae*. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. La partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) a été soumise à une macération dans le méthanol (EMTF), la décoction est réalisée sur la partie aérienne (EATF) dans l'eau distillée. Les rendements étaient de 11% et 9% (m/m) pour EMTF et EATF. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 36 (EATF) et 7 (EMTF) mg équivalent d'acide caféique/ g de matière sèche. Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode utilisant les chlorures d'aluminium $AlCl_3$, la teneur est estimée à 18 (EATF) et 6 (EMTF) mg équivalent quercétine/ g de matière sèche. Le dosage des flavones et flavonols a révélé des teneurs de 7 (EATF) et 2 (EMTF) mg équivalent quercétine/ g de matière sèche. L'activité antioxydante a été réalisée par la méthode de décoloration du β -carotène / acide linoléique en utilisant des concentrations de 2 mg/ml pour les deux extraits et varie entre 72 et 82 % alors que celle du témoin positif BHT est de 95 %. Quant au test anti radicalaire évalué en utilisant le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH), les concentrations inhibitrices à 50 % (IC_{50}) sont estimées à 37 (BHT), 66 (EATF) et 71 μ g/ml (EMTF). L'activité antimicrobienne a été déterminée sur onze souches bactériennes (Gram+ et Gram-) et trois champignons selon la méthode de diffusion de disque, les résultats ont démontrés un effet négatif sur toutes les souches microbiennes.

Mots clés : Polyphénols, *Teucrium fruticans* L., activité antimicrobiennes, activité antioxydante.