

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université A. MIRA – BEJAIA
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés



Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En Génie des Procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

Thème

**Extraction et analyses physico-chimiques des principes
actifs de l'*Hedera helix* et étude de ses
Activités biologiques**

Membres du jury

Présidente : Mme Z.Bouariche

Examinatrice : Mme H. Belkacemi

Encadreur : Mme N.Belhadj

Réalisé par Nazim Chibane

Année Universitaire : 2020/2121

Remerciements

- ❖ Avant toute chose je remercie le bon dieu de m'avoir donné le courage, la patience, la bonne santé, qui m'ont permis de ne jamais abandonner, de poursuivre mes études, et de mener à bien ce travail.
- ❖ J'adresse mes remerciements à ma famille ma mère, mon père, mes deux sœurs qui m'ont montré un soutien inconditionnel et sans failles tout le long de ma vie.
- ❖ Je tiens aussi, à exprimer mes remerciements, à notre promotrice Mme BELHADJ.N, pour avoir accepté de nous guider tout le long de ce travail, pour ses précieux conseils, et surtout pour son soutien qui m'a permis l'accomplissement de ce travail.
- ❖ Merci à l'ensemble des membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et évaluer mon travail et de faire partie du jury.
- ❖ Je tiens aussi à remercier toute personne qui m'a aidé à réaliser ce modeste travail

Dédicaces

- ❖ Je dédie ce travail à mon inspiration ma héroïne du quotidien, celle qui m'a tellement appris, ma mère.
- ❖ Je dédie aussi ce travail à mon père, l'un des êtres les plus bons que je connais.
- ❖ Je n'oublie pas aussi les deux cancre tchipan et bazgot, ou malgré la différence de nom je considère comme ma famille, aussi amine blonda avec ses précieux conseils, je cite "arrête les études ", aussi ma petite caramel qui a toujours su me rendre le sourire.

Liste des figures

figure	intitulé	page
Chapitre I : aspet theorique de l'etude		
Figure I.1	lierre grim pant h edera helix	6
Figure I.2	fleur de h edera helix	7
Figure I.3	fruit de l'H edera helix	8
Figure I.4	composition des saponines	10
Figure I.5	structure du phénol	11
Figure I.6	Les principales classes des polyphénols	12
Figure I.7	structure générale de flavonoïde	13
Figure I.8	Structure des tannins condensés	13
Figure I.9	Structure des tannins hydrolysable	
Chapitre II materiel et methodes		
Figure II.1	lierre grim pant <i>HEDERA HELIX</i>	15
Figure II.2	Site de la récolte Aiguades -parc nationale de Gouraya à Bejaia	15
Figure II.3	les feuilles matures et les jeunes pousses du lierre grim pant <i>HEDERA HELIX</i>	16
Figure II.4	protocole de l'extraction aqueuse	17
Figure II.5	protocole d'extraction par macération dans les solvants organiques des feuilles jeunes et mature de <i>HEDERA HELIX</i>	18
Figure II.6	protocole dosage des polyphénols totaux	19
Figure II.7	protocole dosage des flavonoïdes	20
Figure II.8	: protocole dosage des tannins condensés	21
Figure II.9	Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince C.C.M	23
Figure II.10	colonne chromatographique	24
Figure II.11	les composants d'une HPLC(UltiMate 3000) impliquées dans une analyse (a)compartiment de pompage, (b)compartiment d'injection et de détection	25
Figure II.12	Les composantes et fonctionnement d'un spectrophotomètre Uv-Vis à double faisceau	26

Figure II.13	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test du radical DPPH	27
Figure II.14	Protocole de dosage anti-radicalaire in vitro par le test au DPPH	28
Figure II.15	Protocole du test antibactérien	32
Chapitre III : Résultats et discussion		
Figure III.1	Les rendements d'extraction des feuilles jeunes et matures de l' <i>Hedera helix</i>	33
Figure III.2	Les rendements d'extraction des feuilles jeunes et matures de ' <i>Hedera helix</i>	34
Figure III.3	teneur en polyphénols totaux extraits des feuilles jeunes et matures de lierre grim pant	40
Figure III.4	Les teneurs en flavonoïdes des extraits végétaux du lierre grim pant dans les différents solvants	41
Figure III.5	Les teneurs en tannins dans les extraits végétaux de lierre grim pant avec les différents solvants	42
Figure III.6	résultats des tests antioxydant avec le radical DPPH	43
Figure III.7	Indices d'inhibition du radical DPPH des extraits végétaux de <i>Hedera helix</i> dans les différents solvants	44
Figure III.8	courbe de l'indice d'inhibition en fonction de la concentration	46
Figure III.9	efficacité anti bactériennes des extraits aqueux des feuilles matures et jeunes de l' <i>hedera helix</i> (lierre grim pant)	47
Figure III.10	sirop préparé au laboratoire	48
Annexe		
Figure 1	droite etalonnage acide galique	56
Figure 1	droite etalonnage de la quercitine	56
Figure 3	droite etalonnage de la catechine	56
Figure 4	plaques CCM de l'extrait aqueux de lierre	57
Figure 5	spectre UV de la fraction 1	57
Figure 6	spectre UV de la fraction 2	58
Figure 7	spectre UV de la fraction 3	58
Figure 8	chromatogramme de l'extrait des feuilles mature obtenu par hplc	59
Figure 9	chromatogramme de l'extrait des feuilles mature obtenu par hplc	60
Figure 10	résultats de l'antibiogramme sur le <i>Escherichia coli</i>	61

Liste des tableaux

Tableau	Intitulé	Page
Chapitre I : aspet theorique de l'etude		
Tableau I.1	les principales classes des composes phénoliques	13
Chapitre II materiel et methodes		
Tableau II.1	tableau des volumes des tubes pour le test des saponosides	22
Chapitre III : Résultats et discussion		
Tableau III.1	résultat des tests phytochimique	34
Tableau III.2	hauteur de la mousse selon le tube	38
Tableau III.3	Résultats de l'analyse CCM à 365nm des extraits végétaux du lierre grim pant	39
Tableau III.4	Indice d'inhibition du radical DPPH dans les extraits végétaux de <i>Hedera helix</i> dans les différents solvants	46
Tableau III.5	Indices d'inhibition des extraits aqueux des feuilles du lierre grim pant et l'acide ascorbique (test positif) à différentes concentrations	47
Tableau III.6	Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits des feuilles de l' hedera helix	49
Annexe		
Tableau 1	Réactifs et leurs propriétés	56

Sommaire

titre	page
introduction	1
Chapitre I : aspet theorique de l'etude	
I.1 Phytothérapie	3
I.1.1 Limites, risques, mésusages et vigilance	3
I.1.2 Différents types de la phytothérapie	3
I.1.3 Effets secondaires de la phytothérapie	4
I.1.4 Les avantages de la phytothérapie	5
I.2 Etude bibliographique de l'<i>Hedera helix</i>	5
I.2.1. Usages thérapeutiques traditionnel du lierre	8
I.2.2. Composition du lierre	10
Chapitre II materiel et methodes	
II.1 Matière végétale	15
II.2 Préparation de l'échantillon	16
II.3 Extraction des composés phénolique	16
II.3.1 Extraction aqueuse par décoction	16
II.3.2 Extraction par macération dans les solvants organiques	17

II.3.3 Détermination du rendement des différentes extractions	18
II.4 Caractérisation et dosage des métabolites secondaires des extraits <i>HEDERA HELIX</i>	19
II.4.1. Screening photochimique des extraits végétales	19
II.4.2 Détection et Dosage des polyphénols totaux	19
II.4.3 Dosage des flavonoïdes totaux	20
II.4.4 Dosage des tannins condensés	21
II.4.5. Dosage des saponosides	23
II.4.6. Chromatographie sur couche mince CCM	23
II.4.7 La chromatographie sur colonne de silice	24
II.4.8 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	25
II.4.9 La spectrophotométrie (UV-vis)	26
II.5. Les tests de l'activité biologique de l'extrait de <i>Hdera helix</i>	27
II.5.1. Etude de l'activité anti-radicalaire in vitro par le Test au DPPH	27
II.5.2 Activité antibactérienne des extraits végétaux de <i>Hdera helix</i>	31
II.6 Préparation d'un sirop a base de feuilles mature d'hedera helix	32
Chapitre III : Résultats et discussion	
III.1 Rendement de l'extraction	33
III.1.2 Extraction par macération dans des solvants organiques à polarité différentes	34
III.2 Résultats de l'identification qualitative et quantitative	35
III.2.1. Tests phytochimiques	35
III.2.2 Chromatographie sur couche mince (C.C.M)	38
III.2.3 Chromatographie sur colonne de silice	39
III.2.4. Chromatographie liquide à haute performance HPLC	39
III.3 Dosage des composés phénoliques	40
III.3.1 Dosage des polyphénols	40

III.3.2 Dosage des flavonoïdes	41
III.3.3 Dosage des Tannins	42
III.4 Résultats des tests de l'activité biologique des extraits végétaux de <i>Hedera helix</i>	42
III.4.1 Résultats des tests de l'activité antiradicalaires in vitro des extraits des feuilles jeunes et matures de <i>Hedera helix</i>	43
III.4.2 Résultats des tests de l'activité antibactérienne	47
III.5 Résultat de la préparation du sirop	50
Conclusion et perspectives	51
references	52
Annexes	56
Resumé	57

Introduction

Introduction

L'utilisation des plantes comme remède est relativement ancienne, les cultures et les différentes civilisations d'Égypte, de la Chine et de la vallée des Indes, utilisaient des plantes médicinales pour traiter de nombreuses maladies. (Rostenberg et al., 1995).

Les premières traces de l'utilisation des plantes médicinales sont ceux de l'huile de Chaulmoogra d'*Hydnocarpus gaertn* (Perry et al., 1961), les graines de ricin et les graines d'opium trouvées dans des tombes égyptiennes antiques, 1500 avant JC. Selon l'histoire des plantes médicinales, la *Materia Medica* d'Hippocrate, qui est actuellement connu comme le père de la médecine est composée de près de 400 formulations ayant été compilées et expliquées (Rostenberg et al., 1995).

Au jour d'aujourd'hui, les plantes médicinales de par leurs richesses en métabolites bioactifs tel que : les alcaloïdes, les saponines, les flavonoïdes, les tannins et les composés phénoliques intriguent toujours les scientifiques et font sujet de recherche sur leurs différents effets thérapeutiques et leurs utilisations possible (Lordani, et al., 2018).

La plante à laquelle nous nous sommes intéressés est *Hedera Hélix*, aussi appelée le lierre grimpant, dont les feuilles constituent un véritable réservoir des principes actifs, notamment les saponines tri-terpéniques qui sont responsables des activités biologiques de cette plante (Facino, et al., 1995). Dans le domaine de la pharmacologie et de la cosmétique de nombreuses recherches ont été réalisées pour démontrer ses éventuelles propriétés anti-inflammatoires, antidiabétiques (Al-Sanafi et al., 2018), antibactériennes, antifongiques, anticancérigènes et antioxydantes (Timon et al., 1980).

Notre investigation, a pour but l'extraction des différents métabolites secondaires contenus dans les feuilles jeunes et mature de cette plante par deux méthodes et avec des solvants de différents polarités. Ainsi que l'identification et la caractérisation de ses derniers par les différentes méthodes physicochimiques. L'étude de l'activités anti oxydante et anti bactérienne de ses extraits végétaux a aussi été réalisée. Cette investigation est alors divisée trois chapitres :

- Le premier chapitre théorique qui renferme une étude botanique de *hedera helix* et une présentation théorique des différentes métabolites secondaires à effets thérapeutiques

- Le second chapitre englobe la partie matérielle et méthodes
- Le troisième chapitre est consacré à la partie résultats et discussion

Une conclusion vient clôturer l'étude réalisée sur les extraits des feuilles jeunes et matures du *hedera helix*

Chapitre I :

Aspect théorique de l'étude

I.1 Phytothérapie

La phytothérapie, au sens étymologique « la thérapeutique par les plantes » : elle utilise les plantes ou les formes immédiatement dérivées des plantes, en excluent les principes actifs purs issus de celles-ci. Elle correspond au traitement des pathologies bénignes par les plantes médicinales. C'est une thérapie familiale, de conseil et d'automédication, à viser symptomatique, parfois préventive (**Gozenkel et al., 2004**) .

De nos jours, nous constatons un renouveau d'estime des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cette raison que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origines végétales. Et ces principes actifs doivent être mis sous la forme la plus appropriée afin d'avoir une bonne administration et une efficacité optimale chez les patients. (**Iserin et al., 2001**).

I.1.1 Limites, risques, mésusages et vigilance

Il est d'usage d'exclure la phytothérapie des traitements des pathologies lourdes, sauf comme complément, pour pallier des effets secondaires des traitements principales.

Pratiquement la phytothérapie est bien adaptée aux pathologies légères, et au traitement symptomatique. C'est une thérapie familiale, de conseil, souvent préventive. Contrairement à la situation des pays en voies de développement, où l'offre thérapeutique est souvent restreinte à la médecine traditionnelle, elle est employée en Europe que dans des pathologies légères et passagères, parfois, trouve sa place dans des maladies chronique bénignes (insuffisances veineuses, symptômes urinaires de l'hypertrophie prostatique,). La phytothérapie vit actuellement un renouveau lié à un désir d'une frange du public de retour au « naturel » et au « sain », ainsi qu'à l'importation des médecine traditionnelles des pays asiatiques (médecines chinoise, indienne), dites « alternatives et complémentaires » (**Gozenkel et al., 2004**).

I.1.2 Différents types de la phytothérapie

- **Phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats (**Strang., 2006**).

- **Homéopathie** : a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive ;

les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale.

- **Aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.

- **Gemmothérapie** : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radiceles.

- **Herboristerie** : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée ; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

I.1.3 Effets secondaires de la phytothérapie

Les phytomédicaments se distinguent des médicaments chimiques de synthèse par la fréquence et l'intensité, mais pas fondamentalement, car, ils sont mieux tolérés que les médicaments synthétiques. Les effets indésirables des phytomédicaments sont classés comme suivant (**Ben Moussa., 2012**) :

- Phytomédicaments contenant des substances très actives et possédant un potentiel de risques proportionnel ; ont généralement disparu de l'arsenal thérapeutique moderne, sinon sous forme de substances pures isolées.

- Phytomédicaments contenant des substances actives et dont l'usage excessif (surdosage, utilisation prolongée) peut entraîner des effets indésirables.

- Phytomédicaments dont l'action thérapeutique n'a pas été clairement démontrée, mais pouvant néanmoins entraîner des effets indésirables.

- Phytomédicaments pouvant entraîner des effets secondaires dangereux du fait de la présence d'additifs non définis.
- Les réactions allergiques font aussi partie des effets secondaires classiques des phytomédicaments. Également l'ignorance des rapports dosage/effet est d'ailleurs, elle aussi, très problématique.

I.1.4 Les avantages de la phytothérapie

Actuellement, l'humanité s'oriente de plus en plus vers la phytothérapie. Les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels.

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (Iserin et al., 2001).

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale méditerranéenne, sahariennes une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémique (Gaussen et al., 1982), ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable. Parmi celles-ci, le lierre grim pant, qui fait le sujet de notre étude.

I.2 Etude bibliographique de l'*Hedera helix*

Helix hedera, ou communément le lierre, est une plante de jardin et d'intérieur. Dans certaine région, le lierre est utilisé comme décoration dans des fêtes et occasion. Le lierre était aussi un symbole de fidélité et présenté aux jeunes mariés dans la Grèce antique, les études ont démontré que la plante possédait plusieurs effets thérapeutiques, chose qui va être développé par la suite.

➤ Définition du lierre grimpant

Le Lierre **Figure I.1** est une plante médicinale, très ancienne liée à Dionysos et Bacchus. Ses feuilles renferment différents principes actifs facilitant l'expectoration de muqueuses et antispasmodiques. Les cataplasmes de feuilles de lierre étaient d'usage uniquement en médecine populaire en cas des maladies cutanées et de rhumatismes (Al-Sanafi et al., 2018). Le lierre est une plante très importante pour le monde animal. Plante fleurissante, les insectes y trouvent du nectar encore en automne.

Au printemps suivant, les oiseaux chanteurs picorent volontiers les baies et bâtissent leurs nids bien cachés entre les feuilles. Les fruits du lierre sont riches en lipides (30 % dans la pulpe située entre les graines et jouent ainsi un rôle important pour la survie de nombreux oiseaux à la fin de l'hiver (Wolfgang et al., 2008).



Figure I.1 : lierre grimpant *hedera helix*

➤ Taxonomie et Origine

- **Nom scientifique:** Hedera hélix
- **Nom commun:** Joli bois, lierre à cautère, bourreau des arbres, rampe de bois
- **Nom anglais:** ivy, Efeu (allemand)
- **Nom arabe :** اللبلاّب
- **Classification botanique:** famille des araliacées (Araliacées)
- **Région de la récolte:** Gouraya (Bejaia), Algérie.

- **Étymologie** : *Hedera* vient du latin *haerere* qui signifie « s'attacher » et *hélix* vient du grec *eilein* qui signifie « s'enrouler ».

➤ **Habitat et Origine**

Le lierre est une plante grimpante sur les arbres, Forêts d'essences mixtes, parcs, murs et maisons ou rampante sur le sol, bois, jardin. La plante préfère le climat tempéré d'Europe occidentale, centrale et du Sud, le lierre s'étend désormais au nord et à l'Est ainsi que sur le pourtour méditerranéen. En Algérie, le Lierre est une plante fréquente dans tout le pays sauf dans les régions arides, il se trouve à l'état sauvage comme il peut être cultivé (**Bedry et al., 1997**).

➤ **Caractéristiques de *Hedera hélix***

❖ **Les fleurs du lierre**

Les fleurs du Lierre et ses fruits se développent sur des rameaux, exposés en pleine lumière, et donc généralement au sommet des supports sur lesquels se hisse et se fixe le lierre à l'aide de ses crampons qui n'ont pas de fonction nourricière. La morphogénèse foliaire est modifiée sur les rameaux fertiles, les feuilles prenant une forme losangique. Lorsque le Lierre atteint sa période de floraison, il change d'aspect. Les feuilles des rameaux à fleurs ne sont plus lobées mais ovales et simplement pointues à l'extrémité. Les fleurs, petites, sont groupées dans des ombelles sphériques très serrées **figure I.2** (**Jean-Pierre et al., 2008**).



Figure I.2 : fleur de *hedera helix*

❖ Les fruits du lierre

Les fruits ce sont baies groupés comme les fleurs **figure I.3** contenant quatre loges elles sont bleuâtres portées en ombelles serrés de 8 à 10mm, elles viennent à maturité au printemps. Les fruits mûrs de lierre sont noirs et les feuilles des rameaux fertiles sont ovales.



Figure I.3 : fruit de *Hedera helix*

I.2.1. Usages thérapeutiques traditionnel du lierre

➤ Usage Interne

- Le Lierre est utilisé pour lutter contre, l'hypertension, les bronchites chroniques, il utilisé sous forme d'infusion (3 cuillerées de feuilles coupées par litre d'eau bouillante, et infusion pendant 10 minutes, ensuite prendre à raison de 3 tasses par jour.
- Contre la coqueluche et l'hypertension, à prendre sous forme de teinture au 1/10e à raison de 5 à 10 gouttes par prise selon l'âge, avec un maximum de 40 à 50 gouttes par jour
- En infusion les feuilles, ont des propriétés : décongestionnante, antispasmodique, analgésique, émollient

➤ Usage externe

L'utilisation des feuilles peut se faire sous plusieurs formes. :

- Le Lierre est utilisé en application cutanée comme cataplasme (1/4 des feuilles fraîches agrégées à 3/4 de farine de lin) pour soigner les plaies et les brûlures, les névralgies.
- Des pommades à 10% contre les brûlures, les rhumatismes, la cellulite, les durillons et les polypes du nez.
- On utilise aussi pour soigner la cellulite douloureuse et pour le massage (en dehors des crises inflammatoires).
- La résine du lierre est utilisée dans le traitement de la teigne,
- En décoction comme antalgique pour les douleurs dentaires et arrêter le développement d'une carie dentaire.
- Traiter les furoncles et faciliter la cicatrisation des plaies et de résorber les engorgements des seins. (Avilov et al., 1997).

I.2.2. Composition du lierre

Le lierre se compose de plusieurs substances :

- Saponosides tri terpéniques (2,5 à 6 %), tels que : l'hédérine et l'alpha-hédérine.
- Hétérosides flavones: rutoside
- Dérivés polyacétyléniques (falcarinone, falcarinol,...) stérols -scopoloside
- acide chlorogénique -acide caféique (intermédiaire clé dans la biosynthèse de la lignine)

Huile essentielle (germacrène D, limonène, sabinène,...) (Wolfgang et al., 2008).

❖ Les saponines

Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal. Le nom « saponine » est dérivé du mot latin *sapo*, qui signifie « savon ». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante (Wolfgang et al., 2008). Ils sont principalement produits par les plantes mais aussi par les organismes marins. Structuralement, les saponines peuvent être classés en deux groupes selon la nature de la génine : les saponines à génines tri-terpéniques, de loin les plus nombreux existant chez les angiospermes dicotylédones et chez certains animaux marins et celles à génines stéroïdiques, presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones

(Avilov et al., 1997). La figure I.4 résume la composition des saponines.

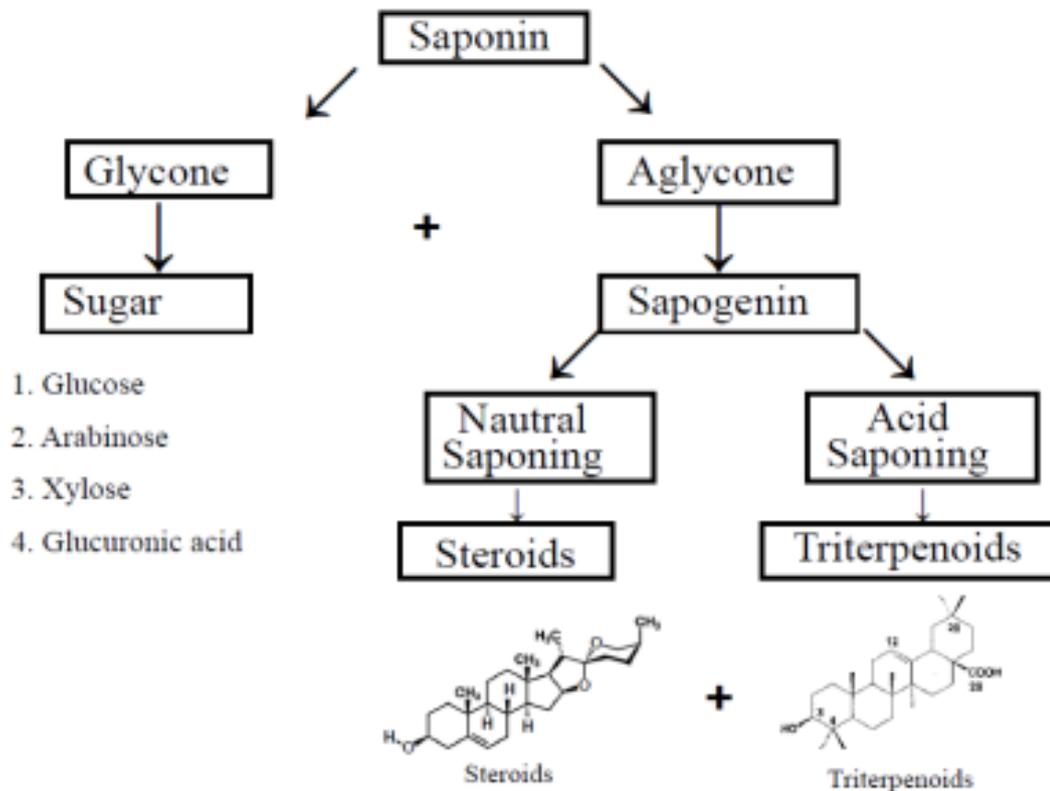


Figure I.4 : composition des saponines

❖ Sources de saponines

Les saponines sont un ensemble de molécules totalement naturelles produites par certains animaux et certaines plantes (quinoa, lierre, soja, salsepareille, etc). Cependant, elles ne représentent aucun danger pour l'homme (Dilimi et al., 2019).

❖ Propriété pharmacologique des saponines

- Les saponosides (hédéracoside C) aux propriétés expectorantes, antispasmodiques et qui favoriseraient, en outre, l'élimination du mucus bronchique.
- Les hédéracosides possèdent aussi des propriétés antifongiques, antibactériennes et

antiparasitaires.

- Les saponines contiennent par ailleurs d'autres composés comme le faltarinol qui présente des activités antimycosiques, antimicrobiennes, analgésiques (**Zahalka et al., 2011**).

❖ Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandue dans le règne végétal. La structure de base est un phénol, qui est un cycle aromatique hydroxylé, comporte plusieurs groupements hydroxyles associés à un ou plusieurs noyaux benzéniques **figure I.5** (Aaref et al., 2015).

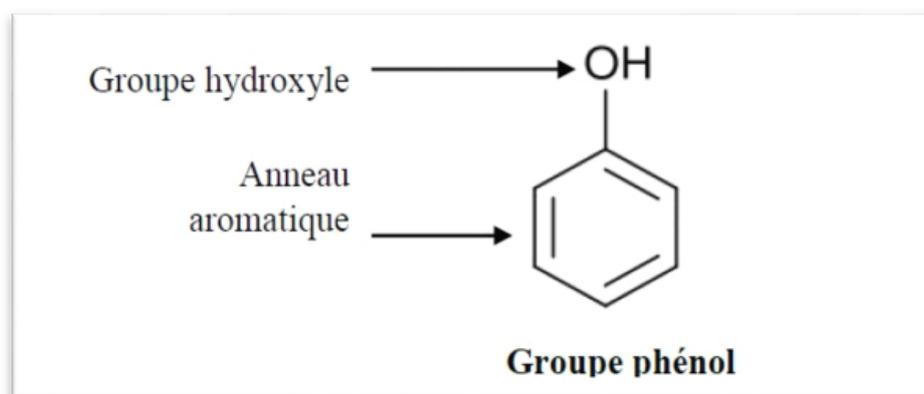


Figure I.5 : structure du phénol

Les composés phénoliques sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les compose et aussi la substitution qui les lie. Les principales classes des composés phénoliques sont mentionnées dans **la figure I.6**

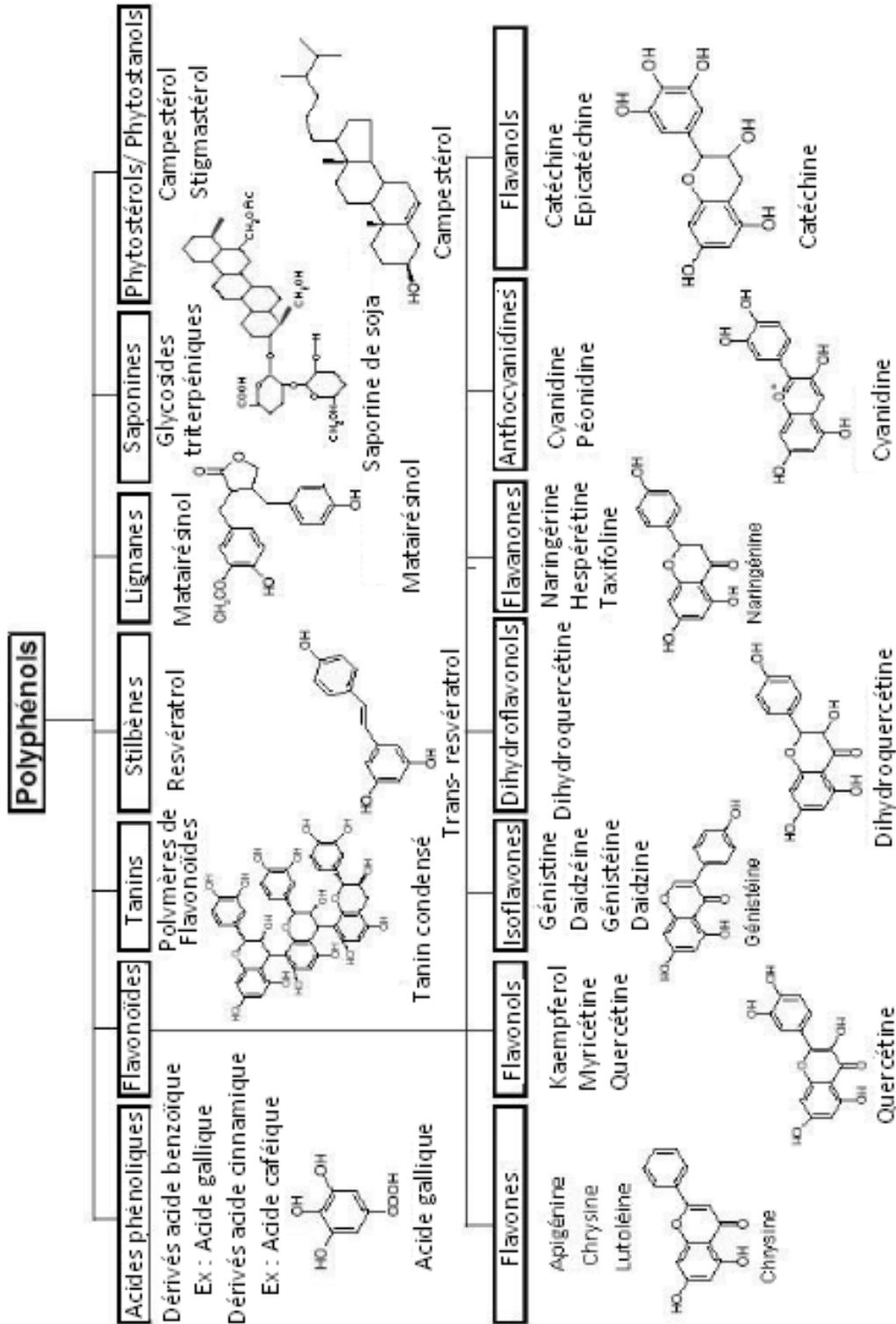


Figure I.6 : Les principales classes des polyphénols (Merguem et al., 2009).

❖ Propriété pharmacologique des polyphénols

Les composés phénoliques sont des molécules qui présentent un grand potentiel thérapeutique, car ils ont une influence sur le stress oxydatif, les troubles métaboliques, l'apport énergétique et la réduction de l'état pro-inflammatoire (**Gomez et al.,2006**).

❖ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues de plantes, présentes dans tout le règne végétal (**V.David et al., 2014**). Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. C'est des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (cycles A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C). **Figure I.6**

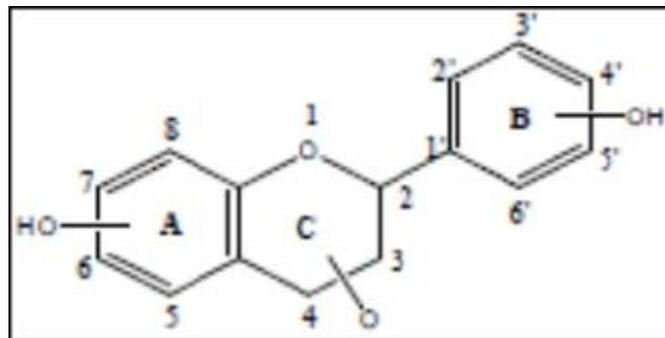


Figure I.7 : structure générale de flavonoïde

❖ Propriété pharmacologique des flavonoïdes

Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet, ce qui explique une grande part de leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire et des colorants. Ils possèdent en outre un intérêt médical considérable (**V.David et al., 2014**).

❖ Les Tannins

Les tannins (ou tannins) sont des composés phénoliques complexes à haut poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da. Ce sont des molécules fortement hydroxylées

appartenant à la classe des polyphénols et pouvant les trouver dans divers organes : l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les grains (Aaref et al., 2015).

Ces composés naturels produits par les plantes et se caractérisent par leurs capacités de se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que les glucides, les acides nucléiques, les stéroïdes et les alcaloïdes pour former un précipité. On distingue deux grands groupes différents en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique.

- **Les tannins condensés** : sont des polymères (d'où leur nom) de dérivés de résidus flavonols (fig. a) liés par des liens C-C (un exemple en fig. b, mais de nombreuses autres combinaisons existent) ; ils sont produits par la plupart des végétaux terrestres.

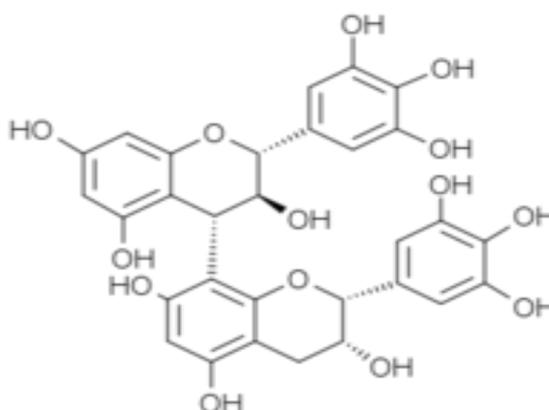


Figure I.8 : Structure des tannins condensés

- **Les tannins hydrolysables** : sont des phénols liés à un résidu sucré par un lien ester (donc hydrolysable). Si le phénol est l'acide gallique, ce sont les gallitannins; s'il s'agit de l'acide hexa-hydroxy-diphénique, ce sont les ellagitannins. Oxydations et autres polymérisations engendrent des structures variées. On trouve les tannins hydrolysables chez les dicotylédones et ils sont plus facilement hydrolysables par les microorganismes que les précédents.

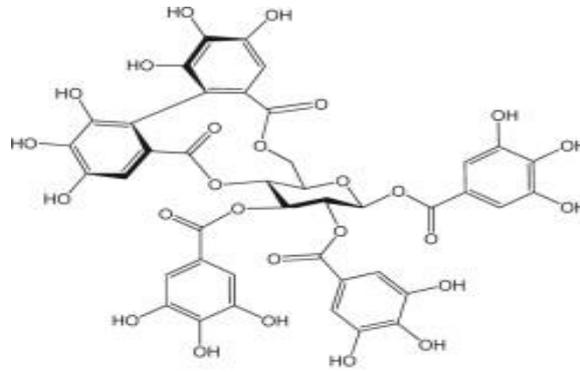


Figure I.9 : Structure des tannins hydrolysable

❖ Propriété pharmacologique des tannins

Les tannins sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose (Alkurd et al., 2008).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

II.1 Matière végétale

La variété du lierre étudiée est le lierre grimpant dont le nom scientifique est *Hedera helix* **figure II.1** la plante a été récoltée en moi mai 2021 aux Aiguades dans le parc national de Gouraya à Bejaia **figure II.2**. La plante a été identifié et certifié au département de biologie végétal de l'université A. Mira – Bejaia



Figure II.1 : lierre grimpant *Hedera Helix*



Figure II.2 : Site de la récolte Aiguades -parc nationale de Gouraya à Bejaia

II.2 Préparation de l'échantillon

Les feuilles ont été séparés des branchages, et triées en deux groupes ; les feuilles matures et les jeunes pousses elles ont été ensuite lavées à l'eau distillée pour éliminer la poussière et les insectes, elles ont été ensuite séchées sur papier absorbant **figure II.3**. Les feuilles sèches ont été ensuite conservées dans des boites hermétiques pour une utilisation future.



Figure II.3 : Feuilles jeunes et matures du lierre grimpant *Hedera Helix*

II.3 Extraction des composés phénolique

II.3.1 Extraction aqueuse par décoction

Concernant l'extraction aqueuse par décoction, une masse de (10g) a été et broyée dans un mortier puis ajoutée à 200 ml d'eau distillée, le tous a été porté à ébullition à 60°C pendant 15min. après filtration le résidu subit deux extractions et dans les même conditions opératoires pour extraire un maximum de métabolite de la masse de départ. Les trois filtrats ont été ensuite réunis, évaporés et conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure. **FigureII.4**

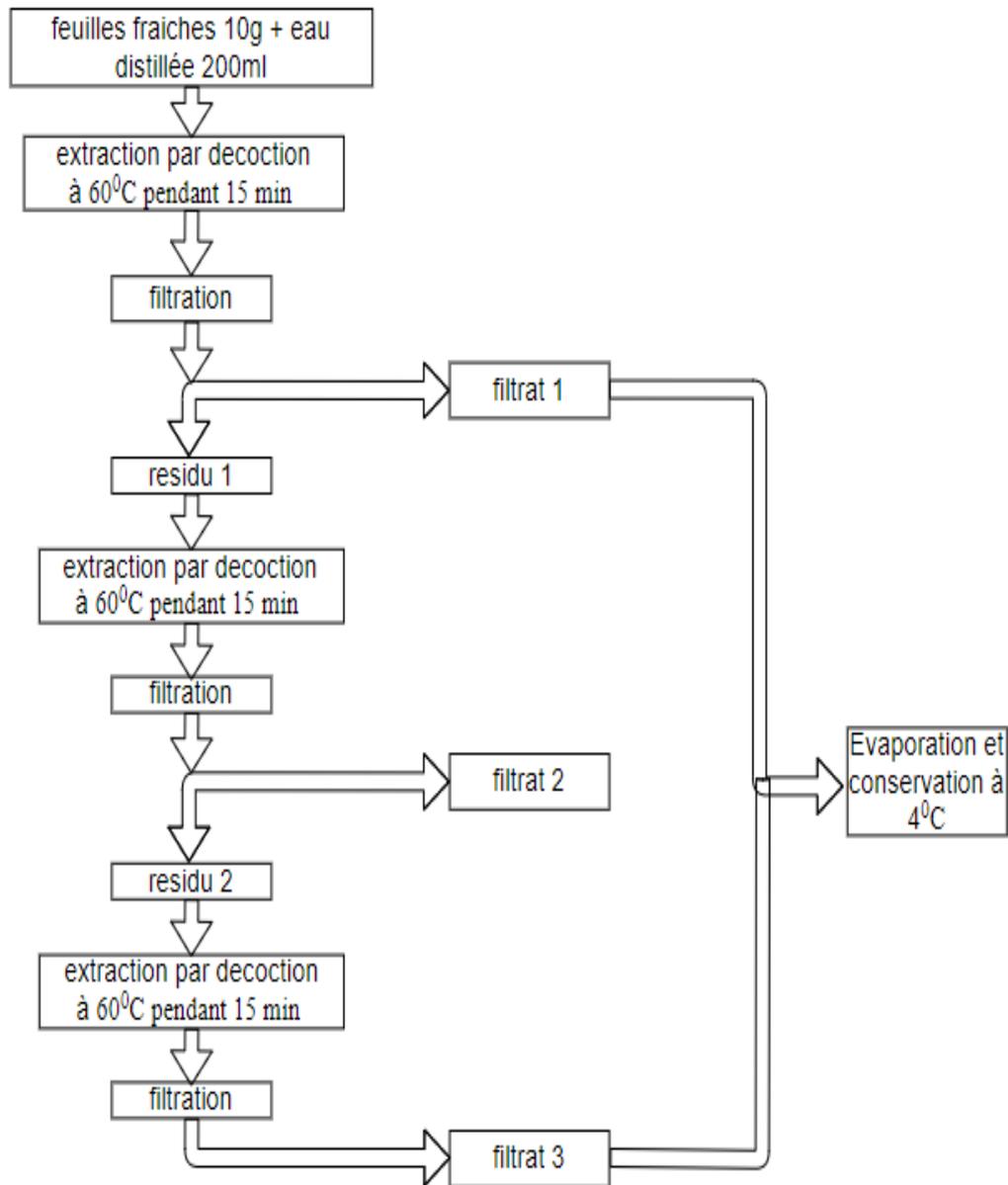


Figure II.4 : protocole de l'extraction aqueuse

II.3.2 Extraction par macération dans les solvants organiques

La macération est une méthode d'extraction solide-liquide la plus simple, elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec un solvant ou un mélange de solvant en absence ou en présence d'agitation, L'opération bien que généralement longue et à faible rendement, elle est très utilisée dans l'extraction de molécules thermosensibles (**Leybros et Fremeaux., 1990**). Les solvants organiques les plus fréquemment utilisés sont : le méthanol, l'éthanol, le

chloroforme et l'acétone (Bohui et al., 2018). Dans notre cas le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et l'acétone ont été utilisés pour l'extraction des différents métabolites des feuilles jeunes et matures lierre grimpant *Hedera Helix*.

L'échantillon végétale (10g) a été mélangé avec le solvant organique (200ml) l'ensemble a été maintenu sous agitation modérée à température ambiante pendant 30min. Après filtration sur papier wattman, le résidu de filtration a subi trois extractions successives. Les filtras de chaque extraction ont été réunis et l'évaporation des solvants réalisée. Les extraits secs ont été conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure. **Figure II.5**

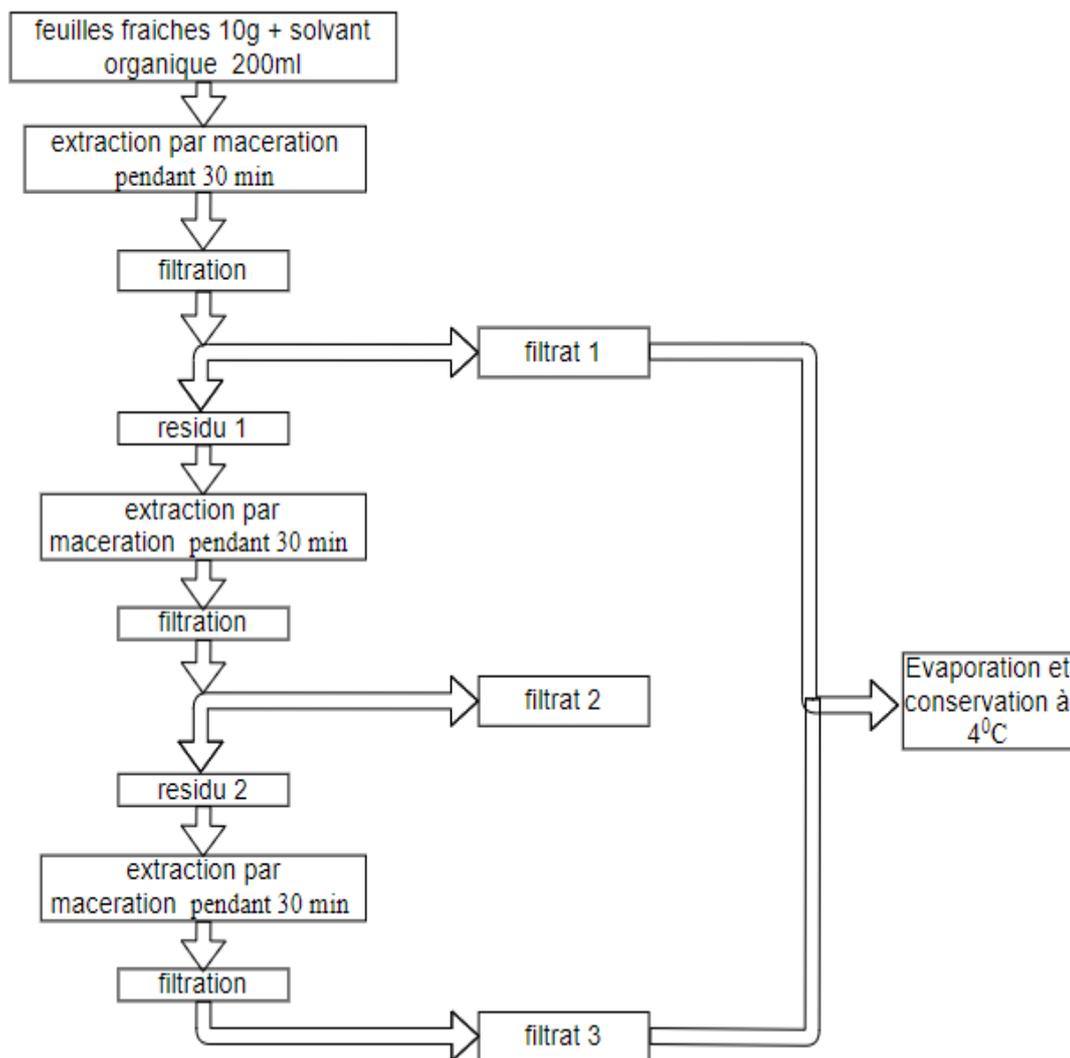


Figure II.5 : protocole d'extraction par macération dans les solvants organiques des feuilles jeunes et mature de *Hedera Helix*

II.3.3 Détermination du rendement des différentes extractions

Le rendement des différentes extractions est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec et la masse du matériel végétal, il est déterminé par l'équation suivante (Samavati et al., 2013).

$$R\% = \frac{mx}{m_0} \times 100$$

Telle que :

R% : le rendement de l'extraction

mx : la masse de la matière extraite sec

m₀ : la masse de la matière végétal initiale

II.4 Caractérisation et dosage des métabolites secondaires des extraits

HEDERA HELIX

II.4.1. Screening photochimique des extraits végétales

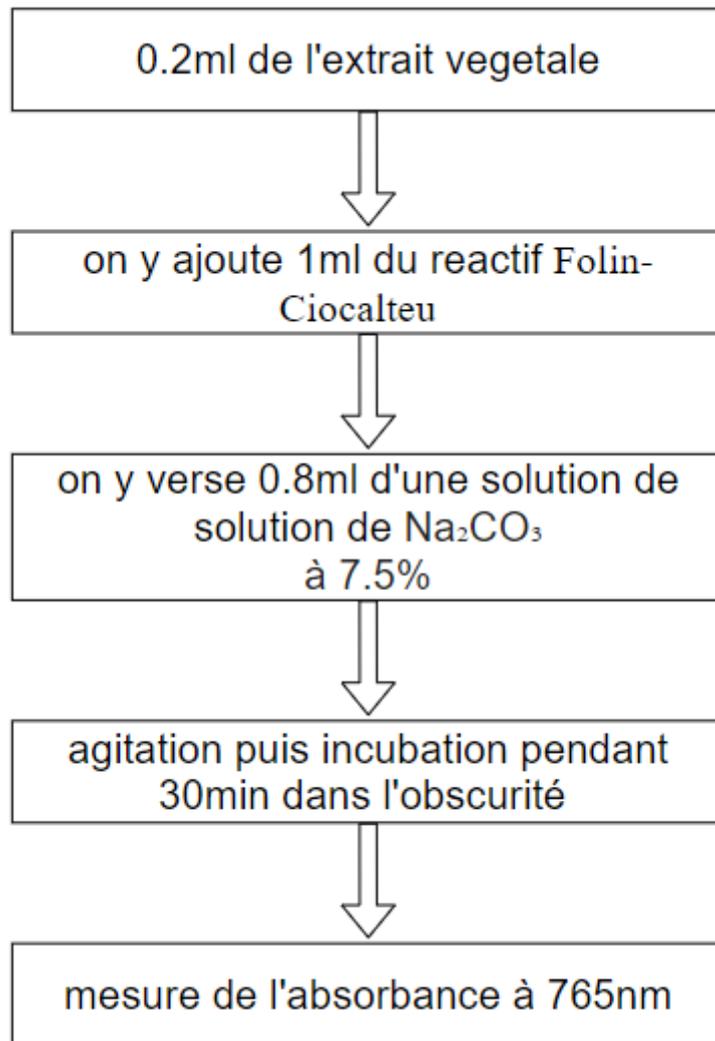
Cette identification colorimétrique permet la détection des différents métabolites secondaires (polyphénols totaux, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tannins ...etc) par des réactions de coloration et ou de précipitations de ses métabolites avec des réactifs spécifiques

II.4.2 Détection et Dosage des polyphénols totaux

✓ Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu . Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par (Singleton et Ross., 1965) en y apportant quelques modifications.

✓ Protocole de dosage des polyphénols totaux



FigureII.6 : protocole dosage des polyphénols totaux

✓ Expression des résultats

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits des différentes parties de la plante sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme. La quantification des polyphénols a été réalisée par l'exploitation d'une courbe d'étalonnage tracée avec un standard, l'acide gallique et à différentes concentrations (0,04-0,2mg/ml) et dans les mêmes conditions opératoires que les extraits végétaux. **Figure 1 Annexe.**

II.4.3 Dosage des flavonoïdes totaux

La réaction des chlorures d'aluminium avec les flavonoïdes mène à la formation d'un complexe acide labile très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.

C'est la méthode décrite par (**Bahorum et al., 1996**) à laquelle nous y'apporterons quelques modifications, nous utilisons la quercétine comme étalon.

✓ Protocole de dosage des flavonoïdes

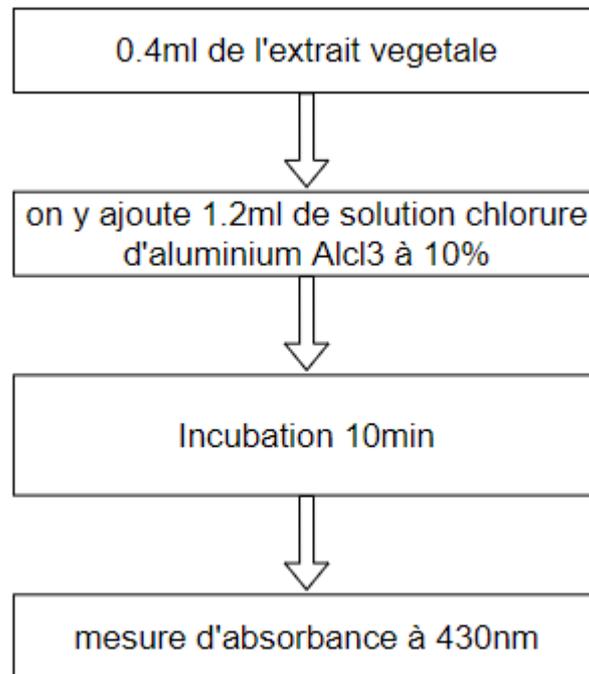


Figure II.7 : protocole dosage des flavonoïdes

✓ Expression des résultats

La teneur des flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercitrine par gramme de poids sec de la plante. La quantification des flavonoïdes est réalisée par l'exploitation d'une courbe d'étalonnage tracée avec un standard, la quercitrine à différentes concentrations et dans les mêmes conditions opératoires que les extraits végétaux **Figure 2 Annexe**.

II.4.4 Dosage des tannins condensés

La méthode à la vanilline avec l'HCl a été adoptée pour le dosage de ses métabolites. Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des tannins condensés et la formation de complexes rouges, l'anthocyanidols (Schofield et al., 2001).

✓ Protocole de dosage des tannins condensés

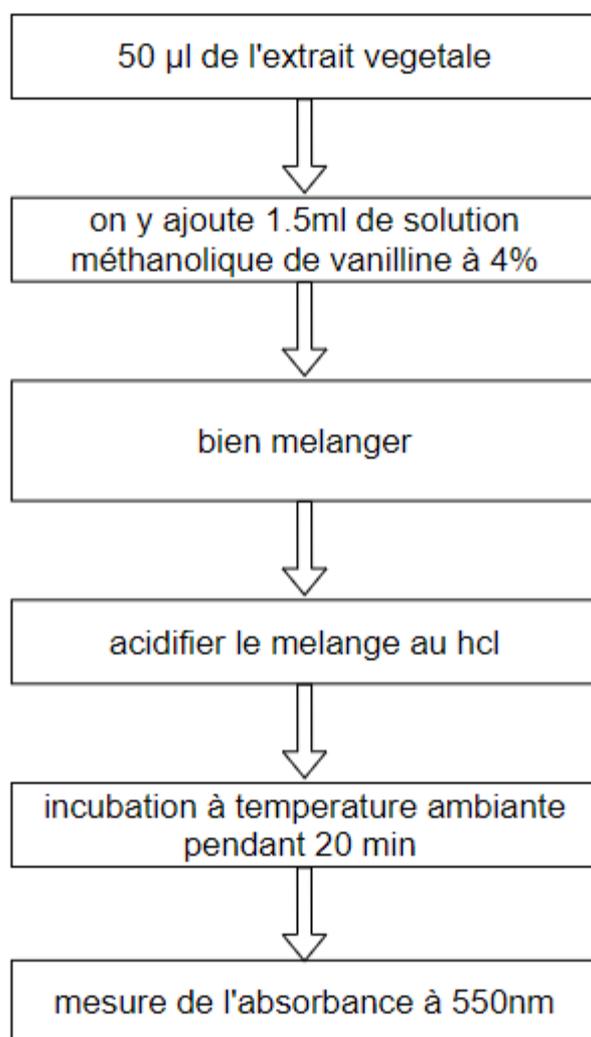


Figure II.8 : protocole dosage des tannins condensés

✓ Expression des résultats

La teneur en tannins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline décrite par (Julkunen-Titto, 1985). La teneur des tannins condensés est exprimée en milligramme d'équivalent de catéchine par gramme de poids sec de la plante. La

quantification des tannins condensés est réalisée par l'exploitation d'une courbe d'étalonnage tracée avec un standard, la catéchine à différentes concentrations et dans les mêmes conditions opératoires que les extraits végétaux **Figure 3 Annexe**.

II.4.5. Dosage des saponosides

Pendant les extractions aqueuses des feuilles jeunes et matures du lierre grim pant la formation d'une mousse persistante a été remarquée, ce phénomène est très souvent expliqué par la présence de saponosides dans les extraits du lierre (**Himour et al., 2016**).

Affin de confirmer la présence de ces saponines dans notre extrait aqueux, nous allons calculer l'indice de mousse de notre extrait, l'indice de mousse nous indique la concentration minimale pour laquelle nous obtenons une mousse de plus de 1cm après agitation, l'indice de mousse est calculé comme suite :

$$I_m = 1 \times V/C$$

I_m : l'indice de mousse.

C : concentration de l'extrait aqueux dans le premier tube ou la hauteur de la mousse dépasse 1cm.

V : volume totale dans le tube.

✓ Protocole

On prépare 10 tubes à essais contenant l'extrait aqueux à des concentrations différentes, telle que le volume totale dans chaque tube est de 10ml, selon le **tableau II.1**

Tableau II.1 : tableau des volumes des tubes pour le test des saponosides

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume extrait ml	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Volume eau ml	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

Le contenu de chaque tube a été vigoureusement agité pendant 15 secondes et laissé ensuite au repos pendant 10 minutes. La formation d'une mousse persistante confirme la

présence des saponosides dont la concentration est déterminée par une simple mesure avec une règle graduée de la hauteur de cette mousse. (Karumi et al., 2004).

II.4.6. Chromatographie sur couche mince CCM

C'est une technique d'analyse quantitative qui permet la séparation des constituants d'un mélange, selon la polarité des molécules. À l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile.

La phase stationnaire est une couche fine de silice (ou un autre gel) déposée sur un support approprié tel que les plaques de verre, plaques de polyester ou d'aluminium. Par contre la phase mobile est un solvant ou un mélange des solvants, nommée éluant.

L'éluant migre le long de la phase stationnaire par capillarité et entraîne les composés du mélange à séparer. **Figure II.9**



Figure II.9: Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince C.C.M

II.4.7 La chromatographie sur colonne de silice

La chromatographie sur colonne est une technique séparative analytique. Elle consiste à faire migrer les constituants à séparer sur une phase stationnaire à l'aide d'une phase mobile, cette méthode séparative permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange en l'associant à des méthodes spectrophotométriques tel que UV-Vis ou IR.

La colonne en verre équipée d'un verre fritté et d'un robinet est remplie d'une poudre, généralement de l'alumine ou de la silice, un solvant ou un mélange de solvant. Selon la

nature de l'éluant et du contenu de la colonne, certaines molécules sont plus facilement éluées que d'autres. **Figure II.10**



Figure II.10 : colonne chromatographique

II.4.8 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

L'HPLC est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces et il est possible de la coupler à un spectromètre de masse pour une identification plus précise des composés analysés. Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

L'ensemble des composants d'une HPLC (UltiMate 3000) impliquées dans l'analyse est représentés sur la **figure 12 Annexe**.

II.4.9 La spectrophotométrie (UV-vis)

La spectroscopie ultraviolet-visible (UV-vis) est utilisée pour mesurer l'absorbance d'un composé en solution. Elle couvre une plage de longueurs d'onde de 800 à 200 nm (**Long et al., 1997**). L'ensemble des composantes et le fonctionnement d'un appareil UV-vis est représenté sur la **figure II.13**. Dans notre étude un spectroscan50 a été utilisé. La loi Beer-Lambert permet de calculer la concentration d'un composé de la solution à partir de son absorbance par l'exploitation d'une droite d'étalonnage (**Swinehart et al., 1962**). Elle est donnée par la relation suivante :

$$A = \epsilon Lc$$

Telle que :

A : est l'absorbance (sans unité, généralement considérée comme unités arbitraires)

ϵ : est l'absorptivité molaire du composé ou de la molécule en solution ($M^{-1}cm^{-1}$)

L : est la longueur du trajet optique de la cuvette ou porte-échantillon (généralement 1 cm),

c : est la concentration de la solution (M)

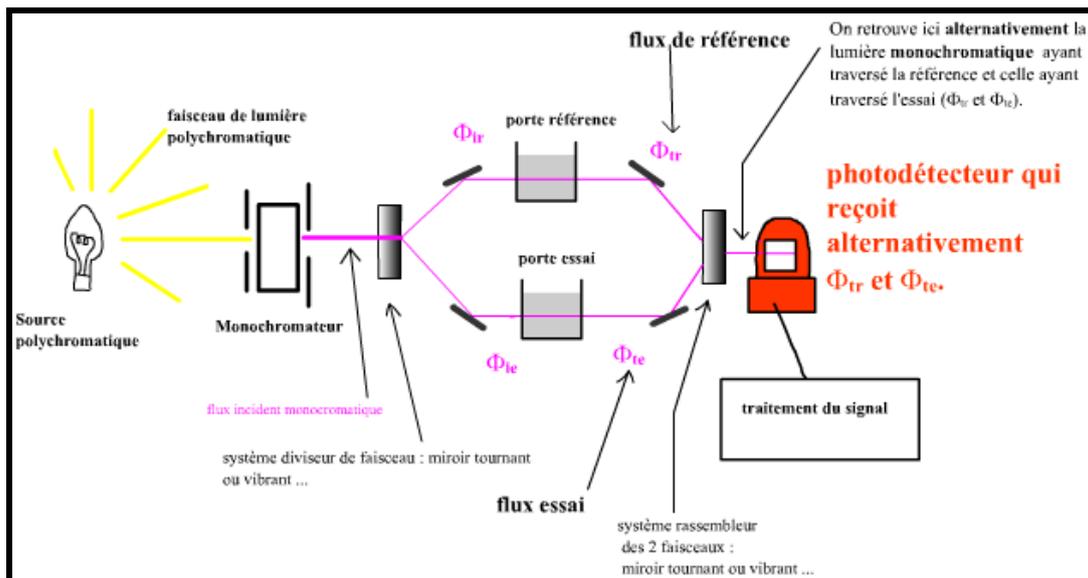


Figure II.12 : Les composantes et fonctionnement d'un spectrophotomètre Uv-Vis à double faisceau

II.5. Les tests de l'activité biologique de l'extrait de *Hdera helix*

II.5.1. Etude de l'activité anti-radicalaire in vitro par le Test au DPPH

Les réactions biochimiques dans le corps génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des radicaux libres, qui peuvent endommager par oxydation l'ADN et les protéines, entraînant certaines maladies notamment des cancers. L'action néfaste des radicaux libres peut être bloquée par des antioxydants qui neutralisent ces radicaux et éliminent leurs effets dommageables sur les constituants cellulaires (Szabo et al., 2007).

Pour diminuer l'oxydation dans notre métabolisme, des antioxydants synthétiques traditionnels tels que la vitamine C contenu dans les fruits notamment les agrumes sont utilisés depuis plusieurs décennies, Cependant, ces antioxydants fabriqués sont suspectés de présenter des effets négatifs sur la santé humaine. D'où, un intérêt croissant de trouver des antioxydants naturels tels que ceux contenus dans les feuilles du lierre (Molyneux et al., 2004).

✓ Principe

Le test DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante des molécules, en effet, le DPPH[•] se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables et la présence de ces radicaux DPPH[•] donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. La réduction des radicaux DPPH[•] par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution **figure II.13**. Le changement de couleur peut être suivie par spectrophotométrie à 515nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de plante peut être déterminée (Mishra et al., 2012).

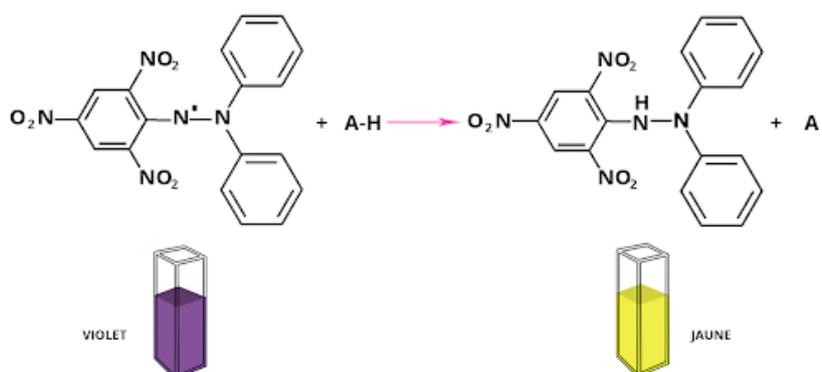


Figure II.13 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test du radical DPPH

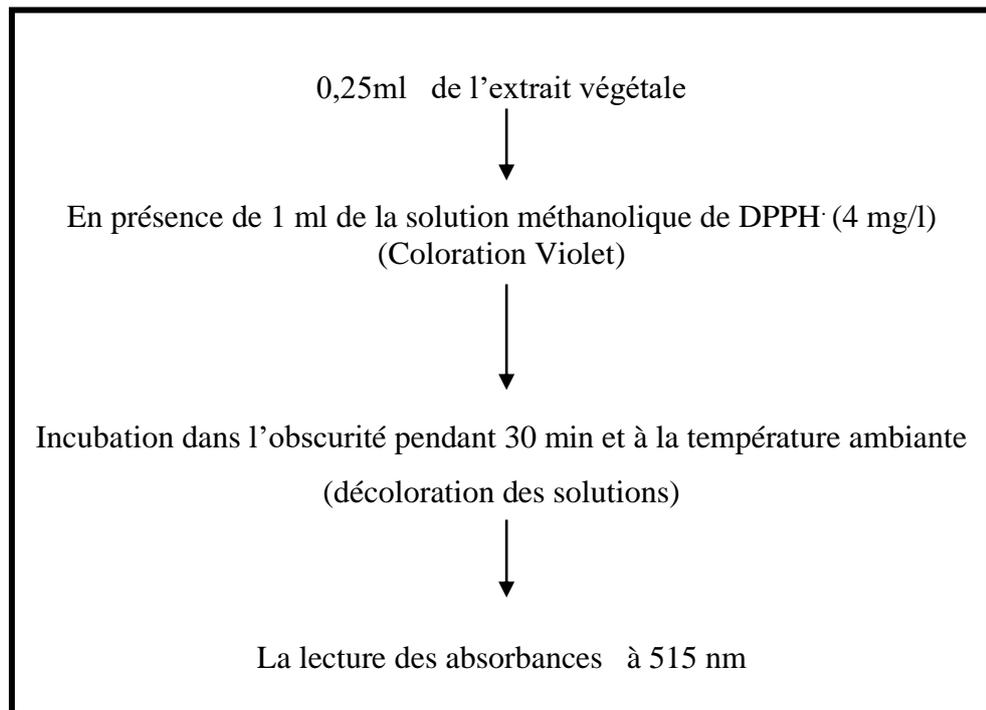
✓ Protocole

Figure II.14 : Protocole de dosage anti-radicalaire in vitro par le test au DPPH

➤ En ce qui concerne le contrôle négatif, une solution méthanolique de DPPH, et le méthanol comme blanc.

L'activité anti radicalaire en utilisant la méthode DPPH est exprimée selon la relation suivante :

$$\text{Activité anti antioxydante : (\%)} = [(A_e - A_T) / A_e] \times 100$$

A_e: Absorbance du contrôle négative DPPH Seul

A_T: Absorbance de l'extrait en présence du radical DPPH

L'efficacité antioxydante des extraits végétaux étudiés a été comparée avec un antioxydant puissant, à savoir la vitamine C (le contrôle positif).

✓ Le test avec l'acide ascorbique (Le contrôle positif)

L'évaluation de l'efficacité antioxydante des extraits aqueux des parties aériennes du coquelicot rouge a été réalisée en comparaison avec un antioxydant réputé puissant, la vitamine C (acide ascorbique)

✓ Protocole d'analyse

Une série de solutions de concentrations différentes de chaque extrait aqueux de feuilles jeunes et matures et de l'acide ascorbique, (0,05, 0,1, 0,15, 0,175 et 0,2g/l) ont été préparées en présence du radical DPPH. Avec le protocole décrit dans la **figure II.14**

✓ Expression de résultats

L'exploitation de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique tracée dans les mêmes conditions d'analyse que les extraits végétaux a permis l'évaluation de l'efficacité antioxydante de ses dernières et aussi la détermination de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀).

✓ L'activité antiradicalaire (AAR)

L'activité anti radicalaire (**AAR**) est considérée comme étant l'inverse de la valeur de IC₅₀ trouvée.

$$\text{AAR} = 1/\text{IC}_{50}$$

AAR : Activité anti radicalaire

IC₅₀ : La quantité de substance d'antioxydant nécessaire pour réduire 50%

✓ Calcul des IC₅₀

L'IC₅₀ représente la quantité de substance d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la quantité de DPPH. Initialement présente. Elle est exprimée en µg/ml d'extrait végétal.

L'IC₅₀ (%) est obtenue par l'équation de la droite moyenne du pourcentage de DPPH résiduel en fonction de la concentration en antioxydant. La plus forte activité anti radicalaire correspond à la fraction qui possède l'IC₅₀ la plus faible. (**Carmen et al., 2017**).

$$\text{IC}_{50} (\%) = 50/a$$

a : représente la pente de la régression linéaire.

II.5.2 Activité antibactérienne des extraits végétaux de l'*Hdera helix*

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la concentration la plus basse rapportée pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 48 heures d'incubation (Wan et al., 1998 ; Canillac et Mourey., 2001).

Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les triterpenoïdes (Rojas et al., 1992)

✓ Souches bactériennes :

Les souches bactériennes *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ont été choisies pour leurs pathogénicité et leurs implication fréquente dans de grave infections

✓ Protocole du test antibactérien

Le protocole du test antibactérien est réalisé suivant des étapes décrites sur la **figure II.12**

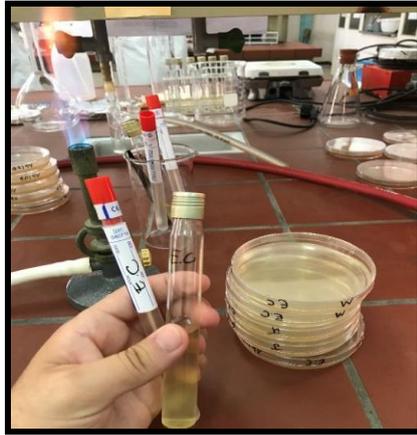
- Le milieu de culture utilisé dans ses tests est la Gélose Mueller Hinton, coulé dans des boites de pétri où on a ensemencé sur la surface entière la suspension bactérienne et à trois reprises en tournant la boite à environ 60° après chaque application pour avoir une distribution égale de l'inoculum.
- Des disques stériles de papier Wattman N° 3 ont été imbibés délicatement avec les extraits végétaux (20 µl) repris au préalable avec le Diméthyle sulfoxyde (DMSO) (97mg/ml) et déposés sur la surface de la gélose, les boites sont ensuite incubées pendant 24 h à 37 °C.
- L'activité antibactérienne a été déterminée ensuite en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques avec une règle.



Etape 1



Etape 2



Etape 3



Etape 4



Etape 5

Figure II.15 : Protocole du test antibactérien

II.6 Préparation d'un sirop a base de feuilles mature d'*Hedera helix*

Pour les nombreux effets thérapeutiques d'*hedera helix*, un sirop a base des extraits des feuilles matures de ce dernier a été confectionné comme antioxydant et antibactérien.

✓ Protocole

- Porter à ébullition 80ml d'eau.
- Incorporer hors du feu la matière végétale (8g) et laisser infuser sous couvert pendant 20 min.
- Après filtration, peser l'extrait.
- Rajouter un poids en sucre égale au poids de l'extrait (1:1).

- Remettre le mélange sur le feu jusqu'à la première ébullition et laisser frémir pendant 5 min.
- Verser le contenu dans des bouteilles stérilisées.

Chapitre III :

Résultats et discussion

III.1 Rendement de l'extraction

III.1.1 Extraction par décoction dans l'eau

Les rendements des trois extractions successives des feuilles jeunes et matures de *Hedera helix* sont représentés sur la figure III.1.

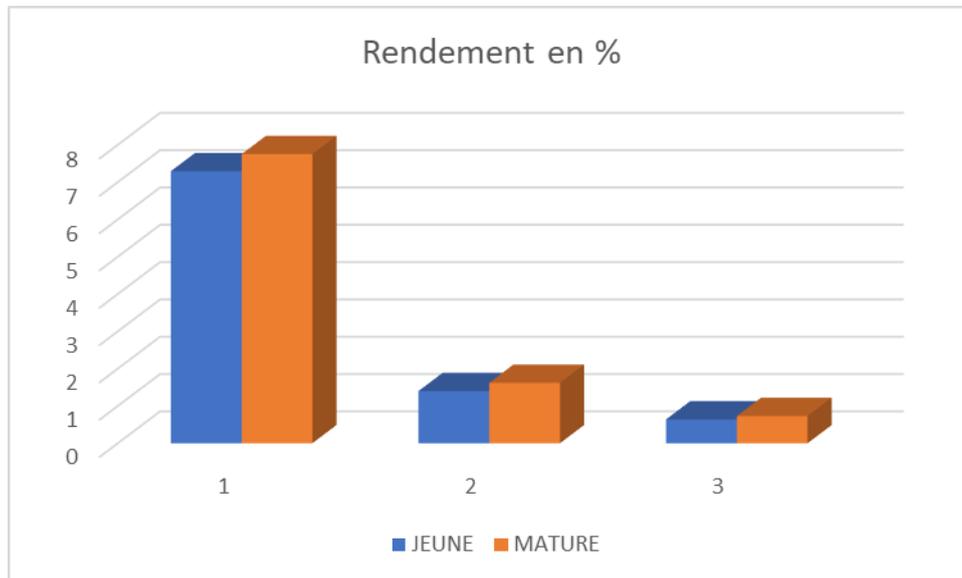


Figure III.1 : Les rendements d'extraction des feuilles jeunes et matures de *Hedera helix*

Le diagramme, de la **figure III.1** montre clairement que la première extraction présente le meilleur rendement avec 7.293% pour les feuilles jeunes et 7.750% pour les feuilles. Ce taux diminue considérablement avec la succession des extractions. Le meilleur rendement est attribué aux feuilles matures pour chaque extraction. Le résultat de notre étude est en accord avec les travaux de (**Oscar et al., 2012**) sur *Lippia organoides* où les feuilles plus matures présentaient des rendements d'extraction plus important que les jeunes feuilles.

III.1.2 Extraction par macération dans des solvants organiques à polarité différentes

Les rendements des trois extractions successives des feuilles jeunes et matures de *Hedera helix* dans les différents solvants organiques sont représentés sur la **figure III.2**

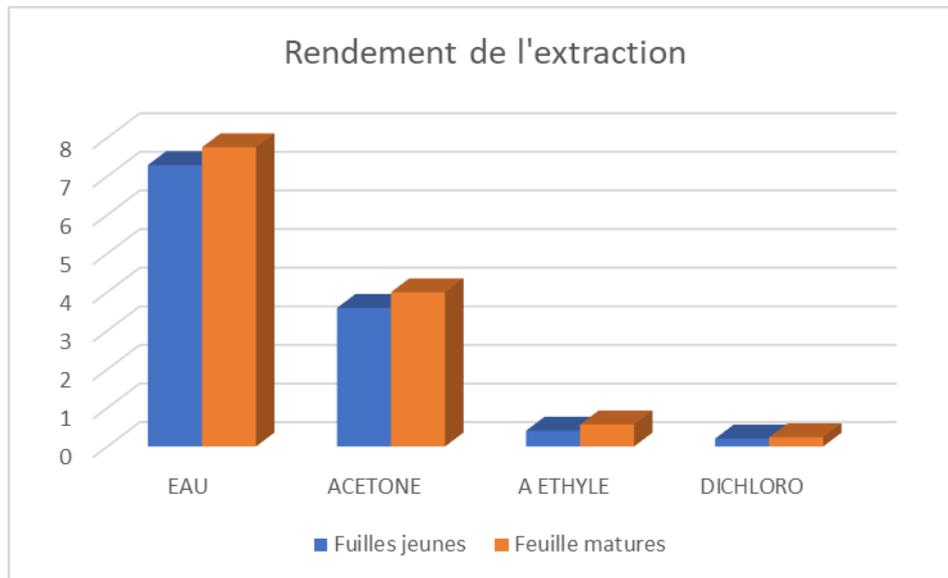


Figure III.2 : Les rendements d'extraction des feuilles jeunes et matures de *Hedera helix*

Il a été constaté d'après les résultats obtenus que les feuilles matures donnent toujours le meilleur rendement par rapport aux jeunes feuilles et pour les différents solvants. Ce dernier évolue dans cet ordre : eau (7.750% pour les feuilles mature/ 7.293% pour les feuilles jeunes) > acétone (7.750% pour les feuilles mature/ 3.99% pour les feuilles jeunes) > l'acétate éthylique (0.57% pour les feuilles matures, / 0.41% pour les feuilles jeunes) > le dichlorométhane (0.24% pour les feuilles matures/ 0.205% pour les feuilles jeunes).

La différence observée peut être expliquée par la différence croissante de la polarité, des solvants utilisés, Les composés phénoliques contenus dans nos extraits sont par définition polaires, ils seront donc plus susceptibles de se dissoudre dans les solvants les plus polaire.

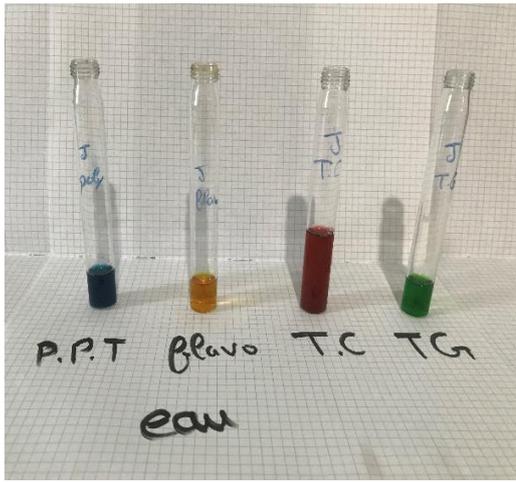
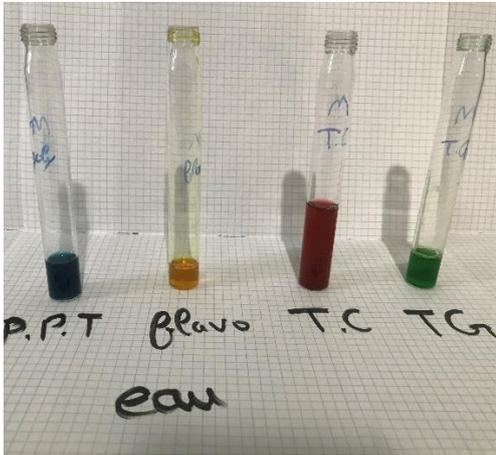
Le même résultat a été observé par **(Boumerfeg et al., 2012)** dans l'extraction des composés phénoliques de la plante *Polium Teucrium*.

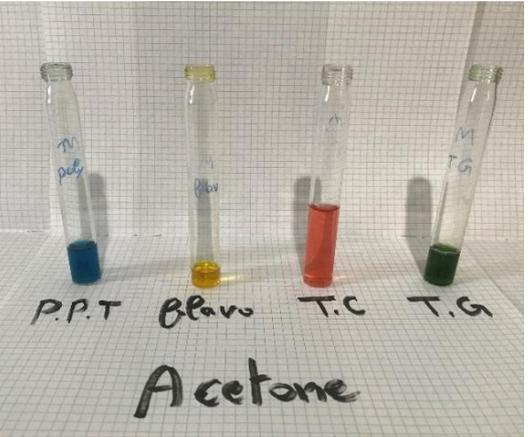
III.2 Résultats de l'identification qualitative et quantitative

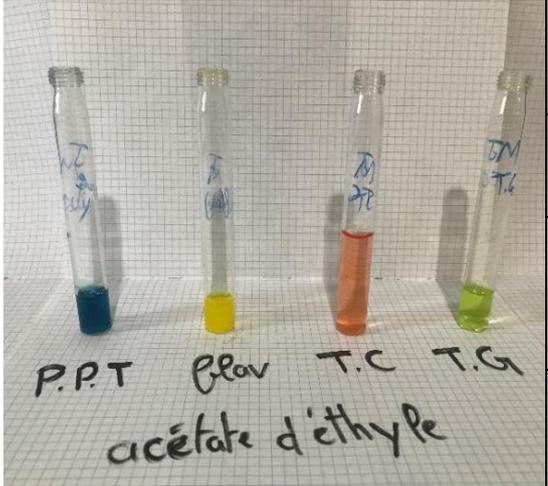
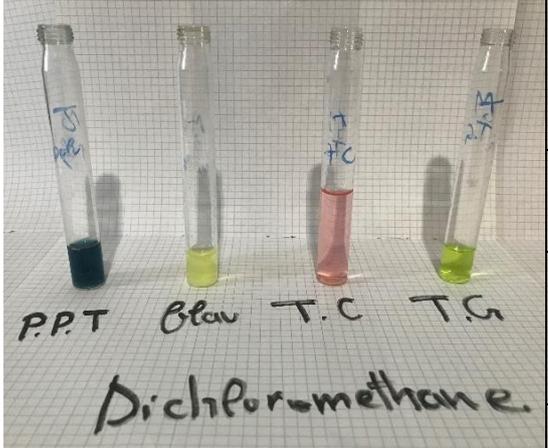
III.2.1. Tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques des différents métabolites secondaires extraits des feuilles jeunes et matures de *Hedera helix* par décoction et macération et avec les différents solvants ont été résumés dans le **tableau III .1**.

Tableau III.1 : résultat des tests phytochimique

Solvant	Age de la feuille	Aperçu	Test	Résultat
Eau	Jeunes		Polyphenols totaux : reactif Folin-Ciocalteu	Positif
			Flavonoides : AlCl ₃	Positif
			Tannins condensés : Vanilline	Positif
			Tannins galliques : FeCl ₃	Positif
	Matures		polyphenols totaux	Positif
			Flavonoides : AlCl ₃	Positif
			Tannins condensés : Vanilline	Positif
			Tannins galliques : FeCl ₃	Positif

	Jeunes		Polyphenols totaux : reactif Folin-Ciocalteu	Positif
			flavonoides	Positif
Acétone	Matures		Polyphenols totaux : reactif Folin-Ciocalteu	Positif
			Flavonoides : $AlCl_3$	Positif
Acétate d'éthyle	Jeunes		Tannins condensés : Vanilline	Positif
			Tannins galique	Positif
			Polyphenols totaux : reactif Folin-Ciocalteu	Positif
			Flavonoides : $AlCl_3$	Positif
			Tannins condensés : Vanilline	Positif
			Tannins galiques : $FeCl_3$	Positif

	Matures		Polyphenols totaux : reactif Folin-Ciocalteu	Positif
			Flavonoides : $AlCl_3$	Positif
			Tannins condensés : Vanilline	Positif
			Tannins galliques : $FeCl_3$	Positif
Dichlorométhane	Jeunes		Polyphenols totaux : reactif Folin-Ciocalteu	Positif
			Flavonoides : $AlCl_3$	Positif
			Tannins condensés : Vanilline	Positif
			Tannins galliques : $FeCl_3$	Positif
	Matures		Polyphenols totaux : reactif Folin-Ciocalteu	Positif
			Flavonoides : $AlCl_3$	Positif
			Tannins condensés : Vanilline	Positif
			Tannins galliques : $FeCl_3$	Positif

La réponse positive des tests photochimiques dans les extraits de *Hedera helix* avec des réactifs spécifiques à chaque type de métabolite à confirmer la présence de métabolites secondaires importants de par leurs activités thérapeutiques tel que les polyphénols, les flavonoïdes, ainsi que les tannins (condensés et galliques). Leur concentration varie avec la nature du solvant ainsi que la méthode d'extraction. Il a été clairement remarqué que l'eau suivi par l'acétone sont des solvants polaires efficace pour l'extraction d'une large gamme de métabolites secondaire. (grauso et al., 2009). Par contre l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane restent des solvants potentiels pour l'extraction de certains métabolites mais moins efficace que l'eau et l'acétone. Les tests négatifs des anthocyanes confirment l'absence de ses métabolites dans les extraits de *Hedera helix*.

✓ Test des saponines

Le test de la détection des saponines dans les extraits végétaux a été confirmé par la présence d'une mousse persistante. L'ensembles des résultats obtenus sont représentés dans le **tableau III.2**.

Tableau III.2 : hauteur de la mousse selon le tube

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hauteur de la mousse en (cm)	0	0.8	1.8	2.6	3.5	3.7	4	4.1	4.4	4.6

Conformément aux résultats du tableau III.7 il a été constaté que la hauteur de la mousse est supérieure à 1cm à partir du 3 éme tube, ce qui correspond à un $Im > 500$, ce qui nous permet d'affirmer que le lierre grimpant est riche en saponosides. (Karumi et al., 2004)

III.2.2 Chromatographie sur couche mince (C.C.M)

Pour une caractérisation partielle des différents extraits du lierre grimpant, une chromatographie sur couches minces (CCM) a été réalisée avec le système solvant : méthanol/l acétate d'éthyle / d'eau désilée : (35ml /10ml /5ml) permettant d'avoir une bonne séparation et une visibilité acceptable des spots à deux différentes longueurs d'ondes à 254 nm et 365 nm L'ensembles des résultats de l'analyse C.C.M sont représentés dans le **Tableau III.3**

Tableau III.3 : Résultats de l'analyse CCM à 365nm des extraits végétaux du lierre grim pant

Spots	Rf	Observation
1	0.212	Fluorescence rouge
2	0.658	Fluorescence orange
3	0.764	Fluorescence orange
4	0.847	Fluorescence bleu
5	0.871	Tache de couleur marron
6	0.924	Fluorescence bleu

L'analyse par chromatographie sur couche mince (C.C.M) est une méthode de séparation et de caractérisation qui permet l'identification partielle des principales familles de métabolites secondaires à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, et les tannins qui fluoresce respectivement dans le domaine de l'ultraviolet en bleu, orange, et rouge (**Grauso L et al., 2019**).

Et en effet le tableau montre plusieurs spots ce qui confirme l'existence de plusieurs composés phénoliques dans l'extrait de *Hedera helix*, à savoir : des polyphénols avec un Rf 0.924 et 0.847 qui fluorescent bleu sous lampe UV, Les flavonoïdes avec un Rf 0.658 et 0.764 qui donne une fluorescence orange sous UV, mais aussi des tannins qui a cause de leurs grand poids moléculaire migrent lentement sur la plaque et apparaissent avec Rf 0.212 donnant une fluorescence rouge à 365nm. (**Shawky et al., 2019**).

III.2.3 Chromatographie sur colonne de silice

Une autre manière d'évaluation qualitative est la chromatographie sur colonne, l'éluant utiliser est le même que celui pour la CCM, le volume de l'éluant emportant chaque constituant de l'extrait végétal aussi appelé fraction est récupéré et analysée par Uv-Vis, les spectres Uv-Vis des fractions récupérées figurent dans l'**Annexe**.

✓ L'identification spectral Uv-Vis de la première fraction sortie de la colonne **Figure 5 Annexe** montre deux bandes d'absorbances à 258 et 375 nm, qui peuvent correspondre à des polyphénols (**Catauro et al., 2015**).

- ✓ Concernant la fraction 2, **Figure 6 Annexe** deux bandes d'absorbances à 210nm et 283 nm, qui peuvent correspondre à des flavonoïdes (*Kafley et al., 2006*).
- ✓ Le spectre Uv-Vis de la fraction 4, **Figure 7 Annexe** indique la présence de deux bandes d'absorbances à 211nm et 328 nm, qui peuvent correspondre à des tannins (*Medina et al., 2017*).

III.2.4. Chromatographie liquide à haute performance HPLC

L'ensemble des analyses ont été réalisés sur un appareil HPLC (UltiMate 3000), sur une colonne C18, la phase mobile ; un mélange de solvants (35ml /10ml /5ml), la longueur d'onde 290nm avec un temps de d'analyse de 40min, les chromatogrammes correspondent aux extraits des feuilles jeunes et matures de *Hedera helix* sont représentés respectivement sur la **Figures 8** et **Figure7 Annexe**.

Il a été constaté que l'allure des chromatogrammes relatifs aux deux extraits (feuilles jeunes et matures) est identique, un pic intense a été constaté avec $R_t = 1.775\text{min}$ dans les deux extraits avec une intensité supérieure dans le cas des feuilles matures, ce dernier peut correspondre aux flavonoïdes spécifiquement la quercitrine qui a un ($R_t = 1.8\text{min}$) (*Plantarum et al., 2012*), le pique avec ($R_t = 2.05\text{min}$) peut s'agir des tannins en particulier la catéchine avec ($R_t = 2.1\text{min}$), (*Souad et al., 2014*).

III.3 Dosage des composés phénoliques

III.3.1 Dosage des polyphénols

Une des caractéristiques des polyphénols, qu'ils partagent généralement avec l'ensemble des métabolites secondaires, est de montrer une répartition très inégale chez les différentes espèces végétales et, pour une même espèce, selon la variété et le stade d'évolution physiologique (*Macheix et al., 2005*). La présentation de la quantité des polyphénols totaux extraits des feuilles jeunes et matures de lierre grimpant avec les deux méthodes d'extractions et les différents solvants est représentée sur la **Figure III.3**

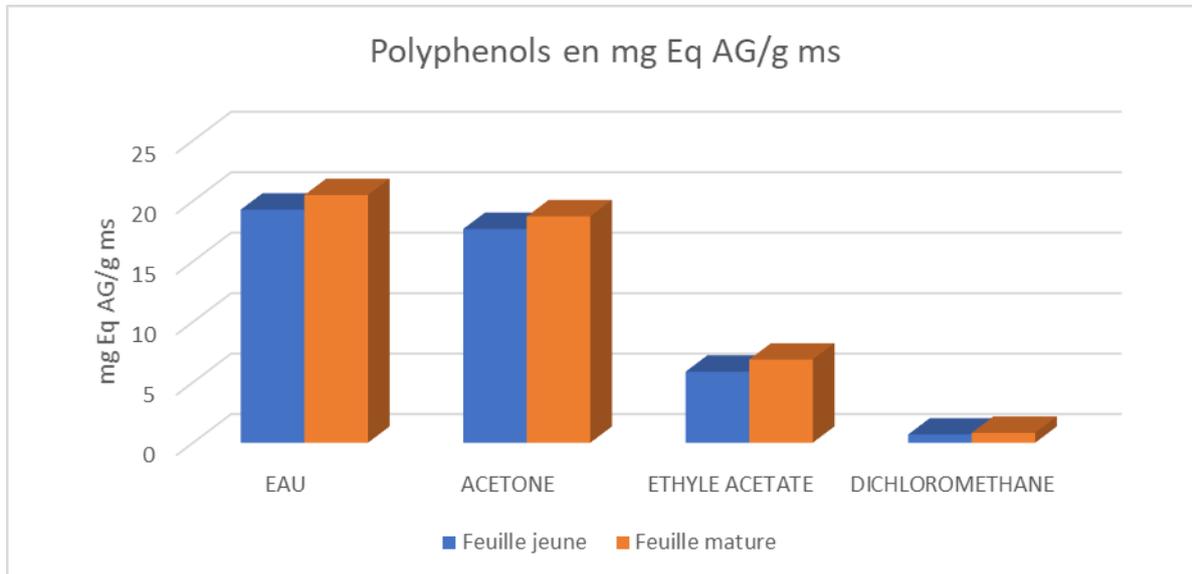


Figure III.3 : teneur en polyphénols totaux extraits des feuilles jeunes et mures de lierre grim pant

Il a été remarqué que les feuilles mures présentent une teneur en polyphénols importante en comparaison avec les feuilles jeunes. Cette supériorité varie avec le solvant d'extraction, l'extrait présentant la plus grande teneur en polyphénols est l'eau avec 19.28 (mg Eq AG/g ms) pour les feuilles jeunes et 20.48 (mg Eq AG/g ms) pour les feuilles mures. L'extrait avec l'acétone ; 17.68 (mg Eq AG/g ms) pour les feuilles jeunes et 18.72 (mg Eq AG/g ms) pour les feuilles mures. L'extrait avec acétate d'éthyle présente un taux de polyphénols de 5.88 (mg Eq AG/g ms) pour les feuilles jeunes et 6.88 (mg Eq AG/g ms) pour les feuilles mures, le solvant qui donne le taux le plus bas est le dichlorométhane.), les résultats de notre extraction sont en accord avec les travaux (**Ivan Bezruk et al., 2020**) avec une légère différence dans le taux des polyphénols qui peut être et justifiée par la période de récolte et les conditions météorologique.

III.3.2 Dosage des flavonoïdes

Les résultats du dosage des flavonoïdes des extraits végétaux **Figure III.4** montrent clairement que les feuilles mures présentent une teneur plus importante en flavonoïdes par rapport aux jeunes feuilles, et cette différence a été constatée avec tous les solvants d'extraction, l'extrait aqueux présente le taux le plus intéressant (7.2 (mg Eq Q/g ms) pour les feuilles jeunes / 8.64 (mg Eq Q/g ms) pour les feuilles mures), suivi par l'acétone (7.04 (mg Eq Q/g ms) pour les feuilles jeunes/ 8.16 (mg Eq Q/g ms) pour les feuilles mures),

l'extrait avec l'acétate d'éthyle présente un taux moins intéressant. Le solvant qui donne le taux le plus bas est le dichlorométhane (0.42 (mg Eq Q/g ms) pour les feuilles jeunes / 0.5 mg Eq Q/g ms pour les feuilles matures).

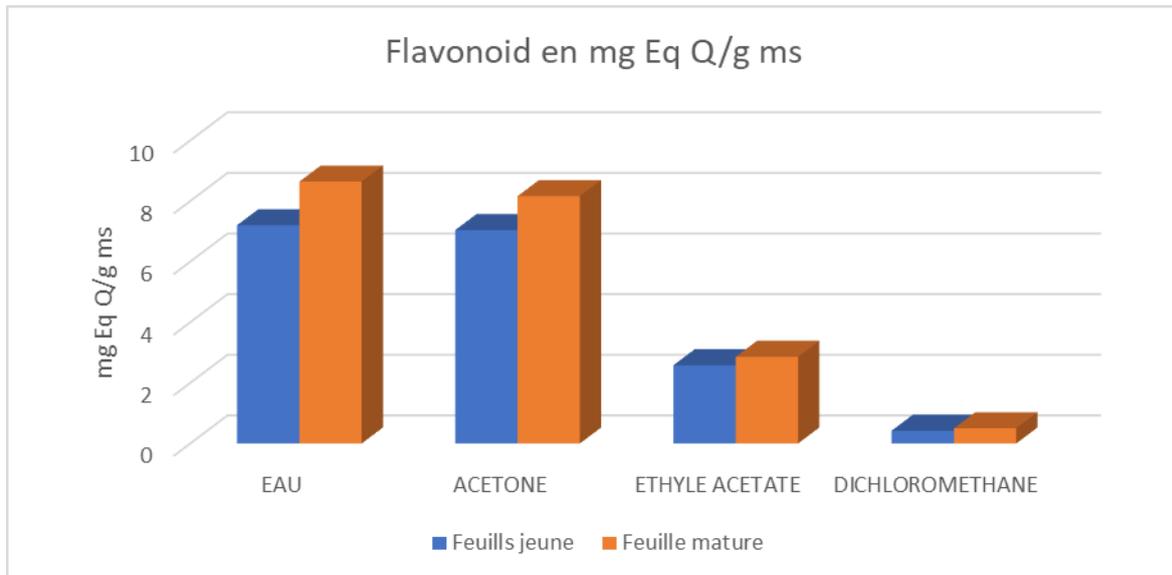


Figure III.4 : Les teneurs en flavonoïdes des extraits végétaux du lierre grimpant dans les différents solvants

III.3.3 Dosage des Tannins

Concernant le dosage des tannins dans les extraits du lierre grimpant il a été constaté que les feuilles matures présentent une teneur plus importante en tannins que les feuilles jeunes **Figure III.5**, et cette différence comme dans le cas des flavonoïdes dépend de la nature du solvant d'extraction et varie de la même manière. Le solvant présentant la plus grande teneur en tannins est l'eau (1.598 (mg Eq C/g ms) pour les feuilles jeunes / 1.753 (mg Eq C/g ms) pour les feuilles matures), suivi par l'acétone, l'extrait de l'acétate d'éthyle (0.487 (mg Eq C/g ms) pour les feuilles jeunes / 0.588 (mg Eq C/g ms) pour les feuilles matures), le solvant qui donne le taux le plus bas est toujours le dichlorométhane (0.056 (mg Eq C/g ms) pour les feuilles jeunes / 0.07 (mg Eq C/g ms) pour les feuilles matures). Les résultats de notre étude correspondent aux résultats obtenus par (Ali Zaiter et al., 2017).

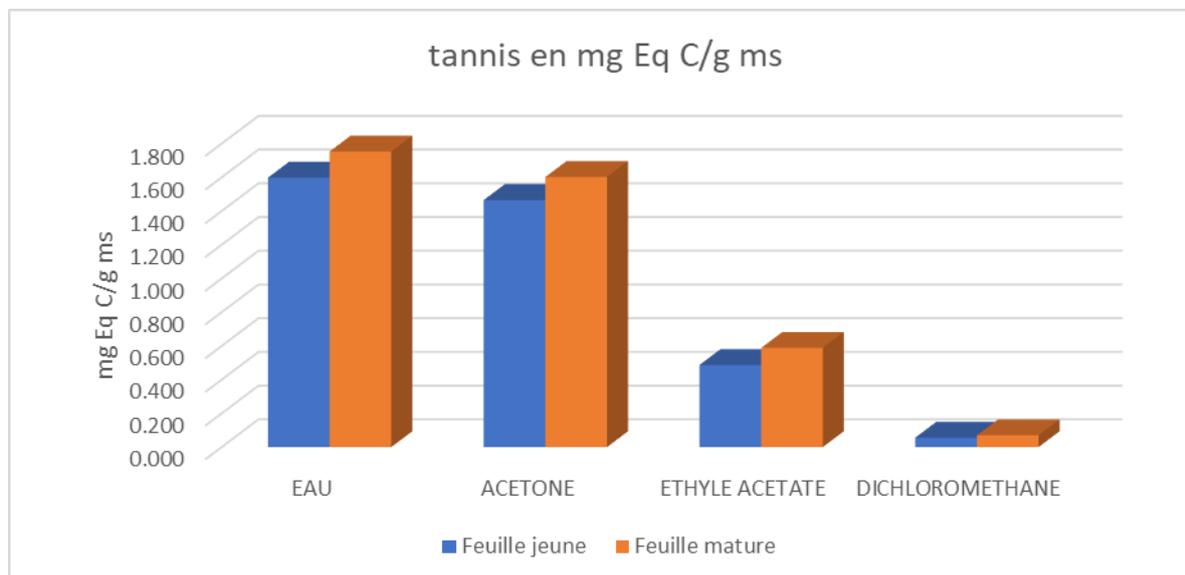


Figure III.5 : Les teneurs en tannins dans les extraits végétaux de lierre grim pant avec les différents solvants

III.4 Résultats des tests de l'activité biologique des extraits végétaux de *Hedera helix*

III.4.1 Résultats des tests de l'activité antiradicalaires in vitro des extraits des feuilles jeunes et matures de *Hedera helix*

L'activité anti radicalaire des extraits végétaux *Hedera helix*, dans les différents solvants est représentée respectivement sur la **Figure III.7**. Il a été clairement constaté que les extraits aqueux et organiques des pétales et des feuilles présentent une activité anti radicalaire importante, (disparition de la couleur bleue du radicale DPPH), et cette efficacité évolue dans ordre suivant : eau > acétone > acétate d'éthyle > dichlorométhane **figure III.7**. Le meilleur taux d'inhibition est alloué aux extraits aqueux ; 78.32% pour les feuilles matures et 76.72 % pour les feuilles jeunes, les extraits dans le dichlorométhane ont eux aussi présentés un taux d'inhibition intéressant 54.24% pour les feuilles matures et 51.34% pour les feuilles jeunes **Tableau III.4**. L'efficacité anti radicalaire du lierre grim pant a aussi été constatée dans les travaux de (Nowak et al., 2007), et cette efficacité prononcée dans les feuilles matures peut être expliquée par leurs richesses en composés phénoliques par apport aux jeunes feuilles.

Le Pouvoir anti radicalaire des extraits végétaux du lierre a été mis en avant par comparaison avec un antioxydant puissant à savoir l'acide ascorbique **Tableau III.5**. Les

extraits aqueux des feuilles matures et jeunes du lierre grimpant présentent une efficacité anti radicalaire proche des 60% même des faibles concentrations (0.05mg/ml), une efficacité qui reste assez proche de celle de l'acide ascorbique (75%). Cette efficacité est relative à la concentration des extraits pour 0.2 mg/ml (80% pour les feuilles matures et 75% pour les feuilles jeunes, 90% pour l'acide ascorbique) **Figure III.8.**



Figure III.6 : résultats des tests antioxydant avec le radical DPPH

Tableau III.4 : Indice d'inhibition du radical DPPH dans les extraits végétaux de *Hedera hélix* dans les différents solvants

	Indice d'inhibition %	
	Feuilles jeunes	Feuilles matures
Eau	76.72	78.32
Acétone	71.76	73.49
L'acétate d'éthyle	53.89	55.68
Dichlorométhane	51.34	54.24

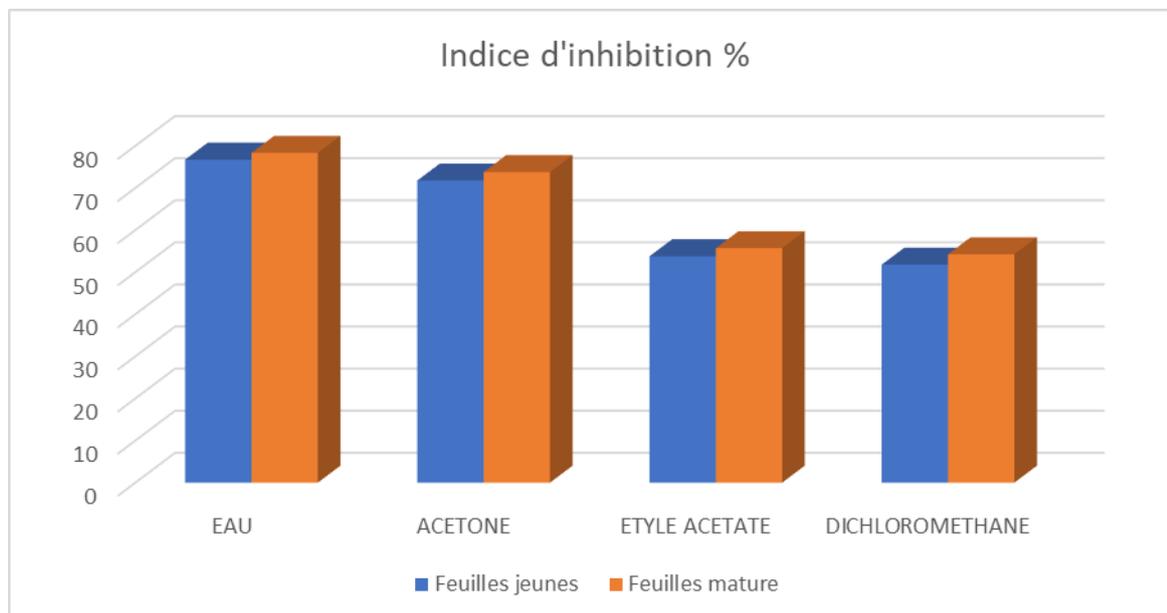


Figure III.7 : Indices d'inhibition du radical DPPH des extraits végétaux de *Hedera helix* dans les différents solvants

Tableau III.5 : Indices d'inhibition des extraits aqueux des feuilles du lierre grimpant et l'acide ascorbique (test positif) à différentes concentrations

Concentration mg/ml	Indice de Feuilles jeunes	Indice de feuilles mature	Indice acide ascorbique
0	0	0	0
0.05	56.82	57.88	73.84
0.1	67.34	69.07	82.63
0.15	72.28	75.32	85.36
0.175	74.93	76.93	87.344
0.2	76.72	79.32	90.088

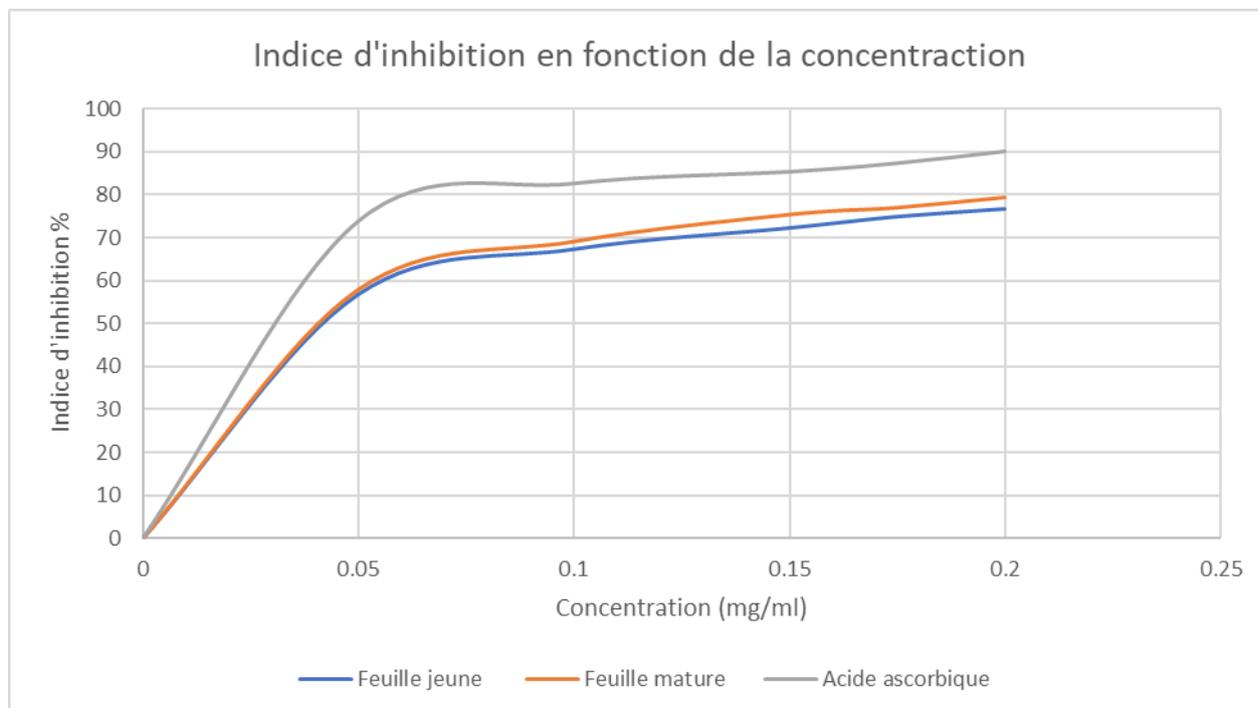


Figure III.8 : courbe de l'indice d'inhibition en fonction de la concentration

En effet les feuilles du lierre grimpant sont riches en composés doués d'activité antioxydante tels que : les flavonoïdes, les polyphénols et les tannins, ces différents constituants exercent leurs actions antioxydantes en inhibant la production de l'anion superoxyde, l'hydroxyle, comme ils inhibent la peroxydation lipidique au niveau des microsomes (**Bruneton, 1999**). Concernant le IC_{50} (la quantité de substance d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la quantité de DPPH· Initialement présente), il a été remarqué que l'extrait aqueux des feuilles matures et jeunes présente un IC_{50} pour une concentration similaire qui se rapproche de (0,037mg/ml), elle est légèrement inférieure dans le cas de l'acide ascorbique (0,025mg/ml), sachant qu'une valeur IC_{50} inférieure reflète une meilleure action protectrice, l'activité antiradicalaire (AAR) confirme les résultats de l'activité antioxydante des extraits végétaux du lierre grimpant.

III.4.2 Résultats des tests de l'activité antibactérienne

L'ensemble des résultats du test de sensibilité microbienne pour les deux types de bactéries (*Staphylococcus aureus* (gram+) et *Escherichia coli* (gram-)) aux extraits aqueux des feuilles jeunes et matures du lierre grimpant sont regroupés dans le **Tableau III.6**. Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois mesures. L'action bactériostatique se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait étudié (feuilles jeunes et matures de *l'hedera helix*) **Figure 11 Annexe**. Le diamètre de la zone d'inhibition est relatif à la sensibilité de la bactérie à l'extrait testé et elle diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre.

Tableau III.6 : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits des feuilles de *l'hedera helix*

Souches bactériennes	Feuilles jeunes	Feuilles matures
Staphylococcus Aureus	6.91±0.08mm	7.040±0.06mm
Escherichia Coli	/	/

Les tests antibactériens **Tableau III.6** confirment l'efficacité des extraits des feuilles jeunes et matures du lierre grimpant contre *le Staphylococcus aureus*(gram+) avec une zone D'inhibition (7.040±0.06mm) pour les feuilles matures et une efficacité légèrement inférieure pour l'extrait des feuilles jeunes (6.91±0.08mm). Par contre les extraits présentent une inefficacité très remarquable contre *Escherichia coli*(gram-) **Figure 10 Annexe** . Ces résultats soutiennent celle trouvés par (Zazharskyi et al., 2020) où l'extrait de *l'hedera helix* a présenté un effet antibactérien contre *Staphylococcus aureus* mais aucun effet sur *Escherichia coli*. L'effet antibactérien de l'extrait de *l'hedera helix* est attribué aux composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et tannins) présent dans l'extrait notamment la quercétine et la rutine par (Parvu et al., 2015).

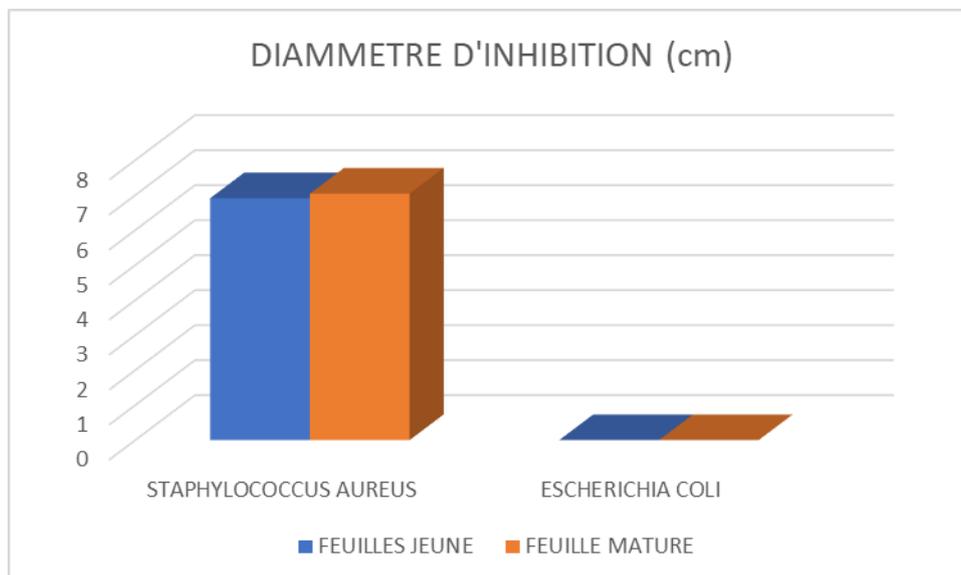


Figure III.9 : Efficacité anti bactériennes des extraits aqueux des feuilles matures et jeunes de l' *hedera helix* (lierre grim pant)

III.5 La préparation d'un sirop antitussif

Un sirop à effet antitussif a été préparé à partir des extraits aqueux des feuilles matures de de l'*hedera helix* (lierre grim pant) " **hederasif** " **Figure III.10**

✓ **Posologie**

Adulte : 6 à 8 cuillères à soupe par jour à renouveler si besoin après un délai de 4heures minimum.

Enfant de 8 à 12 : 2 à 3 cuillères à soupe par jour à renouveler si besoin après un délai de 4 heures au minimum.

Sujets âgés, en cas d'insuffisance hépatique : la posologie initiale sera diminuée de moitié et pourra éventuellement être augmentée en fonction de la tolérance et du besoin. (**Terrai et al., 2014**).

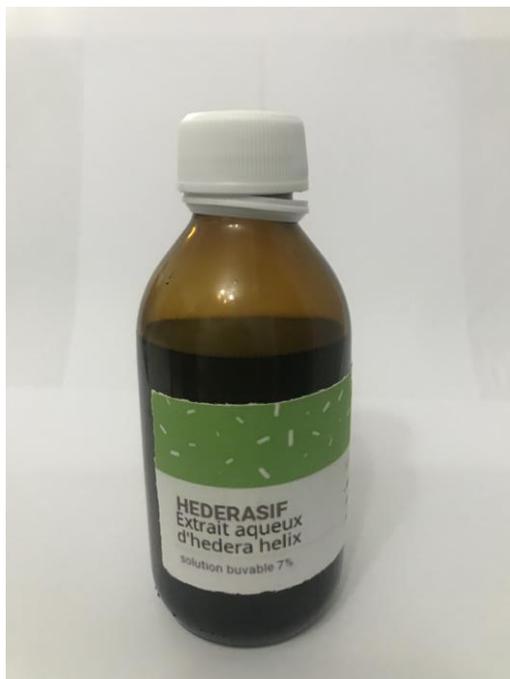


Figure III.10 : Sirop préparé au laboratoire

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Hedera helix est une plante connue depuis l'antiquité pour ces différents effets thérapeutiques, qui sont due aux différents composés phénoliques que contient cette plante étude menée sur cette plante a montré que :

- ✓ L'âge de la plante et le solvant d'extraction influent de manière significative sur le rendement de l'extraction.
- ✓ Les tests phytochimiques affirment que les feuilles matures de *l'hedera helix* contrairement aux jeunes feuilles sont plus riches en métabolites secondaires à savoir polyphénols, flavonoïdes, et tannins.
- ✓ L'étude antiradicalaire (test radical DPPH) met en avant l'efficacité antiradicalaire des extraits végétaux de *l'Hedera helix*.
- ✓ Les extraits aqueux des feuilles jeunes et matures de *l'Hedera helix* présentent un effet antibactérien contre le *Staphylococcus aureus* (gram+) et aucune efficacité contre la *Escherichia coli* (gram-).
- ✓ Les feuilles matures présentent un rendement, une teneur en métabolites secondaires, un effet antiradicalaire et bactérien légèrement supérieur aux jeunes feuilles *l'Hedera helix*.
- ✓ L'efficacité antioxydante et antibactériennes des feuilles de *l'Hedera helix* nous ont inspiré à confectionner un sirop à effet antioxydant et anti bactérien.
- ✓ Comme perspectives serait d'élargir l'étude antibactérienne pour d'autres bactéries de gram + et voir l'efficacité des extraits aqueux du lierre sur des bactéries de gram (-) autres que la *Escherichia coli*.
- ✓ Etude de l'effet antiviral des extraits de *l'hedera helix* entre autres sur la covid 19 .

Références

A

Aaref. M & HADED. M. Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (région d'Oued Souf). Mémoire du Master. Université El Chahid Hamma Lakhder. Oued Souf. Algérie. 2015. a : 3-19. Algérie. 2016. h : 14

Ali Zaiter. Étude de la phytochimie de 12 plantes de la région Lorraine en fonction de la granulométrie de poudres super fines. Agronomie. Université de Lorraine, 2017. Français. ffNNT : 2017LORR0012ff. fftel-01935491

Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., 2008. Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 - 274.

AL-SNAFI, Ali Esmail. Pharmacological and therapeutic activities of *Hedera helix*-A review. *IOSR J. Pharm*, 2018, vol. 8, p. 41-53.

Ameenoh Gurib-Fakin Toutes plantes qui soignent, description, utilisation, action, thérapeutique. antibacterienne. Mémoire de Master. Université mentouri 1. Constantine.

*Anwar, Khoerul & Rahmanto, Beny & Triyasmono, Liling & Rizki, Muhammad & Halwany, Wawan & Lestari, Fajar. (2017). The Influence of Leaf Age on Total Phenolic, Flavonoids, and Free Radical Scavenging Capacity of *Aquilaria beccariana*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 18. 129-133.*

Avilov, S.A., Kalinovsky, A.I., Stonik, V.A., Riguera, R., Jiménez, C. Koreaside A, a new nonholostane triterpene glycoside from the sea cucumber *cucumariakoraiensis*. *J.Nat.Prod* p 60, m 808–810, 1997.

B

Bahorun T, Gressier B, et al Oxygen Species Scavenging Activity Of Phenolic Extracts From Hawthorn Fresh Plant Organs And Pharmaceutical Preparations *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 1996 vol 46 n 11 L 1086-1089

BARTLETT, Grant R. Phosphorus assay in column chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 1959, vol. 234, no 3, p. 466-468.

Bedry.R et Jouglard.J.”Hedera helixL”.IPCSINCHEM.France.1997.<http://www.inchem.org/documents/pims/plant/pim258fr.htm#SubSectionTitle:3.1.1Caractéristiques essentielles permettant l'identification>

Ben Moussa MT : Cour de la phytothérapie ; Département de pharmacie Batna Laboratoire de pharmacognosie (3ème année)

Boumerfeg S, Baghiani A, Djarmouni M, Ameni D, Adjadj M, Belkhiri F, Charef N, Khennouf S, Arrar L. (2012) Inhibitory Activity on Xanthine Oxidase and Antioxidant Properties of Teucrium polium L. Extracts. Chinese Medicine. 3: 30-41.

Bramki. I et NEKIA. A. Recherche des métabolites secondaires du *Catauro, Michelina & Papale, Ferdinando & Bollino, Flavia & Piccolella, Simona & Marciano, Sabina & Nocera, Paola & Pacifico, Severina. (2015). Silica/quercetin sol-gel hybrids as antioxidant dental implant materials. Science and Technology of Advanced Materials. 16. 10.1088/1468-6996/16/3/035001.*

C

Carmen Elena, POP, PARVU, Marcel, ARSENE, ANDREEA LETIȚIA, *et al.* Investigation of antioxidant and antimicrobial potential of some extracts from *Hedera helix* L. *gut*, 2017, vol. 4, no 6, p. 11.

D

Dehshahri, Shadab & Wink, Michael & Afsharypuor, S & Asghari, Gholamreza & Mohagheghzadeh, Abdolali. (2012). Antioxidant activity of methanolic leaf extract of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. *Research in pharmaceutical sciences*. 7. 111-8.

David. V, Valerie. A, Stephanie, C. Cheze, J. Vercauteren; Thèse de doctorat. Université Segalen Bordeaux.

Dilmi, Khouloud et MARHOUNE, Soulef. *Effet de la salinité sur la Germination et la croissance de quelques variétés de Quinoa (Chenopodium quinoa Willd) introduites et cultivées en Algérie*. 2019.

F

FACINO, Roberto Maffei, CARINI, Marina, STEFANI, Rita, *et al.* Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Archiv der Pharmazie*, 1995, vol. 328, no 10, p. 720-724.

FOSTER, Timothy J. et GEOGHEGAN, Joan A. *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology*, 2015, p. 655-674.

G

Gaussen, H., Deuroy, J.F and Ozenda P. (1982) Précis de botanique II « Les végétaux supérieurs ». Ed : Masson ; pt 215-408).

Gómez - Caravaca A. M, Gómez - Romero M, Arráez - Román D, SeguraCarretero A, Fernández-Gutiérrez A., 2006. Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis* 41: 1220 - 34.

Gozengel Jean-Marie Orechioni. Anne-Marie: Le préparateur en pharmacie 2e édition

H

HIMOUR, Sara, YAHIA, Abdlouhab, BELATTAR, Hakima, *et al.* Etude phytochimique des feuilles d'*Olea europaea* L. var Chemlel d'Algérie. *J. of Biores. Valorization*, 2016, vol. 1, no 1, p. 34-38.

I

IBRAR, Muhammad, ILAHI, IHSAN, et HUSSAIN, FARRUKH. Hypoglycemic activity of *Hedera helix* L. leaves and the possible mechanism of action. *Pakistan Journal of Botany*, 2004, vol. 35, no 5; SPI, p. 805-810.

Iserin P, Masson M., Restellini J. P, Ybert E, De Laage de Meux A, Moulard F, Zha E, De la Roque R., De la Roque O, Vican P., Deelesalle –Féat T, Biaujeaud M, Ringuet J, Bloth J. et Botrel A. (2001). *Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins*. Ed Larousse. q10-12.

Ivan Bezruk, Mindaugas Marksa, Victoriya Georgiyants, Liudas Ivanauskas, Lina Raudone, Phytogeographical profiling of ivy leaf (Hedera helix L.), Industrial Crops and Products, Volume 154, 2020, 112713, ISSN 0926-6690,

K

Kafley, Suvash & Ondrus, M. & Rohrer, Cynthia. (2007). AGFD 62-Distribution of catechins, epicatechins, and methylxanthines in green tea available in regular and decaffeinated form. ACS National Meeting Book of Abstracts. 233. 94-94.

KAPER, James B., NATARO, James P., et MOBLEY, Harry LT. Pathogenic escherichia coli. *Nature reviews microbiology*, 2004, vol. 2, no 2, p. 123-140.

Karumi. Y et al. Identification of active principles of Balsamina (Balsam

Legrand. G. Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée : approches biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat. Université de Lille 1. France. 2015. b : 35-60.

L

Long, Derek Albert. Raman spectroscopy. *New York*, 1977, vol. 1.

LORDANI, Tarcisio Vitor Augusto, DE LARA, Celia Eliane, FERREIRA, Fabiana Borges Padilha, *et al.* Therapeutic effects of medicinal plants on cutaneous wound healing in humans: a systematic review. *Mediators of inflammation*, 2018, vol. 2018.

LUTSENKO, YULIA, BYLKA, WIESŁAWA, MATLAWSKA, I., *et al.* Hedera helix as a medicinal plant. *Herba polonica*, 2010, vol. 56, no 1, p. 83-96.

M

Macheix J.J., Fleuriet A. and Jaye-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'une importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2005, 185 p.

Medina Medrano, José & Mares-Quiñones, María & Valiente, Juan & Vázquez-Sánchez, Monserrat & Alvarez-Bernal, Dioselina & Villar-Luna, Edgar. (2017). Determination and quantification of phenolic compounds in methanolic extracts of Solanum ferrugineum (Solanaceae) fruits by HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS/TOF. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 40. 900-906. 10.1080/10826076.2017.1382376.

Merguem. R. Eléments de biochimie végétal. Bahaeddine Edition. Algérie.2009. m : 93-158.
MISHRA, Krishnanand, OJHA, Himanshu, et CHAUDHURY, Nabo Kumar. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 2012, vol. 130, no 4, p. 1036-1043.

Mole, So et WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. *Oecologia*, 1987, vol. 72, no 1, a. 137-147.

MOLYNEUX, Philip, *et al.* The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 2004, vol. 26, no 2, p. 211-219.

N

Nowak R, Gawlik-Dziki U. (2007) Polyphenols of Rosa L. leaves extracts and their radical scavenging activity. Z. Naturforsch. 62: 32-38.

O

Odebode, A. C. Phenolic compounds in the kola nut (*Cola nitida* and *Cola acuminata*)(Sterculiaceae) in Africa. *Revista de Biologia Tropical*, 1996, e. 513-515.

Oscar Arango-Bedoya^{1*}, *Andrés Mauricio Hurtado-Benavides*^{1†}, and *Inés Toro-Suárez*², *Effect of origin, harvesting time and leaf age on the yield and content of thymol in essential oils from Lippia origanoides H.B.K. (2012).*

P

PARVU, Marcel, VLASE, Laurian, PARVU, Alina E., et al. Phenolic compounds and antifungal activity of Hedera helix L.(Ivy) flowers and fruits. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2015, vol. 43, no 1, p. 53-58.

PERRY, Lily M. Problems in the compilation of a native medicinal flora of southeastern Asia. *Economic Botany*, 1961, vol. 15, no 3, p. 241-244.

PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products, 2000, vol. 63, no 7, p. 1035-1042.

Plantarum, Acta & Jallali, Inès & Megdiche, Wided & Hamdi, Mohammad & Oueslati, Samia & Smaoui, Abderrazak & Abdely, Chedly & Riadh, Ksouri. (2012). Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte Crithmum maritimum L. with physiological stage and extraction method. Acta Physiologiae Plantarum. 34. 1451-1459. 10.1007/s11738-012-0943-9.

R

Rostenberg, Adolph. An anecdotal biographical history of poison ivy. *AMA archives of dermatology*, 1955, vol. 72, no 5, n. 438-445.

S

SAMAVATI, Vahid et MANOOCHEHRIZADE, Amir. Polysaccharide extraction from *Malva sylvestris* and its anti-oxidant activity. *International journal of biological macromolecules*, 2013, vol. 60, p. 427-436.

Schofield, P & Mbugua, David & Pell, Alice. (2001). Analysis of condensed tannins: A review. *Animal Feed Science and Technology - ANIM FEED SCI TECH.* 91. 21-40. 10.1016/S0377-8401(01)00228-0.

SFO PCV 45, Grand'Rue 79200 La Peyratte Tel 05.49.64.43.91, Op Tech : Observatoire de l'environnement Poitou Charentes, Webmaster (Photographie : Jean-Pierre RingAngles sur Anglin17 février 2008), Les baies du Lierre (*Hedera hélix*)

Shawky, Eman & El Sohafy, Samah. (2019). Untargeted and targeted chemical profiling for efficacy-directed discrimination of Hedera helix L. subspecies using HPTLC-image analysis and HPTLC/MS. Industrial Crops and Products. 145. 10.1016/j.indcrop.2019.111980.

Souad, Athamena & Laroui, S.. (2014). article 2. 16-26.

STAHL, Egon, *et al.* Thin-layer chromatography: a laboratory handbook. *Thin-layer chromatography: a laboratory handbook.*, 1962.

Strang C. (2006). *La rousse médicale.* Ed Larousseu.

Swinehart, Donald F. The beer-lambert law. *Journal of chemical education*, 1962, vol. 39, no 7, j. 333.

SZABO, M., IDIȚOIU, C., CHAMBRE, D., *et al.* Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical Papers*, 2007, vol. 61, no 3, p. 214-216.

T

Terrai N., Ferhaoui A. ; « Validation, identification et contrôle d'un procédé de fabrication de sirop». 2014, Mémoire de master en génie pharmaceutique, Université Constantine 3, Algérie.

Timon-David, P., JULIEN, J., GASQUET, M., *et al.* Research of antifungal activity from several active principle extracts from climbing ivy: *Hedera helix* L. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 1980, vol. 38, no 6, p. 545-552.

W

Wolfgang Hensel, *welche Heilpflanze IST das* 2007 Franckh-Kosmos verlags GmbH&co, Stuttgart .Edition Française @ Delachaux et Nestlé SA, Paris 2008, ISBN : 978-2- 603-01531-5 : Les indispensables nature de Del chaux, 350 plantes médicinales

Y

YAMAGUCHI, Tomoko, TAKAMURA, Hitoshi, MATOBA, Teruyoshi, *et al.* HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1998, vol. 62, no 6, p. 1201-1204.

Z

ZAZHARSKYI, V. V., DAVYDENKO, P. O., KULISHENKO, O. M., *et al.* Antibacterial and fungicidal activities of ethanol extracts from *Cotinus coggygia*, *Rhus typhina*, *R. trilobata*, *Toxicodendron orientale*, *Hedera helix*, *Aralia elata*, *Leptopus chinensis* and *Mahonia aquifolium*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2020, vol. 11, no 2, p. 305-309.

ZAHALKA Jaan-Phitippe, *les plantes en pharmacie propriétés et utilisation* .2005

Annexe

Annexe

Tableau 1 : Les réactifs et leurs propriétés.

REACTIF	FORMULE CHIMIQUE	MASSE MOLAIRE (g/mol)	PURTE %
Acetate d'éthyl	C ₄ H ₆ O ₂	88,11	99,8
Acetonitrile	C ₂ H ₃ N	41,05	/
Acide Chlorhydrique	HCl	36,46	35_38
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄	98.079	/
Carbonate de Sodium	Na ₂ CO ₃	105.98	99.8
Chlorure d'Aluminium	AlCl ₃	133.34	95_98
Chlorure de fer III	FeCl ₃	162,2	/
Chlorure de Sodium	NaCl	58.44	
Dichloromethane	CH ₂ CL ₂	84,93	100
Eau distillé	H ₂ O	18	/
Ethanol	C ₂ H ₆ O	46,07	96
Folin-cioaltea	/	/	/
Hydroxyde de sodium	NaOH	39.997	/
Methanol	CH ₃ OH	375.13	99
Nitrite de sodium	NaNO ₂	68,9953	99
Vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	152,15	99

II. Préparations des Réactifs :

Le réactif Folin-cioaltea : (1 ml réactif dans 10ml de H₂O).

Vanilline : 1 g de vanilline complété avec 100ml de H₂O.

FeCl₃ 0.1% : dissoudre 0.1 g de la poudre dans une fiole.

Na₂CO₃ 7, 5% : dissoudre 7, 5 g de la poudre dans une fiole.

AlCl₃ 2% : dissoudre 2 g de la poudre dans une fiole.

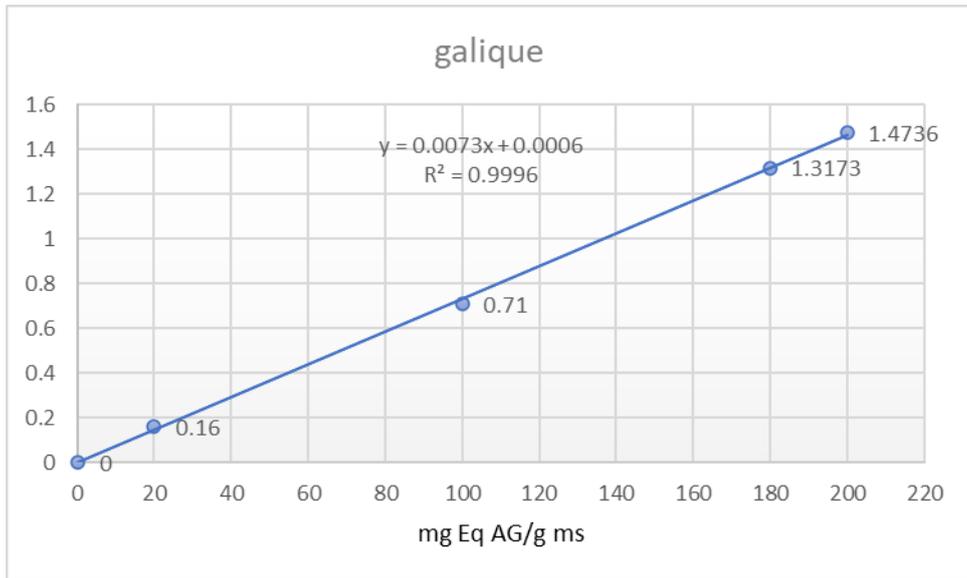


Figure 1 : droite etalonnage acide galique

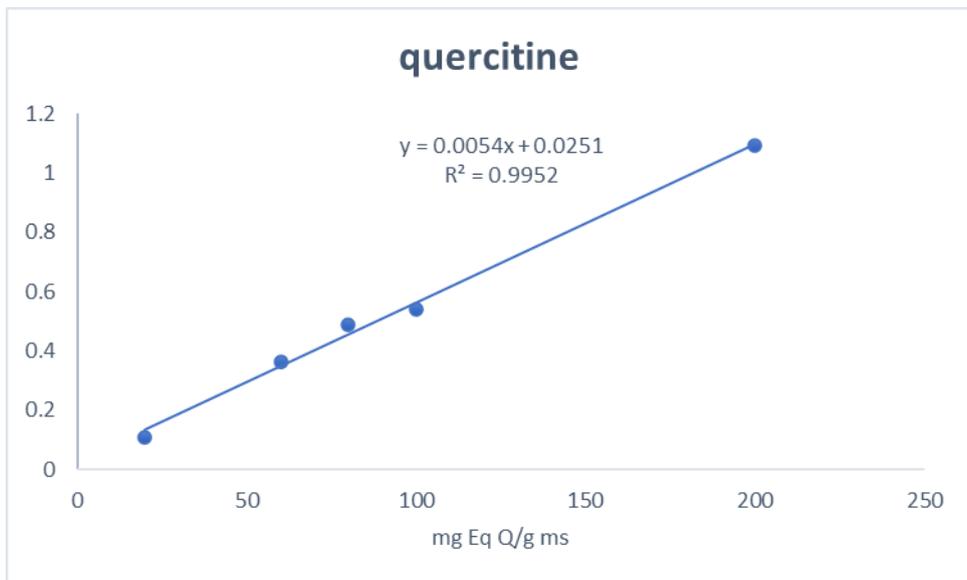


Figure 2 : droite etalonnage de la quercitine

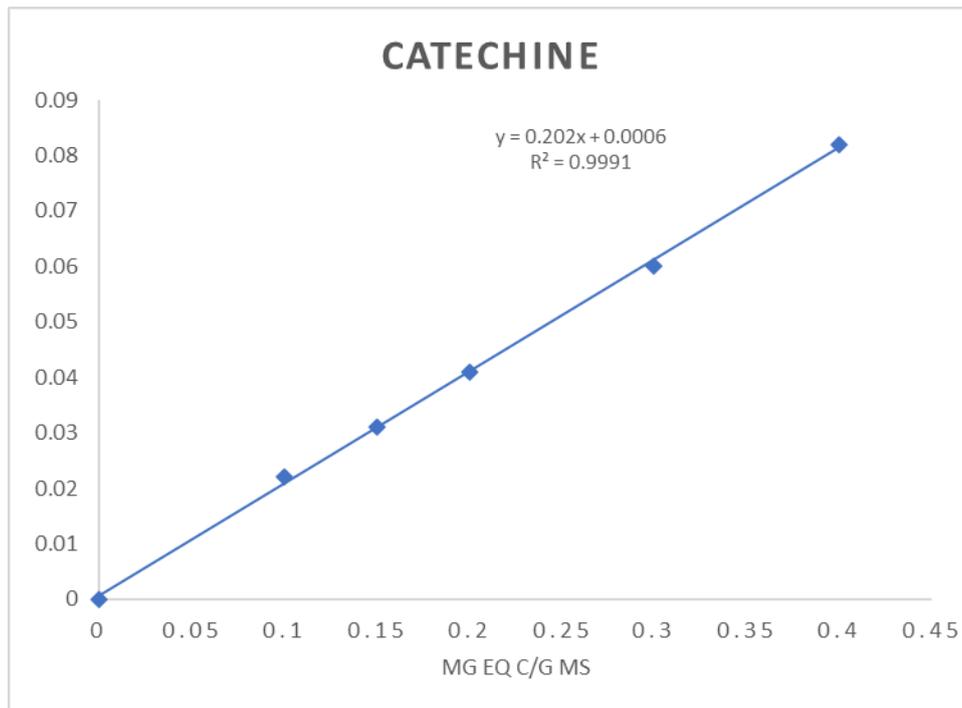


Figure 3 : droite etalonnage de la catechine



Figure 4 : plaques CCM de l'extrait aqueux de lierre

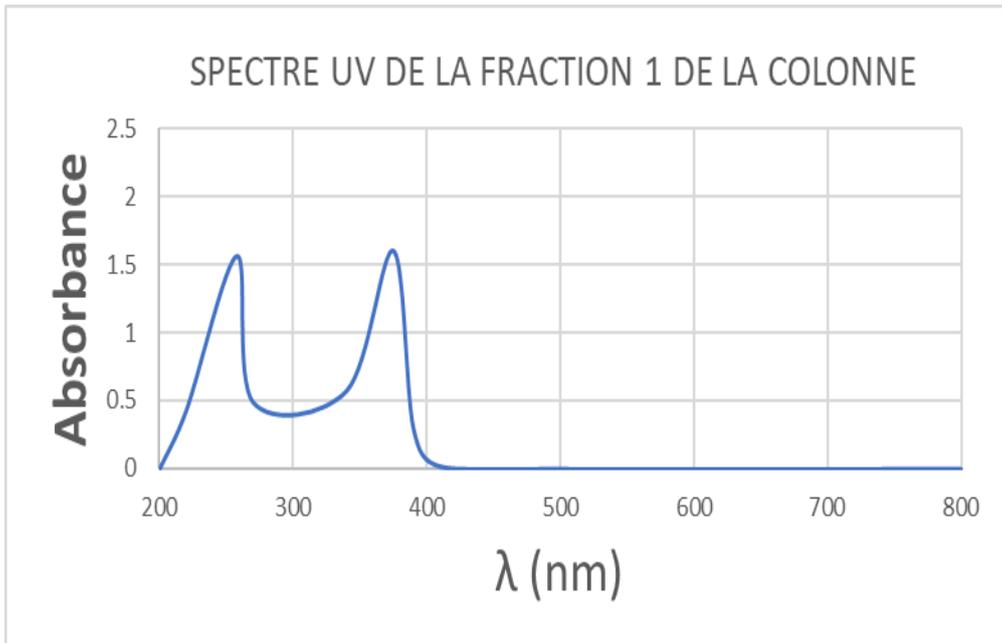


Figure 5 : spectre UV de la fraction 1

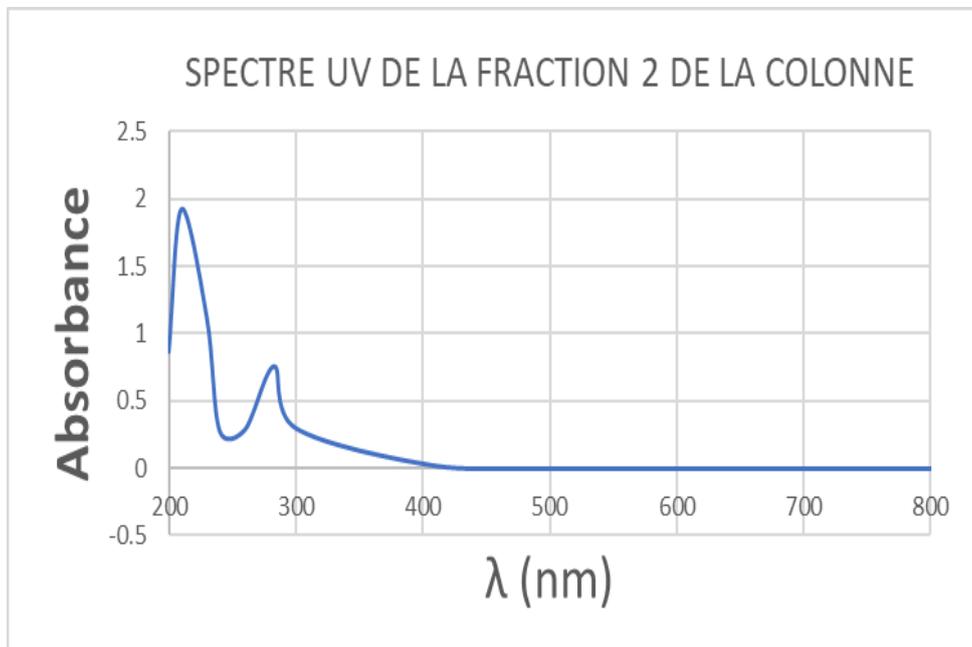


Figure 6 : spectre UV de la fraction 2

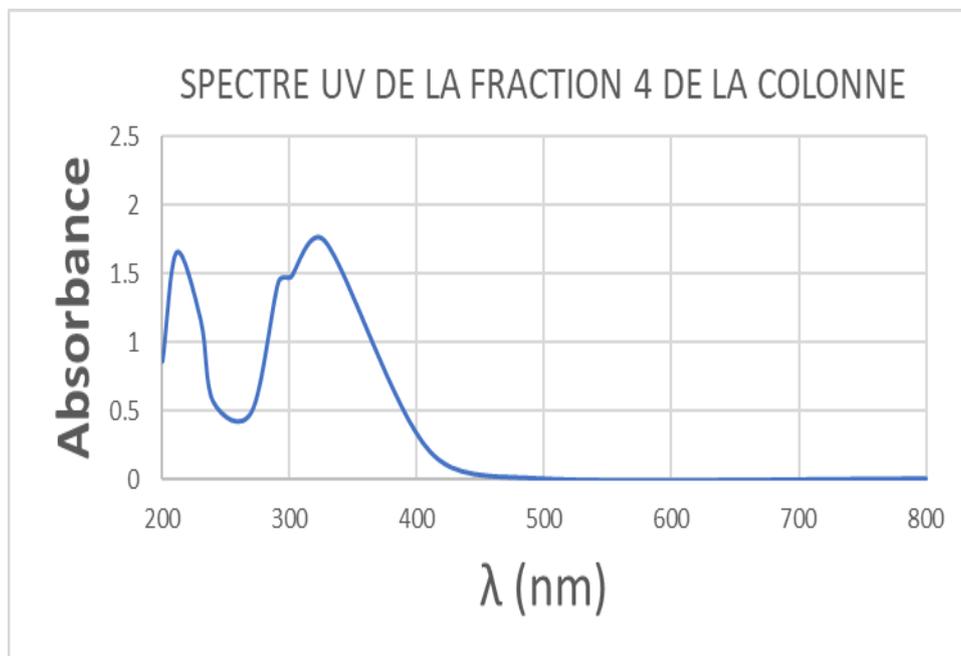


Figure 7 : spectre UV de la fraction 4

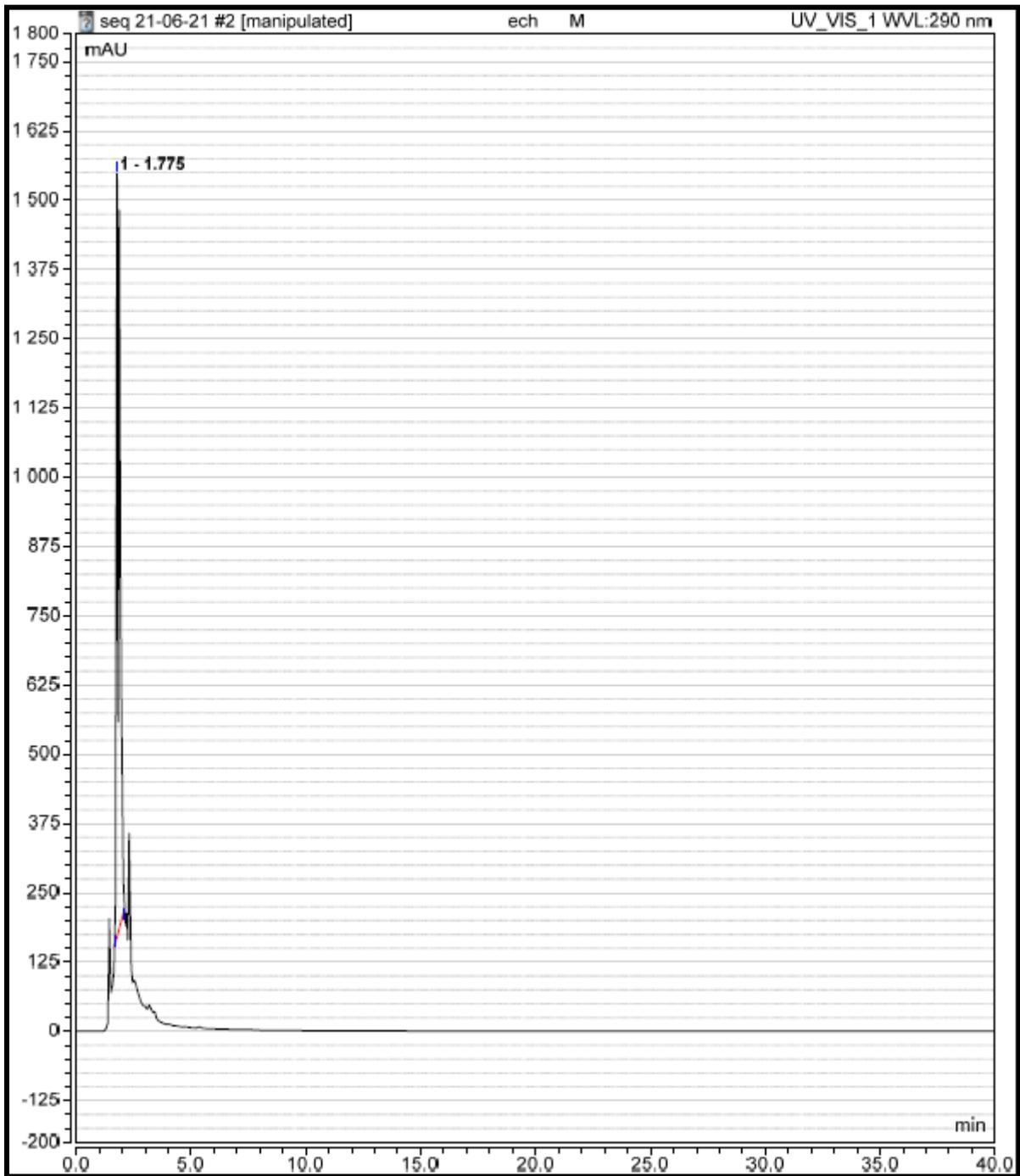


Figure 8 : chromatogramme de l'extrait des feuilles mature obtenu par hplc

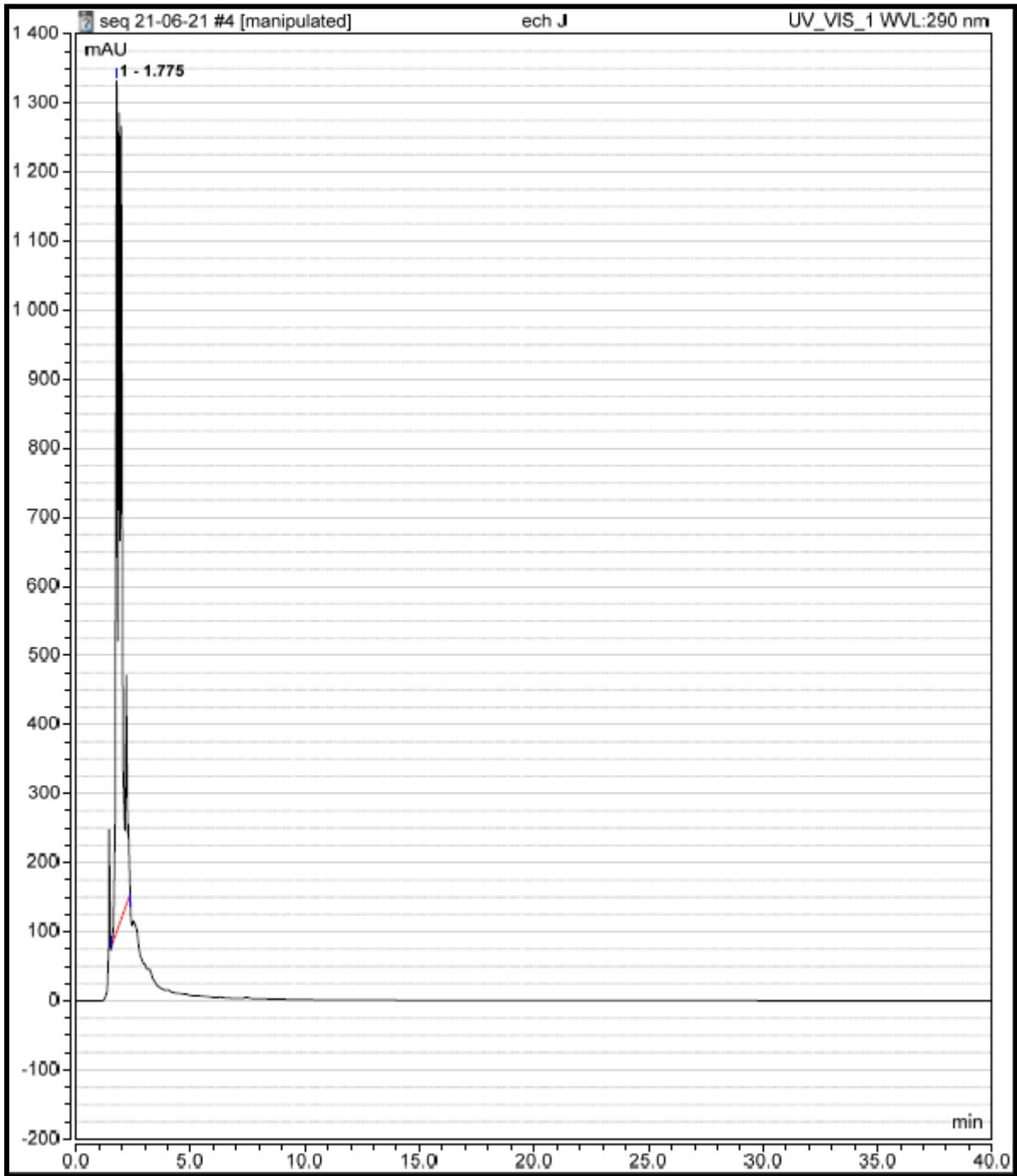


Figure 9 : chromatogramme de l'extrait des feuilles mature obtenu par hplc

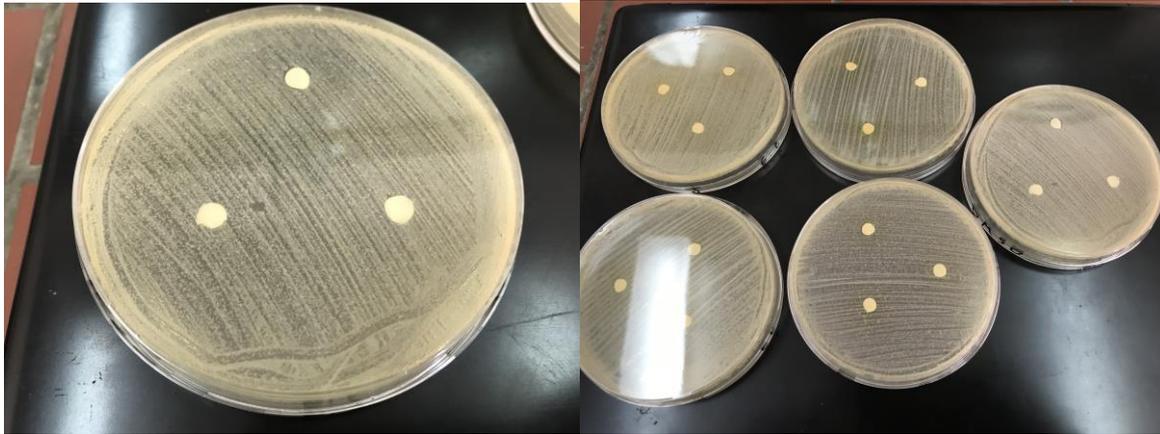


Figure 10 : résultats de l'antibiogramme sur le *Escherichia coli*

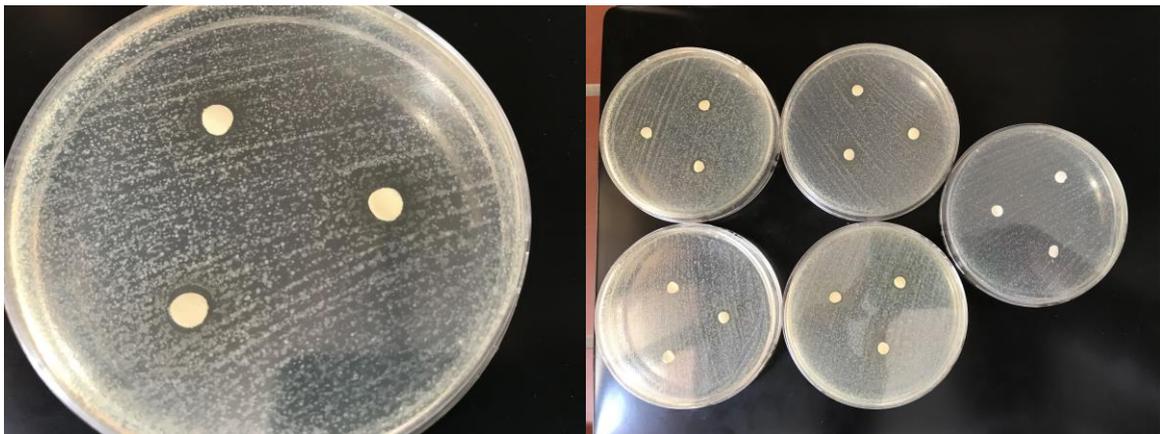


Figure 11 : résultats de l'antibiogramme sur le *Staphylococcus aureus*

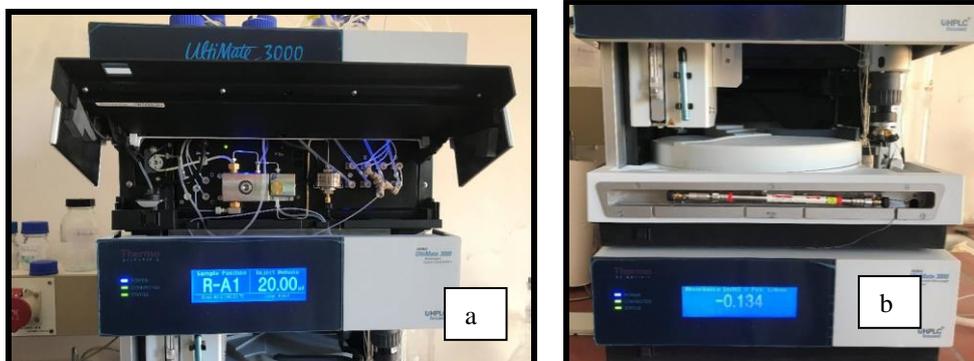


Figure 12 : les composants d'une HPLC (UltiMate 3000) impliqués dans une analyse
(a)compartiment de pompage, (b)compartiment d'injection et de détection

Résumé

Dans la médecine populaire, l'extrait de *Hedera Helix* est beaucoup utilisé pour le traitement d'un large éventail d'inflammations internes et externes, il est utilisé sous forme de tisane, d'infusion, de sirop, ou teinture. L'objectif de notre étude est l'extraction par deux différentes méthodes et avec des solvants de polarité différente des métabolites secondaires que renferment les feuilles *Hedera helix* ainsi que l'évaluation de leurs activités antioxydantes et antibactériennes. Les identifications qualitatives et les estimations quantitatives par les différentes méthodes photochimiques, spectrophotométriques et chromatographiques ont confirmées la présence et le dosage de métabolites biologiquement actifs tel que les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins et dont la concentration varie selon l'âge de la feuilles (feuilles jeunes ou feuilles mature). Les tests antibactériens ont confirmé l'efficacité antibactérienne des extraits de *Hedera Helix* contre le staphylocoque mais une inefficacité contre l'Escherichia coli, l'activité antioxydante des extraits des feuilles a été aussi largement démontrée. Un sirop à effet antitussif à base d'extrait de feuilles matures de l'*Hedera Helix* a été confectionné le '**Hederasif**'.

Abstract

In folk medicine, **Hedera Helix** extract is widely used for the treatment of a wide range of internal and external inflammation, it is used as a herbal tea, infusion, syrup, or tincture. The objective of our study is the extraction by two different methods and with solvents of different polarity of the secondary metabolites contained in the **Hedera helix** leaves as well as the evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. Qualitative identifications and quantitative estimates by different photochemical, spectrophotometric and chromatographic methods have confirmed the presence and dosage of biologically active metabolites such as polyphenols, flavonoids and tannins, the concentration of which varies according to the age of the leaves (young leaves or mature leaves). Antibacterial tests have confirmed the antibacterial activity of **Hedera Helix** extracts against staphylococcus but ineffectiveness against Escherichia coli, the antioxidant activity of leaf extracts has also been widely demonstrated. A cough syrup made from extract of mature Hedera Helix leaves has been made into ‘‘ **Hederasif** ‘‘.