



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة باجي مختار - عنابة

Université Badji Mokhtar - Annaba

Faculté des Sciences

Département de Biologie

Thèse de Doctorat en

Biologie Végétale et Environnement

Option : Biodiversité et Gestion des Ecosystèmes

THEME :

**Etude phytochimique et activité biologique des deux espèces :  
*Teucrium polium* L. et *Pituranthos chloranthus* Coss et Dur**

Présentée par

Madame **DRIDI Amina**

Membres de jury

Président	Mr. TAHAR Ali	Professeur	Université d'Annaba
Directeur de thèse	Mr. HADEF Youcef	Professeur	Université d'Annaba
Examineur	Mme. BENNADJA Salima	Professeur	Université d'Annaba
Examineur	Mr. CHEFROUR Azzedine	Professeur	Université de Souk ahras
Examineur	Mr. NASRI Hichem	Professeur	Université d'El Taref

**Année universitaire : 2017 / 2018**

## **Remerciement :**

Louange à Allah, le très puissant, clément et miséricordieux de m'avoir donné la force et la patience nécessaires pour réaliser ce travail de recherche

Monsieur HADEF Youcef professeur au département de pharmacie, laboratoire de chimie analytique, université Badji Mokhtar d'Annaba, je tiens à vous adresser mes profonds remerciements pour m'avoir encadré. Je tiens à manifester ma reconnaissance pour votre patience, votre gentillesse et votre écoute.

Monsieur TAHAR Ali professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, à qui je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour son aide durant mon cursus universitaire, et je le remercie infiniment de m'avoir donné l'honneur de présider le jury.

J'exprime mes plus sincères remerciements aux membres de jury d'avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et de participer au jury de ma soutenance,

- Monsieur CHEFROUR Azzedine professeur à l'université Mohamed-Cherif Messaadia Souk Ahras,
- Mr NASRI Hichem professeur à l'université Chadli Benjedid El Taref,
- Mme BENNADJA Salima professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba.

Je remercie Maitre-assistant BENMOUSSA Taher, à l'université L'hadj Lakhdar de Batna pour son aide.

Au sein du laboratoire de chimie analytique, j'ai pu rencontrer de très nombreuses personnes qui m'ont apporté une aide considérable et je leur remercie : Dr LAKEHEL Samia, Dr GOUASMI Zhor, Loubna, Manel, Asma, Leila, Amina , Soumia et toute l'équipe de laboratoire ainsi que l'ingénieur Faouzi, mes pensées vont aussi aux doctorantes que j'ai pu rencontrer et particulièrement à KERKOUB Neila ma confidente, mon amie, avec qui j'ai passé d'excellents moments de complicité. Merci pour ton aide, ta collaboration et tes encouragements.

Je tiens à remercier ma copine d'enfance Dr BOUHADDOUDA Nabila docteur en biologie qui m'a vraiment aidé pour l'aboutissement de ce travail.

Que vous dire, mes chers parents, vous étiez toujours là pour m'écouter, me soutenir, me reconforter et m'encourager dans les moments de doute....Tous les mots ne suffiraient pas...Sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien et votre amour.

Merci à mes proches, et mes amis pour votre soutien et votre présence à mes côtés.

Enfin, je remercie mon mari OTMANI Mohamed Sghir pour sa présence, et son soutien inconditionnel.

### *Dédicace :*

Je dédie ce travail mes parents. C'est difficile d'exprimer mes sentiments envers eux par de simples mots : merci pour votre amour, votre affection, vos encouragements, vos sacrifices. Que dieux vous garde.

A ma belle-famille que je considère comme ma deuxième famille : ma belle-mère, mon beau père et mes deux sœurs Khaouter et Inessou sans oublier mes petites chéries Serine et Neila.

Mes dédicaces vont également à mes tantes, mes oncles, cousins et cousines toute la famille DRIDI et REGADI en particulier Tifa , Mebarek et Khalil qui m'ont aidé durant mes sorties sur terrain.

Ma sœur Salima qui m'a soutenus, encouragé, qui été une maman pour moi, son mari Saïd mon frère adoré que j'aime et je respecte beaucoup je remercie dieux qui nous a donné un cadeau pareil et ces enfants mes deux bijoux Adam et Linoucha.

A la mémoire de nos défunt : ma grand-mère et ma tante.

A mon cousin MOKAS Fouad pour son aide toute au long de mon parcours, un grand MERCI mon frère.

A toute mes copines : Nabila, Rania, Sarah, Soumeya, Hanene, Dady, Sameh et Neila pour le moment qu'on a passé ensemble.

Mon époux OTMANI Mohamed Sghir, merci une autre fois grâce à ton aide, ta compréhension et ta patience que ce travail a pu voir le jour.

A mon bébé adoré ma petite fille Malak, pour qu'un jour tu sois fière de ta maman.

## Résumé :

*Teucrium polium* L. et *Pituranthos chloranthus* (Coss. & Durieu) Benth. & Hook. sont deux espèces de la flore algérienne spontanée, largement utilisées en médecine traditionnelle pour de nombreuses pathologies.

L'objectif de ce travail est de mener des études phytochimiques et biologiques sur l'huile essentielle et l'extrait méthanolique des deux espèces récoltées à leur stade de floraison et avant floraison afin d'obtenir des prérequis permettant l'évaluation de leur intérêt dans le développement de phytomédicaments.

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles, obtenues par hydrodistillation des parties aériennes fleuries, a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) qui a permis d'identifier 40 composés pour *T. polium* et 44 composés pour *P. chloranthus.*, dont les majoritaires pour *Teucrium polium* L. D-cadinène (40.26%), 3-carène (12.64%), eremophilène (5.49%) et 1-R- $\alpha$ -pinène (18.63%), paracymène (14.69%),  $\alpha$ -thuyène (9.77%), aromadendène dehydro (9.15%) pour *P. chloranthus.*

L'évaluation de la teneur en composés phénoliques de l'extrait méthanolique, obtenu par macération des parties aériennes fleuries, a été réalisée par des méthodes colorimétriques au réactif de Folin-Ciocalteu pour les polyphénols totaux, au chlorure d'aluminium pour les flavonoïdes et au réactif de Folin-Denis pour les tanins totaux. Les teneurs les plus importantes ont été enregistrés pour *T. polium* de la région de Meguessemia.

L'activité antioxydante a été testée par trois méthodes : la mesure de la capacité de piégeage du radical libre DPPH, la mesure du pouvoir réducteur du fer et la méthode au molybdate d'ammonium en utilisant l'acide ascorbique comme standard pour les trois méthodes. Les résultats ont montré une activité antioxydante de l'extrait méthanolique largement plus importante que celle de l'huile essentielle pour les deux espèces. L'espèce de *T. polium* a présenté une activité plus intéressante que celle de *P. chloranthus.*

L'activité antifongique pour les huiles essentielles a été estimée par dilution en milieu liquide. Les résultats ont montrés un pouvoir antifongique très important pour l'H.E de *T. polium* durant la saison de floraison.

La sensibilité bactérienne aux huiles essentielles et aux extraits méthanoliques a été testée par diffusion sur disques. La concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches sensibles a été mesurée par incorporation en milieu solide pour les huiles essentielles et par micro-dilutions pour les extraits. Les valeurs des CMI des huiles essentielles varient de 1 à 15  $\mu$ L/mL. Celles des extraits sont comprises entre 3,125 et 50 mg/mL.

L'ensemble des résultats tant sur le plan chimique que biologique met en évidence les potentialités des deux espèces étudiées pour une éventuelle exploitation thérapeutique.

**Mot clé : *Pituranthos chloranthos* (Coss et Dur) Benth et Hook, *Teucrium polium* L., huiles essentielles; activité antibactérienne, polyphénols, activité antifongique, Activité antioxydante.**

## Abstract

*Teucrium polium* L. and *Pituranthos chloranthus* (Coss. & Durieu) Benth. & Hook are two species of the spontaneous Algerian flora, and largely used in traditional medicine for many pathologies.

The aim of this work is to carry out physicochemical and biological studies on the essential oil and the methanolic extract of the two species which were collected at their flowering stage, and before flowering in order to obtain prerequisites allowing the evaluation of their interest in the development of phytomedicine.

The study of the chemical composition of essential oils, obtained by hydro-distillation of the flowered aerial parts, was realized by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), and allowed to identify 40 components for *T. polium* and 44 components for *P. chloranthus*. The majority for *Teucrium polium* L. D-cadinène (40.26%), 3-carène (12.64%), eremophilène (5.49%) et 1-R- $\alpha$ -pinène (18.63%), paracymène (14.69%),  $\alpha$ -thuyène (9.77%), aromadendène dehydro (9.15%) for *P. chloranthus*.

The evaluation of the content of phenolic components in the methanolic extract, obtained by maceration of the flowered aerial parts, was realized by colorimetric methods with Folin-Ciocalteu reagent for total polyphenol, aluminum chloride for flavonoids and Folin-Denis reagent for total tannins. The most important contents were recorded for *T. polium* of Meguessemia region.

Antioxydant activity was tested by three methods: the measurement of the trapping capacity of free radical DPPH, the measurement of the reducing power of iron, and the method of ammonium molybdate by using ascorbic acid as standard for the three methods. The results showed an antioxidant activity of the methanolic extract largely more important than the antioxidant activity of the essential oil for the two species. *T. polium* presented a more interesting activity than *P. chloranthus*. Antifungal activity of the essential oils was estimated by dilution in liquid medium. The results showed a very important antifungal power of *T. polium*'s essential oil during the flowering season. Bacterial sensitivity to essential oils and methanolic extracts was tested by diffusion on discs. The minimal inhibitory concentration (MIC) for the sensitive strains was measured by incorporation in solid medium for essential oils and by micro-dilutions for the extracts. The MIC of essential oils varies from 1 to 15  $\mu$ L/mL, and those of extracts are between 3,125 and 50 mg/ml.

All of the results, both chemically and biologically, bring out the potentialities of the two studied species for a possible therapeutic exploitation.

**Keywords:** *Pituranthos chloranthos* (Coss et Dur) Benth et Hook, *Teucrium polium* L., essential oil; antibacterial activity, polyphenols, antifungal activity, antioxidant Activity.

## المخلص

*Teucrium polium* L و *Pituranthos chloranthus* هما نوعان من النباتات الجزائرية العفوية يستخدمان على نطاق واسع في الطب التقليدي ضد العديد من الأمراض

-الهدف من هذا العمل هو إجراء دراسات كيميائية وبيولوجية على الزيوت العطرية ومستخلص الميثانول للنوعين من النبات في مرحلتي الأزهار و ما قبل الإزهار ، من أجل الحصول على المتطلبات الأساسية التي تسمح بتقديم إهتماماتها في تطوير الطب العشبي .

-دراسة التركيب الكيميائية للزيوت العطرية التي تم التحصل عليها عن طريق التقطير بالبخار للجزء الهوائي للنبتين عن طريق (CPG/SM) ، التي مكنتنا من تعريف 40 مركب ل *Pituranthos chlorenthus* و 44 مركب ل

*Teucrium polium* ( 18.63% ) D-cadinene ، 3-caréne ( 12.64% ) ، Eremophiléne ، (6.49% ) ، aromadendéne ، thuyéne (9.77%) paracyméne (%14.69) 1-R- pinène (18.63) Pituranthos ل dehytro (9.18%)

-تقييم محتوى المركبات الفينولية حتى المستخلص الميثانولي تم إجراؤها عن طريق التلون Falin ciacalteu كاشف لمجموع البيوفيتول و  $AlCl_3$  للفلافونويد و Folin denis للثناء فسجلت اعلى نسبة في *T.polium* في منطقة مقسمة .

-تم إختيار النشاط المضاد للأكسدة من خلال ثلاثة طرق قياس قدرة على تخفيض المؤكسد DPPH وقياس القدرة المخفضة للحديد وطريقة موليبيدات الألمنيوم ، بإستعمال حمض الأسكوربيك كمعيار لجميع الطرق الثلاثة فأظهرت النتائج أن المستخلص الميثانولي هو أحسن مضاد أكسدة في جميع الحالات وأكبر من الزيوت الطيارة لكلا نوعين و *T.polium*

أحسن من *Pituranthos chlorenthus*.

-تم تقدير النشاط المضاد الفطريات بوجود الزيوت الطيارة بواسطة التخفيض في الوسط السائل فأظهرت النتائج أن *T.polium* هو الأكثر نشاط في مرحلة الإزهار

- تم الاختيار الحساسية البكتيرية للزيوت العطرية ومستخلص الميثانول عن طريق استنتار في القرص تم قياس الحد الأدنى للتوكيد CMI فاستعمالنا الوسط الصلب الزيوت وبمقياس يتراوح ما بين 1 و 15 ميكرو لتر /ملل وبسبة 3.125 و 50 ملغ /مل كمستخلص الميثانول

-النتائج الشاملة سواء كيميائية او بيولوجية ، تساعدنا على معرفة القدرة العلاجية للنباتات المدروسة

**الكلمات المفتاحية :** *Teucrium polium*، *Pituranthos chlorenthus* زيوت طيارة ، نشاط مضاد الجراثيم ، بوليبيول ، نشاط مضاد .

## Sommaire

Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Introduction générale.....	

1

## PARTIE THEORIQUE

### *Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles*

I.1. Définitions .....	3
I.2 Procédés d'obtention .....	4
I.2.1. Distillation- Evaporation.....	4
I.2.2. Co-distillation avec vapeur d'eau.....	4
I.2.4. Extraction par expression.....	6
I.2.5. Extraction par enfleurage .....	6
I.2.6.Extraction avec des solvants .....	7
I.3. Généralité structurales.....	7
I.4. Répartition et localisation.....	10
I.5. Propriétés pharmacologiques et mécanisme et site d'action .....	11
I.5.1. Mécanisme d'action .....	11
I.5.2. Propriétés antimicrobiennes .....	11
I.5.3. Propriétés anti-inflammatoires .....	12
I.5.4. Propriétés anti-oxydante.....	13



## **Chapitre II : Généralité sur les composés phénoliques**

II.1. Définition .....	14
II.2. Origine .....	14
II.3. Généralité structurale.....	14
II.4. Propriétés thérapeutiques des polyphénols et mécanisme d'action.....	17
II.4.1. Mécanisme d'action.....	17
II.4.2. Effet anti-inflammatoire.....	18
II.4.3. Effet anti-acide.....	18
II.4.4. Effet anti-cancer.....	18
II.4.4. Propriétés antibactérienne.....	19

## **Chapitre III : Monographie des plantes étudiées**

III.1. <i>Teucrium polium</i> L. ....	20
III.1.1. Généralités sur la famille des Lamiacées .....	20
III.1.2. Le genre <i>Teucrium</i> .....	20
III.1.3. Description de l'espèce <i>Teucrium polium</i> L.....	21
III.1.4. Position systématique .....	21
III.1.5. Noms vernaculaire .....	22
III.1.6. Répartition et écologie.....	22
III.1.7. Utilisation thérapeutique .....	23
III.2. <i>Pituranthos chloranthus</i> (Coss et Dur) Benth et Hook. ....	23
III.2.1. Généralités sur la famille des Apiacées.....	23
III.2.2. Le genre <i>Pituranthos</i> .....	23
III.2.3. Description de l'espèce <i>Pituranthos chloranthus</i> . ....	24
III.2.4. Position systématique .....	25
III.2.5. Nom vernaculaire .....	25
III.2.6. Répartition et écologie .....	25

III.2.7. Utilisation thérapeutique.....	26
---	----

**PARTIE PRATIQUE**  
**Chapitre I: Matériels et méthodes**

I.1. Matériels végétal .....	27
I.2. Test phytochimique.....	28
I.2.1 Préparation de l'infusé .....	28
I.2.1.1 Préparation de l'infusé .....	28
I.2.1.2. Recherche des tanins.....	28
I.2.1.3 Recherche des anthocyanes.....	29
I.2.1.4. Recherche des leucoanthocyanes.....	29
I.2.2 Tests préliminaires sur le décocté .....	29
I.2.2.1. Préparation du décocté .....	30
I.2.2.2. Recherche des saponosides.....	30
I.2.3. Tests préliminaires sur les poudres.....	31
I.2.3.1. Recherche des alcaloïdes.....	31
I.2.3.2 Recherche des flavonoïdes.....	31
I.2.3.3. recherche des triterpènes et stérols.....	31
I.2.3.4. Recherche des quinones.....	31
I.2.3.5. Recherche des anthoquinones.....	32
I.3. Extraction et caractérisation des huiles essentielles.....	32
I.3.1. Extraction des huiles essentielle.....	32
I.3.2. Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T75-112	34
I.3.3. Analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles par CPG/SM	35
	39

I.4.. Extraction et caractérisation des composés phénoliques .....	39
I.4.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	39
I.4.2.Dosage des polyphénols totaux.....	
I.4.3..Dosage des flavonoïdes totaux .....	40
I.4.4..Dosage des tanins .....	41
I.5. Activités biologiques .....	41
I.5.1. Activité antioxydante.....	41
I.5.1.1. Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de DPPH.....	42
I.5.1.2.Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de FRAP .....	43
I.5.1.3.Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium .....	44
I.5.2. Activité antibactérienne .....	45
I.5.2.1. Souches bactériennes testés sur les différents extraits.....	45
I.5.2.2. Milieu de culture.....	45
I.5.2.3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques.....	45
I.5.2.4. Détermination des CMI des huiles essentielles.....	46
I.5.2.5. Détermination des CMI des extraits.....	46
I.5.3.Activité antifongique des huiles essentielles.....	48

## **Chapitre II : Résultats et discussions**

II.1 Screening chimique des métabolites secondaires .....	49
II.2. Extraction et caractérisation des principes actifs.....	50
II.2.1 Extraction des huiles essentielles .....	50
II.2.2.Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T75-112.....	52
II.2.3.Analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles par CPG/SM .....	53
II.3. Extraction et caractérisation des composés phénolique.....	61

II.3.1 Extraction des composés phénolique. ....	61
II.3.2. Analyse quantitative des composés phénoliques par méthode spectrophotométrique.....	63
II.3.2.1 Dosage des composés phénoliques totaux .....	64
II.3.2.2.Dosage des flavonoïdes .....	65
II.3.2.3..Dosage des tanins .....	66
I.4. Activités biologiques .....	68
II.4.1. Activité antibactérienne .....	68
II.4.1.1. Test de sensibilité .....	68
II.4.1.2. Détermination des CMI des extraits méthanoliques .....	72
II.4.1.3. Détermination des CMI des huiles essentielles .....	73
II.4.2. Activité antifongique des huiles essentielles .....	74
II.8.3. Activité antioxydante .....	80
II.8.3.1. Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de DPPH.....	80
II.8.3.2. Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de FRAP.....	81
II.8.3.3. Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium.....	83
Conclusion et perspective .....	85
Bibliographie et webographie.....	87
Annexe.....	101

**Liste des abréviations:**

<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
<b>F</b>	Floraison
<b>A.F</b>	Avant floraison
<b>H.E</b>	huile essentiel
<b>Mg EAG/gMS</b>	milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche
<b>Mg EC/ g MS</b>	milligramme d'équivalent de catéchine par gramme de matière sèche
<b>Mg EAT/g MS</b>	milligramme d'équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche
<b>M.H</b>	Gélose Muller Hinton
<b>DMSO</b>	Diméthyl sulfoxide
<b>C.M.I</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CPG/SM</b>	Chromatographie phase gazeuse couplée au spectro de masse
<b>NBT</b>	Nitro bleu tetrazolium
<b>ATCC</b>	American type culture collection

## Liste des figures

N°	Titre de figure	Page
<b>Figure 1</b>	Situation géographique des deux régions d'étude	28
<b>Figure 2</b>	Appareil pour la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (Dimensions en millimètres)	33
<b>Figure 3</b>	Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG) couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID)	36
<b>Figure 4</b>	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	37
<b>Figure 5</b>	Appareil de chromatographie en phase gazeuse	39
<b>Figure 6</b>	Réaction de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant	42
<b>Figure 7</b>	Représentation graphique des rendements en huiles essentielles	51
<b>Figure 8</b>	Répartition en % des composés de H.E de <i>Teucrium polium</i> L. selon le nombre de carbone.	54
<b>Figure 9</b>	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> L.	55
<b>Figure 10</b>	Spectre de masse des principaux constituants de l'HE de <i>T. polium</i>	57
<b>Figure 11</b>	Spectre de masse des principaux constituants de l'HE de <i>P. chloranthus</i>	58
<b>Figure 12</b>	Répartition en % des constituants chimiques des H.E de <i>Pituranthos chloranthus</i> Coss et Dur.	60
<b>Figure 13</b>	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Pituranthos chloranthus</i> Coss et Dur.	61
<b>Figure 14</b>	Représentation graphique des rendements de la macération méthanolique	62
<b>Figure 15</b>	Teneur en composés phénoliques totaux	64
<b>Figure 16</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	64
<b>Figure 17</b>	courbe d'étalonnage de la catéchine	65
<b>Figure 18</b>	Teneurs en flavonoïdes <i>mg E Catéchine/ g Matière sèches</i>	66
<b>Figure 19</b>	Teneurs en tanins <i>mg E acide tannique/ g Matière sèches</i>	67
<b>Figure 20</b>	Courbe d'étalonnage d'acide tannique	68
<b>Figure 21</b>	Action antifongique de l'HE de <i>T. polium</i> . (Ouenza floraison)	77
<b>Figure 20</b>	Action antifongique de l'HE de <i>T. polium</i> ( Meguessemia, floraison)	77
<b>Figure 21</b>	Action antifongique de l'HE de <i>P. chloranthus</i> (Ouenza avant floraison)	78
<b>Figure 22</b>	Action antifongique de l'HE de <i>P. chloranthus</i> (Meguessemia, avant floraison)	78
<b>Figure 23</b>	Action antifongique de l'HE de <i>T. polium</i> . ( Ouenza, avant floraison)	79
<b>Figure 24</b>	Action antifongique de l'HE de <i>T. polium</i> . ( Meguessemia, avant floraison)	79
<b>Figure 25</b>	La capacité antioxydant (DPPH) des extraits méthanolique	82
<b>Figure 26</b>	La capacité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique	82

<b>Figure 27</b>	La capacité antioxydant (DPPH) des huiles essentielles de <i>T.polium</i>	82
<b>Figure 28</b>	La capacité antioxydant (DPPH) de H.E de <i>P. chloranthus</i>	82
<b>Figure 29</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique	83

### Liste des tableaux

N°	Titre de tableau	Page
<b>Tableau 1</b>	Classement et activité biologique de molécules aromatiques selon leur fonction chimique (Pibiri, 2006)	13
<b>Tableau 2</b>	Données géographiques des zones de récolte des espèces étudiées	27
<b>Tableau 3</b>	Criblage phytochimique de <i>Teucrium polium</i> L. et <i>Pituranthos chloranthus</i> Coss et Dur	49
<b>Tableau 4</b>	Rendements de l'hydrodistillation de <i>T. polium</i> et <i>P. chloranthus</i>	50
<b>Tableau 5</b>	Indices de réfraction des huiles essentielles	52
<b>Tableau 6</b>	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>T. polium</i> L.	53
<b>Tableau 7</b>	Classification de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> L. selon la fonction et le nombre de carbones	54
<b>Tableau 8</b>	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>P. chloranthus</i>	59
<b>Tableau 9</b>	Classification de l'huile essentielle de <i>Pituranthos chloranthus</i> selon la fonction et le nombre de carbone	60
<b>Tableau 10</b>	Teneurs des polyphénols totaux	62
<b>Tableau 11</b>	Teneurs en polyphénols totaux de <i>T. polium</i> et <i>P. chloranthus</i>	63
<b>Tableau 12</b>	Teneur en flavonoïdes totaux en mg EC/gMS	65
<b>Tableau 13</b>	Teneur en tanins totaux	67
<b>Tableau 14</b>	Diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne des H.E de <i>T. polium</i> L	68
<b>Tableau 15</b>	Diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne des H.E de <i>P. chloranthus</i> Coss et Dur.	69
<b>Tableau 16</b>	Diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de <i>T. polium</i> L.	70
<b>Tableau 17</b>	Diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de <i>P. chloranthus</i> Coss et Dur.	71
<b>Tableau 18</b>	Concentration minimale inhibitrice des H.E de <i>T. polium</i> et <i>P. chloranthus</i>	72
<b>Tableau 19</b>	Concentration minimale inhibitrice des extraits méthanoliques	73
<b>Tableau 20</b>	Activité antifongique des huiles essentielles	74
<b>Tableau 21</b>	Taux d'inhibition de la souche <i>Candida albicans</i> par l'HE de <i>T. polium</i> . (Ouenza, Floraison)	77
<b>Tableau 22</b>	Taux d'inhibition de la souche <i>Candida albicans</i> par l'HE de <i>T. polium</i> . (Meguessemia, Floraison)	77
<b>Tableau 23</b>	Taux d'inhibition de la souche <i>Candida albicans</i> par l'HE de de <i>P. chloranthus</i> . (Ouenza, Avant Floraison)	78
<b>Tableau 24</b>	Taux d'inhibition de la souche <i>Candida albicans</i> par l'HE de de <i>P. chloranthus</i> . (Ouenza, Floraison)	78
<b>Tableau 25</b>	Taux d'inhibition de la souche <i>Candida albicans</i> par l'HE de <i>T. polium</i> . (Ouenza, Avant Floraison)	79
<b>Tableau 26</b>	Taux d'inhibition de la souche <i>Candida albicans</i> par l'HE de <i>T. polium</i> . (Meguessemia, Avant Floraison)	79
<b>Tableau 27</b>	Concentration efficace médiane des extraits méthanolique et HE de <i>T. polium</i> et <i>P. chloranthus</i>	80
<b>Tableau 28</b>	Les valeurs de CE50 du pouvoir réducteurs de fer	81



<b>Tableau 29</b>	Les valeurs de CE50 de l'activité anti oxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium	83
-------------------	---	----

<b>N°</b>	<b>Titre des photos</b>	<b>Page</b>
<b>Photo 1</b>	Teucrium polium L.	21
<b>Photo 2</b>	Aspect morphologique de <i>Teucrium polium</i> L.	22
<b>Photo 3</b>	<i>Pituranthos chloranthus</i> (Coss et Dur) Benth et Hook	25
<b>Photo 4</b>	Aspect morphologique de <i>Pituranthos chloranthus</i> (Coss et Dur) Benth et Hook	25
<b>Photo 5</b>	Dispositif d'hydrodistillation de type Clevenger	33
<b>Photo 6</b>	Réfractomètre	35
<b>Photo 7</b>	Détermination des CMI par la méthode des microdilutions	47

**Liste des photos**

# **Partie théorique**

### Introduction générale :

L'Algérie compte dans sa flore un grand nombre de plantes médicinales appartenant à différentes familles botaniques et poussant aussi bien dans les zones fertiles du sahel que dans les hauts plateaux et les zones arides et désertiques.

La germandrée tomenteuse (*Teucrium polium* L.) et le pituranthos à balai (*Pituranthos chloranthus* (Coss. & Durieu) Benth. & Hook. ex Schinz) sont deux plantes utilisées par les populations locales dans diverses affections.

La germandrée tomenteuse, lamiacée commune des terrains rocaillieux, est utilisée dans les pathologies inflammatoires, la jaunisse, l'anorexie, les spasmes gastro-intestinaux, le diabète et dans les infections bactériennes.

Le pituranthos à balais, apiacée endémique du Nord de l'Afrique, poussant dans les rocailles et pâturages désertiques, est utilisé comme condiment et dans le traitement de l'asthme, des douleurs articulaires, des troubles digestifs, du diabète, des infections urinaires, ainsi que pour lutter contre les poux et comme antidote des morsures scorpioniques.

Les travaux menés sur la germandrée tomenteuse étant relativement peu nombreux et ceux menés sur le pituranthos à balai étant rares, la présente étude tente d'étayer le bien-fondé des notions populaires notamment concernant les activités antimicrobiennes, étant donné l'émergence des mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.

Dans cet axe, le présent document comporte la description des méthodes et l'analyse des résultats des essais tenues aux laboratoires de Chimie Analytique et de Contrôle et Développement des Préparations Pharmaceutiques Hospitalières sur les deux espèces et ayant consisté en :

- Une description organographique détaillée
- Un criblage phytochimique à la recherche des grands groupes de métabolites secondaires
- Une étude des huiles essentielles comportant :
  - Le rendement d'extraction par hydrodistillation
  - Une analyse des propriétés physiques
  - Une analyse qualitative et quantitative de la composition chimique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
  - Une évaluation des activités antioxydante, antifongique et antibactérienne

- Une étude des composés phénoliques comportant
  - Une extraction par des solvants organiques
  - Un dosage spectrophotométrique des composés phénoliques totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins totaux
  - Une détermination des activités antioxydante et antibactérienne.

# **Partie théorique**

### I.1. Définition

Les huiles essentielles = essences ou huiles volatiles, sont des produits de composition généralement assez complexe renferment les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Pour extraire ces principes, il existe divers procédés. Deux seulement sont utilisables pour la préparation des essences officinales:

- par distillation entrainer par la vapeur d'eau
- par expression.

Les H.E. sont généralement associées à la présence des structures histologiques spécialisées telles que les poils sécréteurs, les poches sécrétrices et les canaux sécréteurs, souvent localisées à proximité de la surface de la plante. **(Bruneton, 2009)**

Ces substances ont une des fonctions importante dans le domaine écologique pour son rôle de protection contre les prédateurs (insecte et champignon), ou dans les interactions végétales (agents allélopatique), dans le domaine cosmétique comme arôme et en médecine pour leurs effets thérapeutiques. **(Bruneton, 2009)**

Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et sensibles à l'oxydation. Elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux ce qui induit à la perte de ses propriétés. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (à l'exception des huiles essentielles de saffran, de girofle ou de la cannelle constituent des exceptions).et la plupart dévient la lumière polarisée **(Baser et Buchbauer, 2010)**.

La teneur des plantes en HE est très généralement faible (<10ml/kg). **(Baudoux et al., 2001)**,

Les rendements sont très variables d'une espèce à une autre, et dépend de plusieurs facteurs:

- De la méthode de distillation employée,
- d'une année à l'autre,
- d'une saison à l'autre (alcools terpéniques au printemps, phénols aromatiques à l'automne). -
- même d'une heure à l'autre,
- certaines plantes aromatiques devraient être distillée le matin, pour d'autre il faut les manipuler le soir, et d'une région à l'autre (nature du sol, ensoleillement, population végétales avoisinante).

Les huiles essentielles sont:

- Liquides à température ambiante. À base température, certaines H.E se solidifient comme celle d'anis.

- Consistance huileuse mais non grasse.
- Volatiles et odorantes, leur volatilité augmente avec la chaleur.
- Densité inférieure à celle de l'eau exceptée de la cannelle, le girofle etc.
- Rarement de couleur dense.
- Soluble dans l'alcool, insoluble dans l'eau (**Pharmacopée Européenne, 2010**).

## **I.2. Procédés d'extraction:**

La diversité dans la composition des huiles essentielles rend le choix des processus d'obtention délicat. La méthode choisie ne doit pas conduire à la discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner une perte de composés volatils. Pour cela, différents paramètres et propriétés sont à prendre en compte (**Fernandez et Cabrol-Bass, 2007**).

Pour extraire les H. Es il existe des paramètres fondamentaux, qui sont selon Peyron (1992):  
.0La volatilité, la solubilité, la taille et la forme des molécules constitutives, l'adsorption.

En général, le processus d'obtention des huiles essentielles se fait, selon Guenther (1949) par distillation

### **I.2.1. Distillation – Evaporation**

La différence entre distillation et évaporation, est l'intérêt porté aux produits séparés.

Dans la distillation, c'est la phase vapeur qui a de la valeur, car elle contient le ou les constituants à séparer, alors que dans l'évaporation, c'est le résidu solide ou liquide obtenu par vaporisation du solvant, qui est le produit intéressant (**Peyron, 1992**).

### **I.2.2. Co-distillation avec vapeur d'eau**

C'est probablement sur le plan tonnage, que la co-distillation avec vapeur d'eau est la principale technique de production des huiles essentielles. Trois techniques sont utilisées :

- **Hydrodistillation:**

La distillation à la vapeur, ou hydrodistillation, dans laquelle le végétal est en contact direct avec l'eau bouillante, ce qui évite d'agglutiner les charges végétales comme le fait l'injection de vapeur. Quelques utilisations actuelles: rose, fleurs d'oranger, amande pulvérisée. Les

vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. **(Bruneton, 1999)**

- **Entrainement à la vapeur sec:**

La distillation à la vapeur saturée: le végétal est supporté dans l'alambic par une plaque perforée située à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau. Le végétal est en contact avec la vapeur d'eau saturée, mais pas avec l'eau bouillante. **(Baudoux, 2001)**

Les plantes sont traversées par la vapeur d'eau, cette vapeur qui s'est chargée d'huiles essentielles, est condensée dans un serpentín refroidi par un courant froid, un séparateur ou essencier recueille l'eau et l'huile et permet de retirer cette dernière par différence de densité **(Viaud, 1993)**.

- **Evolution du procédé général pour un gain de temps et d'énergie**

- a- Extraction à la vapeur directe:**

La distillation à la vapeur directe, saturée ou surchauffée, souvent à des pressions supérieures à l'atmosphérique, est identique à la précédente, sans eau dans le fond de l'alambic, la vapeur étant introduite au-dessous de la charge végétale (ou en dessus dans le système d'hydrodiffusion). Technique la plus utilisée actuellement, elle évite le contact prolongé du végétal avec l'eau en ébullition et la formation de certains artefacts **(Peyron, 1992; Garnero, 1996)**.

- b- Turbo distillation:**

Un broyeur en phase humide broie les végétaux en milieu aqueux ce qui accélère la distillation et permet la récupération des fractions les plus volatiles.

- c- Hydrodistillation par micro-ondes:**

La matière végétal est entraîné a un micro-ondes, cette méthode réduit la durée de distillation et augmente le rendement **(Chemat et al., 2004)**.

D'une façon générale, l'hydrodistillation, de même que l'entraînement à la vapeur, engendrent des réactions d'isomérisation, de saponification ou de polymérisation. Par ailleurs, le temps de distillation affecte la composition de l'huile essentielle dans la mesure où l'hydrodiffusion des composés volatils présents dans les tissus végétaux à travers les parois cellulaires constitue l'étape limitante du processus. Le mélange huile essentielle-eau est recueilli par un col de cygne et refroidi dans un condenseur : la séparation se fait le plus souvent par simple décantation dans un vase florentin. **(Chemat, 2004)**

### **I.2.3. Extraction par expression:**



C'est une technique simple où le matériel végétal est pressé mécaniquement à froid pour extraire son huile essentielle. Cette méthode est essentiellement utilisée pour recueillir les huiles essentielles des épicarpes frais des Citrus (citrons, oranges, mandarines et pamplemousses). Dans l'industrie, les zestes sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices est récupéré par expression manuelle ou à l'aide de machines qui rompent les poches par expression et recueillent directement l'huile essentielle (**Bruneton, 1999**); ou encore après scarifications mécaniques et entraînement de l'huile essentielle par un courant d'eau. L'essence est séparée par décantation (**Paris et Hurabielle, 1981**).

#### **I.2.4. Extraction par enfleurage:**

C'est une extraction des essences des fleurs par contact avec une matière grasse (**Pibiri, 2006**).

- **L'enfleurage à froid**

Ce processus d'extraction, n'est pas trop utilisé, est réservé aux huiles florales de très grande qualité. Les senteurs particulièrement délicates peuvent également être capturées par enfleurage dans de la graisse froide. Pour ce faire, le mieux est de suspendre simplement les plantes dans un linge immergé dans de l'huile froide et de changer celui-ci après 12 à 24 heures. (**Bouhadouda, 2016**)

Pour pouvoir utiliser la fragrance à la fin, il convient de la délayer de la graisse avec de l'alcool puis de distiller finalement cet alcool selon ses besoins afin de concentrer davantage la senteur.

L'enfleurage constitue en quelque sorte la part royale dans le domaine de la confection de parfums, car il permet également de préserver des senteurs particulièrement délicates dans leur haute qualité et leur pureté. La macération dans l'alcool est sensiblement plus simple et moins dispendieuse ; toutefois, cette méthode n'est en rien comparable à l'extraction des senteurs par enfleurage au niveau de la qualité (**Möller, 2008**).

- **L'enfleurage à chaud**

Alternativement à la macération, il est également possible de procéder par l'enfleurage à chaud dans la graisse. Pour cela, il convient de chauffer une graisse animale clarifiée (à défaut de la vaseline ou de la paraffine, substances plus modernes) dans une chaudière en cuivre à 60°C. Les plantes y sont incorporées et détremées pendant 12 à 24 heures. Afin d'obtenir un résultat de qualité, il faut pressurer les plantes et remplir de nouveau la chaudière. Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour assurer le passage d'un maximum d'arômes dans la graisse.

Ensuite une opération de filtration est nécessaire pour séparer la graisse des fleurs. Une pâte parfumée appelée « pommade » qui va être traitée avec la même technique d'extraction que pour un enfleurage à froid (Möller, 2008).

### **I.2.5. Extraction avec des solvants:**

Utilisée pour les fleurs dont les molécules sont trop fragiles (Pibiri, 2006), et pour les composés non entraînés par la vapeur d'eau.

Il faut mentionner que les solvants organiques utilisés sont très dangereux aussi bien pour le manipulateur que pour celui qui absorbe les produits ainsi obtenus.

- Extraction par le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>):

L'extraction par le CO<sub>2</sub> est une technique qui permet d'obtenir à partir du matériel végétal des extraits volatils dépourvus de toute trace de solvant (Naouel, 2015).

### **I.3. Généralité structurale :**

La structure moléculaire des huiles essentielles est très complexe. Les composants des huiles essentielles sont groupés en plusieurs familles biochimiques. L'effet thérapeutique de ces huiles se varie d'une à une autre, et l'action de chacune d'elles ne peut pas se résumer aux caractéristiques d'un seul de ses composants.

Les huiles essentielles sont classées principalement dans deux groupes de composés odorants caractérisés par des origines biogénétiques spécifiques, selon la voie métabolique (nombre de carbone), il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques (dérivés du phénylpropane tels que esters, phénols, aldéhydes etc... (Bruneton, 2009).

#### **I.3.1 Terpenoïdes:**

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils dont la masse moléculaire est relativement faible (mono et sesquiterpènes). (Bruneton, 2009)

##### **➤ Monoterpènes**

C'est la simple série des terpènes, les monoterpènes sont issus du couplage de deux unités isopréniques:

- Une structure régulière : ce sont les éléments habituels des huiles essentielles.

- *Une structure irrégulière* : qui participe à la formation des pyréthrine et à la composition de certaines huiles essentielles (exp: chez la famille des astéracées).

La plupart des monoterpènes existe en état libre. (**Krammer et al., 1991**). Ce composé c'est un couplage tête à queue de deux unités en C<sub>5</sub> en *diphosphate de géranyle (GPP)* et qui peut être :

- **Carbures**: peuvent être de structure acyclique, monocyclique ou bicyclique :
  - Acyclique: ex : Mycènes, ocimène, etc.
  - Monocyclique: ex : terpinènes, p-cimène, phellandrènes, etc.
  - Bicyclique: ex : pinènes, camphène, sabinène, etc.

Ex : Huile essentielle de térébenthine: contient alpha-pinène et camphène.

- **Alcools**:
  - Acyclique: ex: geraniol, linalol, citronellol, lavandulol, nerol, etc.
  - Monocyclique: ex: menthol, a-terpineol, carveol.
  - Bicyclique: ex: borneol, fenchol, chrysanthenol, thuyon-3-ol, etc.

Ex: Huile essentielle de coriandre : contient linalol.

- **Aldehydes**:
  - Acyclique: ex : geranial, neral, citronellal, etc.

Ex : Huile essentielle de citronnelle: contient citral et citrannal.

- **Cétones**:
  - Acyclique:ex : tagétone, etc.
  - Monocyclique: ex: menthones, carvone, pulegone, piperitone, etc.
  - Bicyclique: ex: camphor, fenchone, thuyone, ombellulone, etc.

Ex: Huile essentielle de sauge: contient thuyone.

- **Esters**:
  - Acyclique: linalyl acetate or propionate, citronellyl acetate, etc.
  - Monocyclique: menthyl or a-terpinyl acetate, etc.
  - Bicyclique: isobornyl acetate, etc.

Ex: Huile essentielle de menthe bergamote : contient acétate de linalyle.

- **Ethers**: ex: 1,8-cineole, menthofurane, etc.

Ex : Huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* : contient « eucalyptol ».

- **Peroxydes**: ex: ascaridole, etc.

Ex : Huile essentielle de chénopode : contient « ascaridol ».

- **Phénols:** ex: thymol, carvacrol, etc.

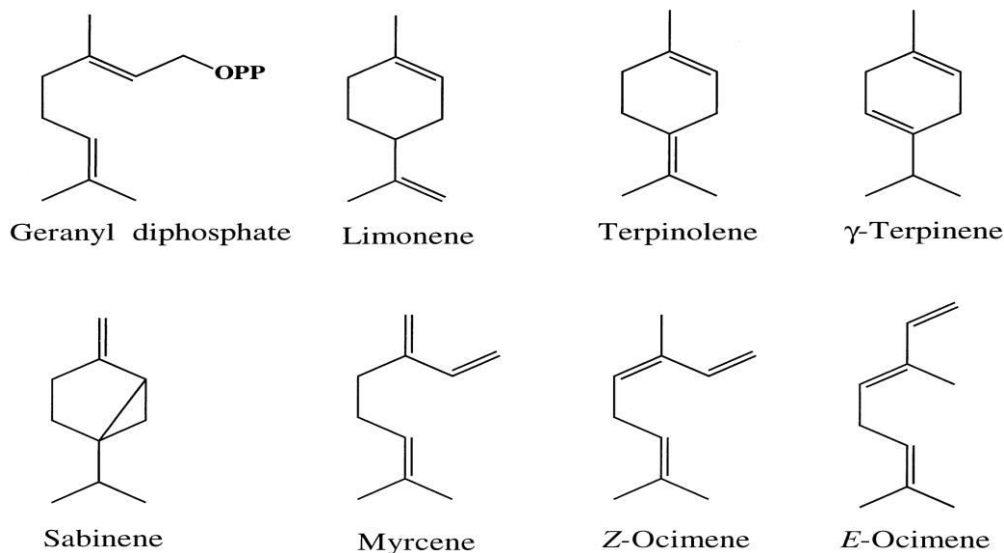
Ex : Huile essentielle de thym: contient « thymol ». (Georges Sens-Olive, 1979)

➤ **Sesquiterpènes:**

Un grand nombre des sesquiterpènes sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs. Depuis l'isolement du cadinène et du caryophyllène par Wallach à la fin du **XIX<sup>e</sup> siècle** la structure de sesquiterpène (**farnésol, 1913**), il existe plus que 100 squelettes différents.

Cette diversité est due aux potentialités réactionnelles de leur précurseur commun qui est le FPP (*diphosphate de farnésyl*), qui est le résultat d'addition d'une molécule de l'IPP (*diphosphate d'isopentényle*) sur GPP (*diphosphate de géranyle*), et aussi la variabilité dans la structure de la cyclisation intramoléculaire additionnelle. (Bakkali, 2008)

Biologiquement, bon nombre de structure sesquiterpéniques sont phytoalexine (*Solanaceae*) d'autres joue le rôle d'un facteur anti nutritifs (Warbuganal) et y on a qui attirent les insectes (germacréne D. (+)- $\alpha$ -copaène) et peuvent être aussi mycotoxine. (Bruneton, 2009)



Parmi les plantes les plus riches en sesquiterpènes on a la valériane (*Valeriana officinalis* L.) qui a une teneur en sesquiterpène égale à 0.10% exprimé en en acide valérianique. (Pharmacopée européenne, 2008)

### I.3.2. Les composés aromatiques dérivés de phénylpropane:

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C6-C3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente

Les phénylpropanoïdes ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (**Paris, 1981**).

- **Aldéhyde:** « cinnamaldéhyde », ex : huile essentielle de cannelle
- **Alcool:** « cinnamic alcohol »
- **Phénols:** « chavicol », « eugénol », ex: huile essentielle de girofle (eugénol)
- **Dérivés méthoxy:** anéthole, élémicine, estragole, méthyleugénols, ex : huile essentielle de fenouil (anéthol)
- **Composés de méthylène dioxy:** apiol, myristicine, safrole, ex: huile essentielle de persil (apiol). (**Lakhdar, 2015**)

### I.3.3. Composés d'origines diverses :

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation : carbures, acides et lactones (**Teisseire, 1991**). Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras et de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares (**Bruneton, 1999**).

### I.4. Répartition et localisation

Les huiles essentielles n'existent que chez les végétaux supérieurs: il y aurait, selon Lawrence, 17500 espèces aromatiques. Les plantes qui contiennent ces composées font partie de la famille des: Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae, Zingiberaceae, etc...

Ces substances sont stockées dans plusieurs organes tels que les fleurs et feuilles. Et rarement dans, écorces (cannelier), bois (les roses), racines (vétiver), rhizomes (curcuma, gingembre), fruits (toutes les épices), graines (muscade).

La composition chimique des huiles essentielles se varie d'une espèce à une autre, et d'un organe à un autre d'une même espèce.

Quantitativement, la teneur en H.E sont faibles, assez souvent inférieures à 10ml/kg. . (Bruneton, 2009).

### **I.5. Propriétés pharmacologiques et mécanisme et site d'action:**

#### **I.5.1. Mécanisme et site d'action des H.E.**

Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des huiles essentielles sont:

- L'altération de la paroi cellulaire
- La dégradation de la membrane cytoplasmique
- L'altération des protéines membranaires
- La fuite du contenu cellulaire
- Coagulation du cytoplasme
- L'épuisement de la force de mouvement des protons (Goetz et Ghedira, 2012)

Une caractéristique importante des huiles essentielles et de leurs constituants est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de s'insérer dans les lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries perturbant les structure et les rendant plus perméables. La fuite des ions et autres constituants de la cellule peut alors se produire.

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques.

#### **I.5.2. Propriété anti microbienne**

##### **- Antibactériennes :**

Les molécules aromatiques possédant l'activité antibactérienne la plus importante sont les phénols contenus par exemple dans l'huile essentielle de clou de girofle.

##### **- Antivirales :**

Les virus sont assez sensibles aux huiles essentielles à phénol et à monoterpinol. Plus d'une dizaine d'huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales. Nous pouvons citer l'huile essentielle de *Ravintsara*, l'huile essentielle de Bois de Hô, ou l'huile essentielle de Cannelle de Ceylan. (Baudoux, 2006)

##### **- Antifongiques :**

Les phénols sont les molécules aromatiques qui ont une activité antifongique exemple contre les dermatophytes. Dans le domaine agroalimentaire, les huiles essentielles sont employées

comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes. (**Zambonelli et al., 2004**)

- **Antiparasitaires :**

Les molécules aromatiques possédant des phénols ont une action puissante contre les parasites. Le thym à linalol, la sarriette des montagnes sont d'excellentes huiles essentielles antiparasitaires.

- **Antiseptiques :**

Les propriétés antiseptiques et désinfectantes contre les maladies infectieuses d'Origine bactérienne exemple contre les bactéries endocanalaies, sont souvent retrouvées dans les huiles essentielles possédant des fonctions aldéhydes ou des terpènes comme l'huile essentielle (**Pellecuer, 1980**).

### **I.5.2 Propriété anti-inflammatoires**

Les huiles essentielles possédant des aldéhydes ont des propriétés actives contre l'inflammation.

D'autres applications médicales ont fait l'objet d'études. Les travaux réalisés, ont prouvé la capacité de l'huile essentielle d'*Ocimum canum* à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol. Ceux de **Monti (2002)** ont montré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'œstradiol. Des travaux tentent également d'analyser les effets des huiles essentielles sur le comportement (**Umezu, 1999**) ou d'évaluer la possibilité de les utiliser dans la lutte contre l'addiction de certaines drogues, comme la nicotine (**Zaho, 2005**).

Traditionnellement, les huiles essentielles sont utilisées dans l'industrie de la parfumerie, de la cosmétique et de la savonnerie. On les utilise aussi dans la fabrication des adhésifs (colle, scotch ...), et celle de la nourriture pour animaux, dans l'industrie automobile, dans la préparation des sprays insecticides. L'homéopathie et l'aromathérapie sont des exemples courants d'usage d'huiles essentielles en médecine douce, et leur popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années.

### **I.5.3. Propriétés anti oxydante:**

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques, ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. La capacité antioxydante des huiles essentielles est étroitement liée à tout le contenu phénol (**Yanishlieva et al., 1999**).

**Tableau 1:** Classement et activité biologique de molécules aromatiques selon leur fonction chimique (Pibiri, 2006).

<b>Composés aromatique</b>	<b>Exemples</b>	<b>Propriétés</b>
<i>Phénols</i>	Eugénol	Stimulantes, Toniques Antiseptiques Bactéricides Fongicides, Anti-virale, Antiparasitaires Irritantes
<i>Alcools terpénique</i>	Citronellol-terpineol, terpinen-4-ol, linalool	Anti-inflammatoires, Antiseptiques, Bactéricides, Fongicides, Anti-virale, Neurotoniques Ils agissent en dénaturant les protéines, comme agents de déshydratation
<i>Aldéhydes Terpéniques</i>		Antifongiques, Sporicidas, Toxicité liée à la présence du groupe aldéhyde Insecticide
<i>Ether-oxides, Péroxyde</i>	Cinéol, ascaridol	Antibactériens, Antifongiques, Insecticides L'ascaridol est fortement réactif et toxique (par la liaison –O-O-)
<i>Cétones</i>	Carvone	Calmantes, Antivirales, Antifongiques, Neurotoxiques Antiépileptique
<i>Hydrocarbures aliphatiques, sesquiterpènes</i>	Limonène	Fongistatique, Bactériostatique, Insecticides, Nématicide, herbicide



### II.1. Définition:

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside.

Une définition purement chimique des phénols est toutefois insuffisante pour caractériser les composés phénoliques chez les végétaux: elle inclurait des métabolites secondaires possédant ces éléments structuraux alors même qu'ils appartiennent manifestement à des groupes photochimiques bien différenciés.

C'est ainsi que de très nombreux alcaloïdes (boldine, morphine, etc...) et d'assez nombreux terpènes (thymol, gossypol, carnosol) possèdent dans leur structure, noyau benzénique et hydroxyle phénolique, il est donc nécessaire de faire intervenir un critère biosynthétique pour mieux cerner les limites du groupe. **(Bruneton, 2009)**.

Leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les tissus et les stades physiologiques. **(Ribereu-Gayon, 1968)**

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des épidémiologistes, des industriels, de l'agro-alimentaire et des consommateurs. **(Proestos et al., 2006)**

### II.2. Origine:

Les polyphénols sont des alcools aromatiques qui proviennent des végétaux. Ils sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les phénols simples, déchets du métabolisme végétal, sont assemblés en polyphénols comme la lignine.

Les composés phénoliques définissent un ensemble de substances que l'on a appelées pendant longtemps les matières tanniques, d'une façon générale et imprécise parce qu'on ne connaissait pas, avec suffisamment de précision, la nature de ces substances.

Il y a quatre principales familles de composés phénoliques: les acides phénols, les flavones, les anthocyanes, les tanins **(Bruneton, 1987; 1999)**.

### II.3. Généralités structurales:

Une classification de ces substances a été proposée par **Harborne en 1980**. On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre

d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base. Deux principales classes sont largement répandues:

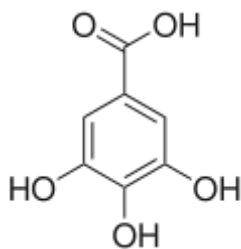
- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques),
- Les flavonoïdes.
- Les tanins et lignines
- Plus rares les coumarines, les stilbènes

### II.3.1. Les acides phénoliques:

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes: Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique.

- **Les dérivés de l'acide hydrobenzoïque: C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>**

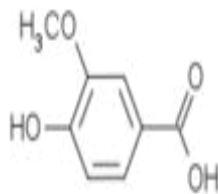
Ce sont des composés d'un squelette à sept carbones. Ils sont principalement représenté par l'acide gallique qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatchine. (Huglin et al., 1998).



**Acide gallique**

- **Les dérivés de l'acides hydroxycinnamique: C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>**

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique. Les composés les plus fréquents sont l'acide p- coumarique, l'acide t-fertarique, etc... (Goetz, 1999).



**Acide vanillique**

### II.3.2. Flavonoïdes:

Flavonoïdes (du latin *flavus* = jaune) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C. **(Grotewold, 2006).**

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines.

- **Flavanones :**

Ils sont caractérisés par l'absence de la double liaison entre C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> et par la présence d'un centre de chiralité en C<sub>2</sub> **(Afanaseva, 2001; Thompsen, 1984).**

Les agrumes constituent la principale source alimentaire de flavanones. Les principaux aglycones sont l'ériodictyol dans le citron, la naringénine dans le pamplemousse et l'hespéridine dans l'orange. **(Murota, 2004)**

- **Les flavonols:**

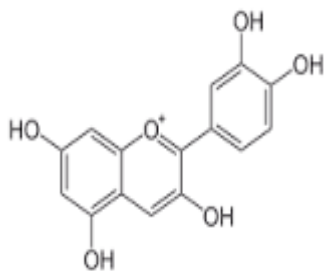
Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double-liaison en C2-C3. Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. **(Korkina, 1997)**

Leurs principaux représentants sont la quercétine, la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons, le poireau, le thé, etc. **(Kang, 2005)**

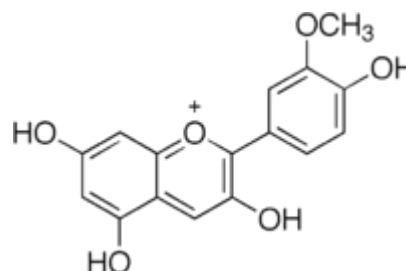
- **L'anthocyanidines:**

Ce sont des pigments responsables de la couleur rouge, principalement sous formes de glycosides. Leur structure est basée par un noyau « flavone » généralement glycosylé en

position C-3, parmi les molécules les plus connues on a: Cyanidine, malvidine, et péonidine etc.. (Escandar, 1991).



Cyanidine



Péonidine

### II.3.3. Les tanins:

Le terme « tanin » regroupe un grand nombre de molécules qui par définition sont capables de former des liaisons stables avec les protéines (Bate-Smith, 1965).

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles.

- **Tanins hydrolysables:**

Ils sont constitués par une molécule de sucre (le glucose le plus souvent) estérifiée par l'acide gallique ou un de ses dérivés (acide ellagique, chébulique ou valonique). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.

- **Tanins condensés:**

Sont des polymères de dérivés de résidus flavonols liés par des liens C-C, mais de nombreuses autres combinaisons existent) ils sont produits par la plupart des végétaux terrestres. (Rawel, 2006)

## II.4. Propriétés thérapeutiques des polyphénols et mécanisme d'action

### II.4.1. Mécanisme d'action:

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être liés à leur relative toxicité envers les microorganismes (Scalbert, 1991; Cowan, 1999).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, citons par exemple:

- L'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique due à l'intercalation des polyphénols dans les phospholipides membranaires (Daglia, 2012).

- L'inhibition de la synthèse d'acide nucléique (**Hilliard et al., 1995; Zhang et al., 2009**).
- L'inhibition du métabolisme énergétique microbien (**Haraguchi et al., 1998; Daglia, 2012**).
- Séquestration des substrats requis pour la croissance microbienne (**Milane, 2004; Daglia, 2012**)

#### **II.4.2. Effet anti-inflammatoire:**

De nombreuses études ont prouvé que les flavonoïdes déploient leurs activités pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires, par l'inhibition d'importantes enzymes de régulation. En effet, certains flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la production des prostaglandines, des molécules pro inflammatoires très actives.

Cet effet serait dû à la réduction du métabolisme de l'acide arachidonique par l'inhibition de la lipooxygénase, de la cyclooxygénase et de la phospholipase A2 (**Manthey et al., 2000**).

La quercétine et mycétine a une forte concentration inhibent la cyclooxygénase (**Kim et al., 1996**).

#### **II.4.3. Effet anti-acide.**

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques (**Di Carlo et al., 1999**)

D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés anti-ulcère de la quercétine, la naringénine, la rutine et le kaempférol, et la production de PAF (*Platelet Activating Factor*) qui est un agent ulcérogène potentiel. (**Izzo, 1996**).

#### **II.4.4 Effet anti-cancer**

Présente dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale selon **Bracke et ses collaborateurs (1991)**.

Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde à inactiver l'action de la P-glycoprotéine (protéine qui donne une résistance au médicament) et laisse le médicament agir. (**Jodoin et al., 2002**)

Les flavonoïdes ont montré des effets protecteurs contre les cancers de la prostate, du côlon et du poumon. (**Duthie et al., 2000**)

En effet, les polyphénols précisément les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase.

#### **II.4.5 Activité anti bactérienne**

L'effet antimicrobien des tanins sur différentes bactéries, virus et champignons (**Hatano et al., 1989**). L'extrait méthanolique a une bonne activité anti bactérienne et anti fongique. (**Bolou et al., 2011**).

### III.1. *Teucrium polium* L.:

#### III.1.1. Généralité sur la famille des Lamiacées :

La famille lamiacées ex Labiées du latin: *Labia* = *levre*, qui veut dire les fleurs ont forme de deux lèvres. (Naghbi et al., 2005)

Cette famille renferme de très nombreuses plantes à essence. Environ 3200 espèces dans le monde (réparties dans plus de 200 genres).

Les espèces appartenant à cette famille possèdent des caractéristiques botaniques particulières.

Ce sont des plantes herbacées ou des sous arbrisseaux, tige généralement quadrangulaire, feuilles entières, opposées et décussées, fleurs présentant un plan de symétrie bilatéral (1 ou 2 lèvres) ou quasiment radial (4 lobes presque égaux), calice à 2 lèvres ou à plusieurs lobes égaux et aigus, étamines insérées sur le tube de la corolle, au nombre de 2 ou 4 (dans ce dernier cas en 2 paires inégales), 2 carpelles soudés formant un ovaire supère; style bifide, plantes souvent aromatiques, les feuilles contenant des glandes qui renferment des huiles essentielles.

- Inflorescences groupées autour de l'axe et dans un même plan, n'entourant pas complètement la tige (Disposition en faux-verticilles).

Famille très importante dans la flore de l'Algérie. Certains genres sont de détermination délicate en raison de la variabilité extrême des espèces (Quezel et Santa, 1963).

#### III.1.2. Le genre *Teucrium*:

Nom générique des germandrées désignant en Latin *teucrium* en grec *teukpion* troie, ou de *teucros*, prince troyen qui aurait découvert les propriétés médicinales de la plantes (Couplan, 2006).

Le genre *Teucrium*, les germandrées, regroupe environ 260 espèces de plantes herbacées ou de sous-arbrisseaux de la famille des Lamiacées. On les retrouve un peu partout à travers le monde, mais elles sont particulièrement nombreuses dans le bassin méditerranéen.

Nous pouvons citer quelques exemples de quelques espèces appartenant à ce genre: *Teucrium chamaedrys* L., *Teucrium cubense* Jacq., *Teucrium veronicoïdes* Maxim., *Teucrium scorodonia* L., *Teucrium flavum* L., *Teucrium fruticans*, *Teucrium scordium* L. (Germandrée

d'eau) *Teucrium marum*, *Teucrium polium* L., *Teucrium scordium* L. subsp *Teucrium polium* subsp. *bilion*, *Teucrium polium* subsp *capitatum*, etc. (Harborne, 1986; Pistrick, 2002).

### III.1.3. Description de *Teucrium polium* L.:

C'est une plante de 10 à 35 cm, vivace à tiges robustes, longuement ligneuses, dressées ou redressées, rameuses, à rameaux couverts de poils cotonneux. Les fleurs blanches, rarement purpurines, s'épanouissent depuis le mois de mai jusqu'au mois d'août.

Les feuilles, blanches-cotonneuses sur les deux faces, sont étroites ou ovales- allongées, crénelées dans leur partie supérieure et deviennent enroulées en dessous par leurs bords. Les inflorescences, d'aspect blanc, sont serrées, globuleuses ou ovoïdes d'au moins un centimètre de diamètre. (Bonnier et Douin, 1990)

Le calice, couvert de poils courts et cotonneux, est à 5 dents inégales dont la supérieure est plus grande et obtuse au sommet, les inférieures aiguës; ces dents ont environ le tiers de la longueur du reste du calice.

La corolle a des lobes obtus et ovales, l'inférieur plus grand; les lobes supérieurs sont poilus. Les étamines ne sont pas enroulées sur elles-mêmes après la floraison. Les 4 parties du fruit mûr sont brunes et ornées en réseau à leur surface. La plante exhale une odeur forte, aromatique, agréable. (Quezel et Santa, 1963)

### II.1.4 Position systématique: (Autore et al., 1984)

**Règne:** *Plantae*

**Embranchement:** Spermatophytes

**Classe:** *Angiospermes*

**Sous classe:** *Asteridae*

**Ordre:** *Lamiales*

**Famille:** *Lamiacées*

**Genre:** *Teucrium*

**Espèce:** *Teucrium polium* L.



**Photo 1: *Teucrium polium* L.**





**Partie végétative**



**La fleur et la tige**

**Photo 2: Aspect morphologique de *Teucrium polium* L. (Site 1)**

### III.1.5 Noms vernaculaire:

- **En français:** Germandrée blanc-grisâtre, Germandrée tomenteuse, Germandrée polium, Polio de montagnes (**Rasekh et a., 2005**)
- **En arabe:** jaada; gataba et khayatit lajrah (**Bonnier, 1990**).

### III.1.6- Répartition et écologie:

Le genre *Teucrium* comprend plus de 300 espèces généralement aromatiques poussant à l'état spontané dans diverses régions du globe. Il est largement présent dans le bassin méditerranéen et plus particulièrement en Algérie où sont recensées respectivement 21 espèces. *Teucrium polium* L. est une plante à fleurs, très abondante dans le bassin méditerranéen (l'Europe, nord de l'Afrique et nord-ouest d'Asie). (**Andary, 1988**)

*Teucrium polium* L. se développe habituellement dans les régions appartenant aux bioclimats arides et semi-arides; il aime le soleil et un sol bien drainé lumière. Il pousse sur coteaux, les sables et dans les lieux arides. (**Esmail, 2010**).

### II.1.7. Utilisation thérapeutique:

Les plantes médicinales sont considérées comme une source importante de nouvelles substances chimiques qui ont un effet thérapeutique important), dans les dernières années il y a eu un intérêt croissant pour l'étude de ces plantes. (**Belmekki, 2013**)

En médecine traditionnelle africaine, cette espèce est utilisée dans les périodes de stress, car il permet de se relaxer, de se détendre, d'être serein et plein d'énergie. Elle permet la

relaxation des muscles en augmentant leur force, la diminution de l'anxiété et la lutte contre la fatigue et l'agressivité.

De plus, elle favorise le sommeil et permet également de stimuler la mémoire, d'augmenter sa concentration et sa lucidité. (**Lagnika, 2005**)

Actuellement les travaux de recherches scientifiques confirment le bien-fondé de ces notions populaires découlant d'un pur empirisme. Et ainsi le remède de « grand-mère » devient un traitement sérieux, Le *Teucrium polium* (L.) est utilisé depuis 2000 d'année dans la médecine traditionnelle (**Mahmoudi, 2013**) étayé par des résultats expérimentaux.

Selon **Muhammed (2011)**, L'infusé de la partie aérienne de *Teucrium polium* (L.) est utilisé pour son effets: antiinflammatoire; contre la jaunisse, anti anorexie, contre les coliques spasmodique et gastrique, et elle a une activité anti diabétique (**Shahraki, 2007**), anti oxydante (**Hasani, 2007**), anti spasmodique, anti inflammatoire, et anti bacterienne (**Esmacil, 2010**).

### **III.2. *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Hook.:**

#### **III.2.1. Généralité sur famille des Apiacées:**

Famille très importante dans la Flore algérienne où elle est représentée par 55 genres. La détermination des espèces appartenant à cette famille est délicate et doit toujours porter sur des échantillons complets, présentant en particulier des fruits mûrs (**Couplan, 2009**). Arbustes, plantes sous-frutescentes ou herbacées, très variables, à feuilles en général très divisées. Inflorescences ombelliformes munies à leur base de bractées souvent très caduques (*involucre*), simples ou le plus souvent composées d'ombellules munies (**Quezel et Santa, 1963**)

- **Appareil végétatif:** ce sont essentiellement des herbes annuelles comme le cerfeuil, bisannuelles comme la carotte ou le plus souvent vivaces (**Guinard, 1980**).
- **L'inflorescence ou ombelle:** elle définit la famille. L'ombelle est constituée par des pédoncules floraux ou rayons, divergeant sensiblement d'un même point, et dont les fleurs s'épanouissent toutes à un même niveau;
- **La Fleur:** fleurs blanches ou, plus rarement, Jaunâtre, verdâtre, ou rosées. Leur disposition, en une inflorescence relativement condensé, explique: qu'elles soient toujours de dimension réduite; fleurs de type (5 Sépales, 5 Etamines, Ovaire infère (formé de 2 carpelles, 2 styles).

- **La feuille:** les feuilles sont en général très divisées (**Quezel et Santa, 1963**).
- **L'ovaire:** porte deux styles (dans chaque loge se trouve un ovule), soudés à la base (**De Wit, 1965**)
- **Le fruit:** les fruits sont souvent cannelés et contiennent des substances oléagineuse et odorantes, constituées par diakène et se décomposant en ses 2 parties (méricarpe). (**Quezel et Santa, 1963; De Wit, 1965**)

### III.2.2. Le genre *Pituranthos*:

Le genre *Pituranthos* appelé aussi *Deverra* est représenté par plus de 20 espèces (**Négre, 1962**). Dont le potentiel floristique algérien de ce genre (nommé «Guezzah») comporte quatre espèce qui se ressemblent beaucoup dans leur aspect morphologique d'où il est difficile de distinguer ces derniers (**Ozenda, 1958; Sanchez, 2002**). En effet, elles ne se distinguent les unes des autres que par la couleur des fleurs et la taille de leur pédoncule (**Marc, 2004**).

Le potentiel floristique algérien de ce genre comporte les espèces suivantes:

- *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Hook: espèce particulièrement moins présente au Sahara.
- *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur) Benth et Hook: espèce abondante dans les Aurès.
- *Pituranthos battandieri* (Coss et Dur) Benth et Hook: endémique au Sahara et l'Oranie
- *Pituranthos reboudii* (Coss et Dur) Benth et Hook.: localisé dans les pâturages arides. (**Antolovich, 2002**).

### III.2.3. Description de l'espèce *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Hook.:

Plantes vivaces, aphyllées, éphéroïdes, à tiges souvent très ramifiées. Ombelles à involucre et involucelles polyphyllées. Méricarpes ovoïdes à 6 bandelettes.

Plantes vivaces, d'un vert jaunâtre. Stigmates jaune-verdâtre. Rocailles, pâturages désertiques aphyllées, éphéroïdes, à tiges souvent très ramifiées. Ombelles à involucre et involucelles polyphyllées. Méricarpes ovoïdes à 6 bandelettes.

Tiges décombantes prostrées, robustes à ramifications divariquées longues de 10-20 cm. Souche ligneuse ramifiée émettant de nombreuses rosettes de feuilles 1- 2 fois triséquées, longues de 1-3 cm. Feuilles caulinaires supérieures linéaires basales rapidement caduques, les caulinaires nulles. Ombelles terminales et latérales courtement pédonculées, larges de 2-3 cm à 2-7 rayons (**Quezel et Santa, 1963**).

**III.2.4. Position systématique: (El Rhaffari, 2008)**

**Règne :** Plantae

**Embranchement:** *Spermatophytæ*

**Sous-embranchement:** *Angiospermae*

**Classe:** Dicotylédones

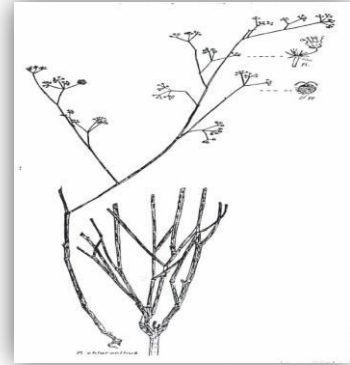
**Sous-classe:** Cornidae

**Ordre:** Araliales

**Famille:** Apiaceae (Umbelliferae)

**Genre :** *Pituranthos* ;

**Espèce:** *Pituranthos chloranthus* (Bent. & Hook.)



**Photo 3: *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Hook**

**III.2.5. Nom vernaculaire:**

- **En français:** pituranthos à balai

- **En arabe:** Guezzah

- **En berbère:** Tattayt (IUCN., 2005; SBF, 2011).



**La partie végétative**



**La fleur**

**Photo 4 : Aspect morphologique de *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Hook (Site 2)**

**III.2.5. Localisation et écologie:**

Espèce propre à l'Afrique du Nord, qu'on rencontre dans les régions arides pré désertiques et désertiques.

En Algérie, Elle est commune dans tout le sahara septentrional et occidental jusqu'à EL Golea et au Tademaït au sud (Ozenda, 1958).

### III.2.6 Utilisation thérapeutique:

Comme toute les plantes médicinales *Pituranthos chloranthus* Coss et Dur est utilisé en médecine traditionnelle pour ses intérêts: anti génotoxique, antioxydant (Neffati, 2009)

Tiges de *P. chloranthus* ont été, traditionnellement, utilisé comme de la paille pour les agriculteurs pour sécher les figues et les raisins. Cette plante a un double avantage; Tout d'abord, il a été utilisé pour son arôme et son goût distinctif qui adhèrent à sec fruits. En second lieu, elle a un effet insecticide.

En outre, les espèces *Pituranthos* sont utilisées pour le traitement de l'asthme, les rhumatismes, soins post-partum, les spasmes, les douleurs, les fièvres, le diabète, les poux, l'hépatite, troubles digestifs, urinaires infections et scorpions piqûres (Yangui, 2008).

# **Partie pratique**

### I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de *Teucrium polium* L. et *Pituranthos chloranthus* Coss. & Dur. La première espèce a été récoltée dans les régions d'El Ouenza (wilaya de Tébessa) et Meguessemia (wilaya de Guelma), tandis qu'un seul site de récolte a été retenu pour la deuxième espèce à savoir la région d'El Ouenza (wilaya de Tébessa).

La partie aérienne de *Teucrium polium* L. a été récolté au mois de février pour la saison d'avant floraison, et mai pour la saison de floraison, alors que *Pituranthos chloranthus* Coss et Dur. la récolté été faite en septembre pour la saison d'avant floraison et décembre pour les saisons de floraison.

Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, le matériel végétal de chacune des deux espèces a été broyé et conservé.

**Tableau 2** : Données géographiques des zones de récolte des espèces étudiées.

Région de récolte	Espèces	Altitude (m)	Latitude	Longitude
Oued Mellegue	<i>Teucrium polium</i> L.	597m	8°08'30.40"E	35°57'12.20"N
	<i>Pituranthos chloranthus</i> Coss. et Dur.			
Meguessemia	<i>Teucrium polium</i> L.	233m	7°46'29.88"E	36°27'18.18 "N



Figure 1 : Situation géographique des deux régions d'étude (Google earth).

## I.2. Tests phytochimiques

Le screening chimique est un ensemble de réactions physico-chimiques permettant de déterminer les principaux groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Les tests préliminaires pour la détermination des groupes chimiques majeurs ont été réalisés selon Solfo (1973) et Harborne (1989).

### I.2.1. Tests préliminaires sur l'infusé

#### 1.2.1.1. Préparation de l'infusé

10g de poudre végétale ont été introduite dans 100ml d'eau bouillante contenue dans un erlenmeyer de 250ml. Après avoir refermé l'erlenmeyer, l'ensemble est laissé infuser pendant 15 minutes. Après filtration, ajuster le filtrat à 100ml.

#### 1.2.1.2. Recherche des tanins

Les composés phénoliques ont la capacité de former des chélates colorés avec des sels de métaux lourds, cette propriété est mise à profit pour la détermination des tanins dans une drogue végétale.



Dans un tube à essai contenant 5ml d'infusé, ajouter 1ml de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1%. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence de tanins catéchiques, une coloration bleue noirâtre indique la présence de tanins galliques.

- **Différentiation des tanins condensés et tanins hydrolysables**

A chaud, en milieu chlorhydrique et en présence de formol, les tanins condensés tendent à se polymériser, et à former des macromolécules de haut poids moléculaires qui précipitent.

A 30ml de l'infusé, ajouter 15ml de réactif de Stiasny (3ml de formol à 30% 1ml d'HCl concentré), et chauffer au bain-marie à 90°C pendant 30 mn.

L'observation d'un précipité orange indique la présence de tanins catéchiques, l'absence de précipité combinée à une réaction positive avec le  $\text{FeCl}_3$  indique la présence de tanins hydrolysables.

### **1.2.1.3. Recherche des anthocyanes**

La mise en évidence des anthocyanes est basée sur leur capacité à changer de couleur en fonction du pH, cette capacité découle des propriétés physico-chimiques du cation 2-phényl-benzopyrylium :

- En milieu acide fort ( $\text{pH} < 3-4$ ), la forme cationique (ion oxonium) majoritaire est colorée en rouge, cette forme est stable.
- En milieu acide faible ( $4 < \text{pH} < 6$ ), Le cation oxonium perd successivement un puis deux protons, conduisant ainsi à une anhydrobase de couleur bleu-verte stabilisée par résonance.

A 5ml d'infusé à 10%, ajouter 5ml d'acide chlorhydrique (HCl) pur puis 5ml d'hydroxyde d'ammonium. Si la coloration de l'infusé s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, conclure à la présence d'anthocyanes.

### **1.2.1.4. Recherche des leucoanthocyanes**

Introduire dans un tube à essai 5ml de l'infusé à 10%, ajouter 5ml d'alcool chlorhydrique, mélange d'éthanol à 95 % et d'HCl pur (3:1 V/V). Chauffer au bain-marie (50°C) pendant

15mn. La présence de leucoanthocyanes se manifeste par une coloration rouge cerise ou violacée.

## **I.2.2. Tests préliminaires sur le décocté**

### **1.2.1.1. Préparation du décocté**

2g de matériel végétal sec broyé sont utilisés pour préparer une décoction avec 100ml d'eau. Le mélange est porté à ébullition pendant 30min. Après refroidissement et filtration, le volume du filtrat est ajusté à 100ml.

### **1.2.1.2. Recherche des saponosides**

La présence des saponosides est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, définit comme étant le degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées.

Dans une série de 10 tubes à essais numérotés de 1 à 10, répartir successivement 1, 2, ..., 10ml du décocté. Ajuster le volume dans chaque tube à 10ml avec de l'eau distillée.

Agiter chaque tube dans le sens de la longueur pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Laisser reposer pendant 15mn et mesurer ensuite la hauteur de la mousse dans chaque tube.

L'indice de mousse (I.M) est calculé à partir du tube numéroté (N) dans lequel la hauteur de la mousse est égale ou proche de 1cm :

$$IM = \frac{\text{Hauteur de la mousse dans le tube (N)} \times 5}{0,0N}$$

La présence de saponosides dans la plante est confirmée avec un indice IM supérieur à 100.

### **I.2.3. Tests préliminaires sur la poudre**

#### **I.2.3.1. Recherche des alcaloïdes**

Les alcaloïdes forment de précipités colorés, en milieu aqueux acide, avec certains sels de métaux lourds et divers complexes iodés (réactifs généraux des alcaloïdes).

5g de la plante séchée et broyée sont mélangés avec 50ml d'HCl à 1% puis macérés pendant 24H à température ambiante. Après filtration, ajouter au filtrat quelques gouttes de réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité orangé indique la présence d'alcaloïdes.

#### **I.2.3.2. Recherche des flavonoïdes**

Les flavonoïdes donnent une coloration jaune claire lors du passage d'un milieu acide à un milieu basique.

10g de la plante séchée et broyée sont mélangés avec 150ml d'HCl à 1% puis macérés pendant 24H à température ambiante. Après filtration, alcaliniser 10ml de filtrat avec l'hydroxyde d'ammonium. Après un repos de 3H, l'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence de flavonoïdes.

#### **I.2.3.3. Recherche des triterpènes et stérols**

Elle se fait sur une macération de 24H à 5 % dans l'éther de pétrole. L'extrait étherique est ensuite évaporé à sec et repris avec de l'anhydride acétique puis du chloroforme. Déposer au fond du tube contenant l'extrait de l'acide sulfurique concentré ( $H_2SO_4$ ). Dans le cas d'une réaction positive, il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, qui vire par la suite au gris.

#### **I.2.3.4. Recherche des quinones**

1g de poudre végétale est macéré dans 30ml d'éther éthylique pendant 24H, après filtration, on ajoute quelques gouttes de soude (NaOH) 1N. Le virage de la phase aqueuse au rouge indique la présence de quinones.

### **I.2.3.5. Recherche des anthraquinones**

1g de poudre sèche est ajouté à un mélange composé de 10ml de potasse (KOH) 0,5N et 1ml de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 5%. Faire bouillir le mélange quelques minutes, puis après refroidissement et filtration, acidifier le filtrat avec l'acide acétique et extraire la solution acide avec 10ml de benzène.

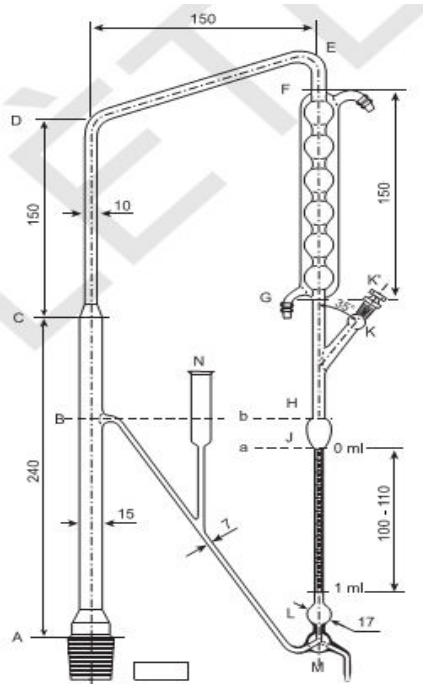
Additionner 5ml d'hydroxyde d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH) à l'extrait benzénique, après agitation, la coloration rouge au niveau de la couche alcaline indique la présence d'anthraquinones.

## **I.3. Extraction et caractérisation des huiles essentielles**

### **I.3.1. Extraction des huiles essentielles**

L'hydrodistillation ou entraînement à la vapeur d'eau est la technique de référence pour l'étude des composés volatiles d'une espèce végétale. Elle permet l'extraction des HE à partir d'une drogue fraîche ou sèche. Elle est effectuée dans un appareil spécial décrit par la Pharmacopée Européenne 6<sup>e</sup> Edt. comme comprenant :

- (a) un ballon approprié à fond rond, à col court et portant un rodage d'un diamètre intérieur de 29mm environ à l'extrémité la plus large ;
- (b) un appareil de condensation s'adaptant exactement sur le ballon, comprenant diverses parties entièrement soudées, en verre de faible dilatation thermique :



**Figure 2 : Appareil pour la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (Dimensions en millimètres) (Phar. Europ., 2007)**



**Photo 5 : Dispositif d'hydrodistillation de type Clevenger**

### **Protocole opératoire**

Avant emploi, l'appareil est nettoyé à l'acétone puis rincé à l'eau distillée afin d'éliminer toute trace de poussières et de graisses afin d'éviter la contamination de l'huile essentielle au cours de l'extraction.

L'opération consiste à introduire 100g de masse végétale séchée dans un grand ballon en verre, on y ajoutant une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements dus à l'ébullition.

Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe-ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes d'huile, ainsi, produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début de l'ébullition.

L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. Elle est récupérée et conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4-5°C).

#### **I.3.2. Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T75-112**

L'indice de réfraction d'une solution caractérise la vitesse de propagation de la lumière dans ce milieu. Plus précisément, pour une onde monochromatique de longueur d'onde  $\lambda$ , à température et pression fixées, l'indice de réfraction « n » d'un milieu est défini par le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide, notée « c » et celle mesurée dans ce milieu, notée « v » :

$$\ll v \gg : \quad n = \frac{c}{v}$$

### **Protocole opératoire**

La mesure de l'indice de réfraction a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre de type Schmidt +Haensch GmbH  $\delta$ Co serie N° 025748, avec une précision de la lecture directe des indices de réfraction situés entre 1.3000 et 1.7000.

Le réfractomètre est étalonné par mesure de l'indice de réfraction à 20°C de l'eau distillée (indice égal à 1,3330). L'échantillon est ensuite placé dans le réfractomètre, et la mesure n'est effectuée que lorsque la température de 20°C (température de référence) soit stable.



**Photo 6 : Réfractomètre**

### **1.3.3. Analyse chromatographique des huiles essentielles par CPG/SM**

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles (**Rouessac, F. & Rouessac, A., 2004**).

Dans tous les cas, un fluide appelé phase mobile parcourt un tube (colonne) ou une surface plane, constitués d'un matériau relativement poreux (éventuellement imprégné d'un liquide), c'est la phase dite stationnaire. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange à séparer, appelés généralement solutés sont inégalement retenus par celle-ci lorsqu'ils la traversent, entraînés par le fluide (ou solvant) (**Mahuzier, G. & al., 2002**).

#### **1.3.3.1. Principe de la chromatographie en phase gazeuse**

La CPG est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles de plus de 60 ans. Son développement qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême

sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent encore plus son intérêt.

Les applications sont très nombreuses dans tous les domaines et les développements de la chromatographie gazeuse à grande vitesse ou multidimensionnelle rendent cette technique toujours plus attractive (Rouessac, F. & Rouessac, A., 2004).

Cette méthode chromatographique permet de séparer des mélanges gazeux complexes par une suite continue d'équilibres s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire liquide, ou parfois solide, placée à l'intérieur d'une colonne.

La CPG ne s'adresse pas seulement aux molécules se trouvant naturellement à l'état de gaz, mais à tout composé susceptible d'être volatilisé par élévation de la température (Mahuzier, G. & al., 2002).

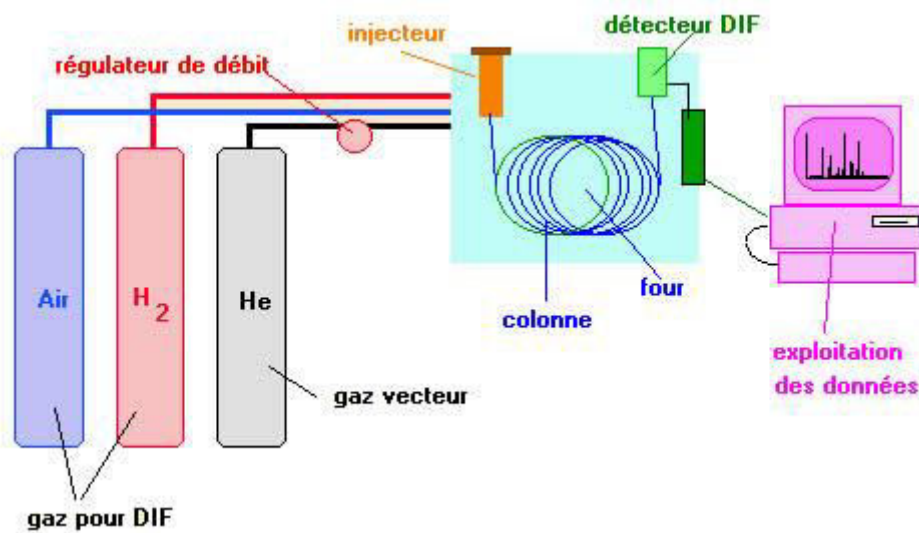


Figure 3 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG) couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID) [site 3]



### 1.3.3.2. Couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

La combinaison de la spectrométrie de masse et de la chromatographie en phase gazeuse offre de multiples possibilités analytiques. Le principe de la SM consiste à provoquer, par une méthode appropriée, l'ionisation d'une molécule et sa dissociation, éventuelle, en fragments ionisés puis à déterminer la nature et l'abondance de l'ensemble des ions formés (**Burgot, G. & Burgot, J-L., 2006**).

L'identification d'un composé par SM nécessite des travaux de séparation et de purification très longs, qui sont par le couplage à la CPG, en partie supprimés.

Le spectre de masse obtenu, montre plusieurs pics dus à l'ionisation de la substance ; des pics correspondant à des fragments  $m/z$  et à des temps de rétention donnés, alors qu'en parallèle, le chromatogramme montre un pic correspondant à une substance isolée, et qui est caractérisé par le temps de rétention.

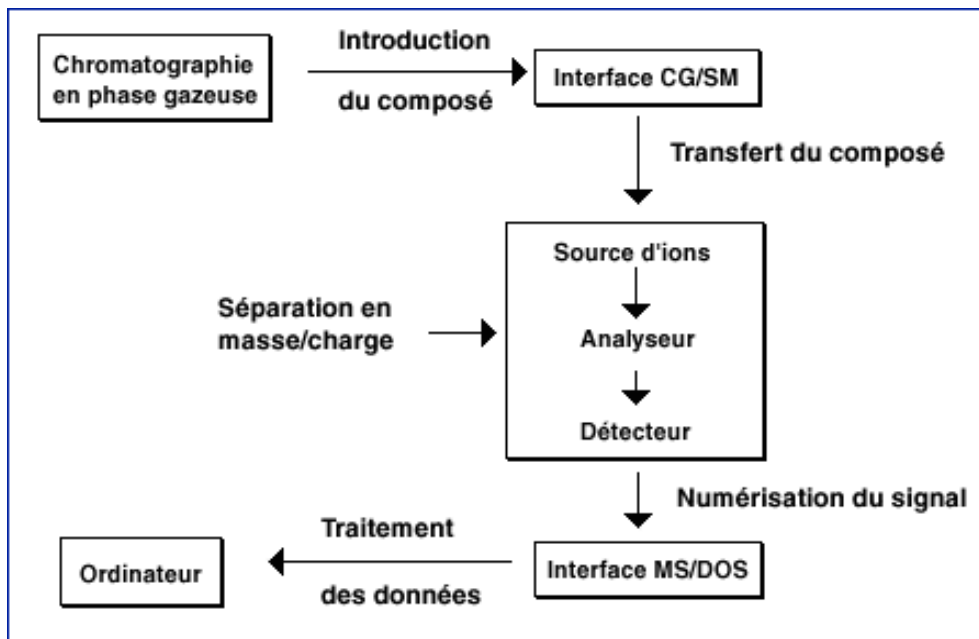


Figure 4 : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse [Site 4]

### 1.3.3.3. Protocole expérimental de l'analyse par CPG/SM des huiles essentielles

L'analyse chromatographique des huiles essentielles extraites a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse Perkin Elmer équipé d'un passeur automatique d'échantillons. La colonne utilisée est une RESTEK Rtx<sup>®</sup>-5MS (5% diphenyl, 95% dimethyl polysiloxane) de 30 mètres de longueur, 0.25mm de diamètre interne, l'épaisseur de film est de 0.25µm. Les injections ont été effectuées en mode splitless. L'hélium a été employé comme gaz vecteur à un débit de 1ml/min. Les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert ont été portées à 250 °C. La température initiale a été maintenue à 60 °C pendant 1 minute, puis augmentée de 3 °C par minute pour atteindre 200 °C et on maintient en isotherme pendant 13 minutes. Le volume injecté a été de 1 µl. Les solutions étalons et l'huile essentielle étaient diluées dans l'alcool absolu (1g/L).

Les analyses ont été réalisées en mode ionisation par impact électronique (E-I) avec une énergie d'ionisation de 70 eV en utilisant l'acquisition en mode Scan (de 40 jusqu'à 600µ).

L'identification des composés a été faite par comparaison des temps de rétention, d'une part, des échantillons, et d'autre part, des solutions standards, puis par comparaison des spectres de masse avec ceux contenus dans la librairie commerciale NIST<sup>®</sup> (*National Institute of Standards and Technology*).

Le pourcentage de chaque composé est calculé par la méthode de normalisation interne.



**Figure 5. Appareil de chromatographie en phase gazeuse**

#### **I.4. Extraction et caractérisation des composés phénoliques**

##### **I.4.1. Préparation de l'extrait méthanolique**

1g de matériel végétal broyé est macéré dans 20ml du méthanol pendant 24H. L'opération est répétée trois fois, avec renouvellement du solvant tous les 24H. Après filtration, les extraits méthanoliques sont évaporés à sec sous pression réduite à 60°C. Les résidus secs pesés sont repris par 3ml de méthanol (Seladji & al., 2014).

##### **I.4.2. Dosage des polyphénols totaux**

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins. Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 (Singleton et Rossi).

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot & Charpentier, 2006**).

### **Protocole opératoire**

Tous les extraits organiques ont été dissous dans le méthanol absolu. À 0,3ml de chaque échantillon, ont été ajoutés 1,5ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à raison de 1ml du réactif dans 10 ml d'eau distillée) et 1,2ml de la solution de bicarbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) 7,5%. Après incubation à l'obscurité pendant une heure, les absorbances ont été lues à 760nm.

La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique effectuée en parallèle.

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/g MS) (**Seladji & al., 2014**).

### **I.4.3. Dosage de flavonoïdes totaux**

La quantité des flavonoïdes a été déterminé par un procédé colorimétrique décrit par (**Zhishen J. & al., 1999**).

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Ceci s'explique par le fait que le métal (Al) prend deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Ribéreau-Gayon & al., 1972**).

### **Protocole opératoire**

1ml d'échantillon a été mélangé avec 4ml d'eau distillée. Après addition de 0,3ml d'une solution de nitrite de sodium ( $NaNO_2$ ), laisser incubé pendant 6 minutes et ajouter 0,3ml de

chlorure d'aluminium à 10% ( $\text{AlCl}_3$ ). Après une nouvelle incubation de 6 minutes, ajouter 2ml d'une solution de NaOH 1N, le volume final est ajusté à 10ml avec de l'eau distillée.

Incuber 15min, puis lire l'absorbance, par rapport à un blanc, à 510nm. Les résultats ont été exprimé par rapport a la catéchine (mg catéchine /g MS) (Laleh, K. & al., 2012).

#### **I.4.4. Dosage des tanins**

La teneur en tanins totaux est déterminé selon la méthode de Folin-Denis (Polshettiwar, S.A. & al., 2007). Le dosage colorimétrique des tanins est basé sur la mesure de la coloration bleue qui apparait suite à la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par un composé de type tanin en milieu alcalin.

#### **Protocole opératoire**

À 1ml de chaque extrait, a été ajouté 0,5ml du réactif de Folin-Denis et 1ml de la solution de bicarbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0,5%. Le volume final est ajusté à 10ml avec de l'eau distillée. Les absorbances ont été lues à 700nm.

La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide tannique effectuée en parallèle.

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide tannique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAT/g MS) (Padma, R. & al., 2013)

#### **I.5. Activités biologiques**

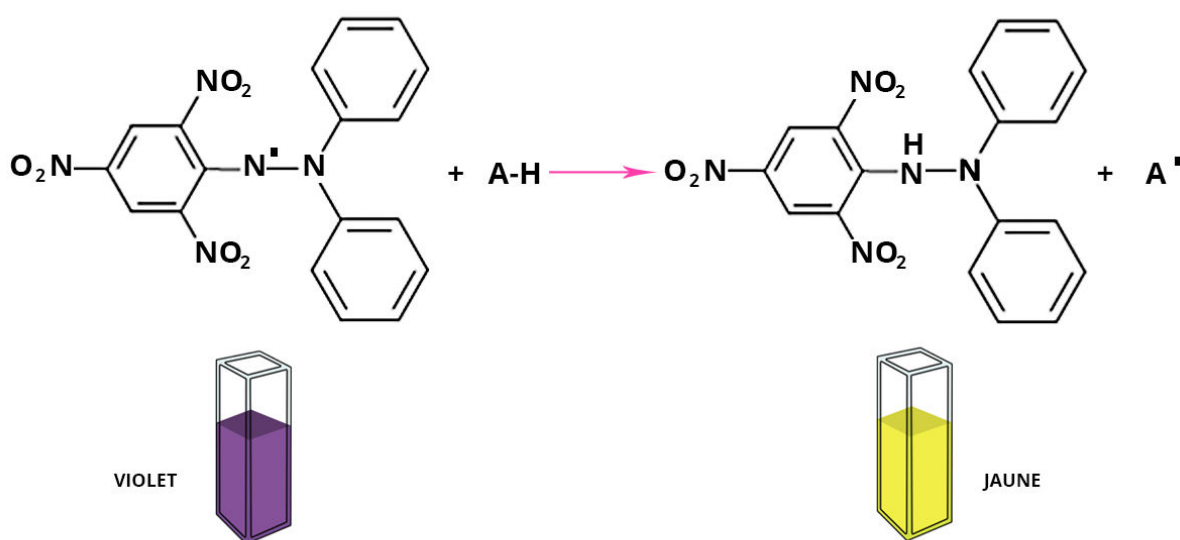
##### **I.5.1. Activité antioxydante**

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit *in vivo* ou *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capable d'inhiber la génération de radicaux.

### I.5.1.1. Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de DPPH

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le DPPH de couleur violette se réduit en DPPH-H : hydrazine non radical (2,2 Diphényl-1-picryl hydrazine) de couleur jaune (**figure 5**).

L'absorbance mesurée à 517 nm serve à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti radicalaire de l'échantillon (**Maataoui & al., 2006**).



**Figure 6. Réaction de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant [Site 5]**

#### Protocole opératoire

La capacité de piégeage du radical libre DPPH a été évaluée selon la méthode décrite par (**Boulila & al., 2015**).

1ml de chaque échantillon (huile essentielle ou extrait méthanolique) à différentes concentrations a été mélangé avec 2ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0,04 g/L.

Après 30min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY 6300) contre le méthanol comme blanc.

L'acide ascorbique a été utilisé comme standard.(ou témoin positif)

Les pourcentages d'inhibition du DPPH ont été calculés selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition DPPH} = \frac{A_0 - A_{eq}}{A_0} \times 100$$

Où  $A_{eq}$  est l'absorbance de la solution méthanolique de DPPH additionnée de l'antioxydant à l'équilibre et  $A_0$  est l'absorbance de la solution de DPPH additionnée de méthanol seul aux mêmes proportions.

La courbe exprimant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'antioxydant en microgramme par millilitre ( $\mu\text{g/ml}$ ) a permis de déduire la concentration efficace médiane (CE50) définie comme la concentration d'antioxydant nécessaire pour faire décroître la concentration initiale du DPPH de 50 % (**Hatano & al., 1988**).

#### **I.5.1.2. Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de FRAP**

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



L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

#### **Protocole opératoire**

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**. 1ml de différentes concentrations de chaque extrait (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5mg) dilué dans le méthanol est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Par la suite, 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont additionnés aux solutions précédentes. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10min.

Après centrifugation, 2,5ml du surnageant de chaque concentration sont mélangés avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml de  $\text{FeCl}_3$  0,1%.

L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY 6300). L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

Le résultat est exprimé par la concentration efficace  $\text{EC}_{50}$ , concentration de l'huile essentielle exprimée en microgramme d'huile essentielle par millilitre de mélange ( $\text{CE}_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$ ), donnant une absorbance de 0,5.

### **1.5.1.3. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium**

L'activité antioxydante totale des différents extraits est déterminée par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium selon **Pieto & al. (1999)**.

Le test est basé sur la réduction du molybdate. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/Mo) à un pH acide. On mesure la diminution de coloration du complexe molybdène en présence d'antioxydant.

Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant (**Muanda, 2009**).

#### **Protocole opératoire**

0,1ml de chaque solution est mise dans des tube à essai et mélangé avec 1ml du réactif composé d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,6M), de phosphate de potassium ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  28 mM) et de molybdate d'ammonium (Mo 4 mM). Les tubes à essai sont placés au bain-marie pendant 90 minutes à une température de  $95^\circ\text{C}$ .

L'absorbance de chaque solution est mesurée par un spectrophotomètre (JENWAY 6300), à une longueur d'onde égale à 695 nm (**Zhi-Hong Wang & al., 2009**).



L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif. Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide ascorbique/g de matière sèche (Eq. d'ac.asc./g de MS) (Ardestani, A. & Yazdanparast, R., 2007).

## **I.5.2. Activité antibactérienne**

### **I.5.2.1. Souches bactériennes testées sur les différents extraits**

Le choix des bactéries s'est porté sur sept souches fréquentes en pathologie humaine, appartenant à deux catégories différentes (Gram positif et Gram négatif) :

- Bactérie Gram négatif *Bacillus subtilis* ATCC 7033
- Bactérie Gram positif *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- Bactérie Gram négatif *Escherichia coli* ATCC 25922
- Bactérie Gram négatif *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- Bactérie Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Bactérie Gram négatif *Salmonella typhimurium* ATCC 10428
- Bactérie Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

### **I.5.2.2. Milieu de culture**

Le milieu de culture qui a été utilisé pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de nos échantillons est le Mueller-Hinton (MH) liquide pour les extraits méthanolique et solide pour les huiles essentielles.

### **I.5.2.3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques**

La sensibilité des souches bactériennes aux différents extraits a été recherchée par la méthode de diffusion sur disques (Elaiissi et al., 2011).

Des suspensions bactériennes ont été préparées dans une solution physiologique à partir de colonies jeunes (18-24H) en ajustant la turbidité à 0,5 Mc Farland. À l'aide d'un écouvillon stérile, les bactéries en suspension ont étéensemencées sur une surface gélosée sèche (gélose Mueller-Hinton liquéfiée, coulée et refroidie dans des boîtes de Pétri). Des disques stériles de papier Whatman No.3 (6mm de diamètre) ont ensuite été placés puis imprégnés de 10 µL d'huile Essentielle ou d'extrait méthanolique.

Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24H. La souche est considérée comme non sensible substance naturelle pour un diamètre inférieur à 8 mm, modérément sensible entre 8 et 14mm, sensible entre 14 et 20mm et très sensible si le diamètre est supérieur à 20mm (Nassim, D. & al., 2013).

#### **I.5.2.4. Détermination des CMI des huiles essentielles**

La mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a été réalisée par la méthode d'incorporation en milieu solide (Kempf, M. & al., 2011).

Une gamme de dilutions allant de 2,5 à 20µL/mL a été préparée en dissolvant l'huile essentielle dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). 18mL de gélose Mueller-Hinton maintenue à 45°C ont été mélangés à 2mL de chaque dilution, les mélanges ont été coulés dans des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre et laissés incuber 24H à température ambiante (Atailia, I. & al., 2015).

Des suspensions bactériennes ont été préparées dans une solution physiologique à partir de colonies jeunes (18-24H) en ajustant la turbidité à 0,5 McFarland. Un volume de 2µL de chaque suspension a été déposé sur la surface de chaque milieu incorporé et laissé sécher, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24H. (Amrouni, S. & al., 2014 ; Benslimani, A. & al., 2011).

La CMI correspond à la plus faible dilution ne présentant aucune croissance bactérienne macroscopique.

#### **I.5.2.5. Détermination des CMI des extraits**

La méthode de concentration minimale inhibitrice a été décrite selon la méthode des micro-dilutions (Irith, W. & al., 2008).

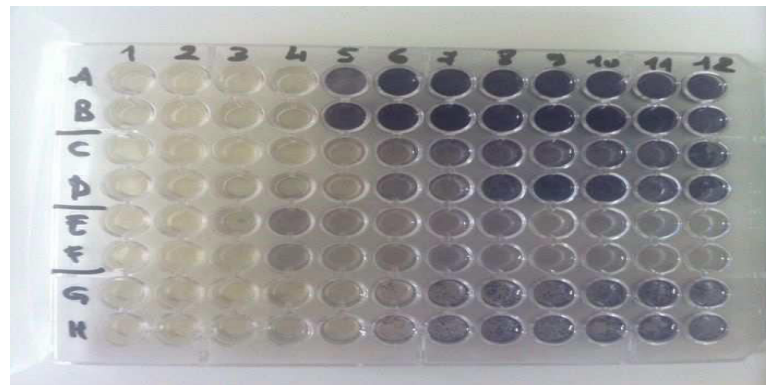
Des suspensions bactériennes de cellules bactériennes jeunes ont été préparées dans des tubes stériles qui contiennent de l'eau physiologique à une valeur correspondant à 0,5 Mc Ferland, Les suspensions bactériennes doivent être utilisées dans les 30 minutes qui suivent leur préparation, pour éviter un changement dans le nombre de cellules bactériennes.

50µl de cette suspension sont ajoutés à 5ml avec MH liquide pour obtenir un nombre de cellules bactérienne égale à  $5 \times 10^5$  unités formant colonie (UFC). Dans les puits des plaques des micro-tubes, on mélange 50µl de différentes dilutions d'extrait méthanolique de *Teucrium polium* L. 1/100 préparé dans le DMSO à 10% avec 50 µl de MH liquide inoculé.

Pour vérifier que les résultats de sensibilité sont exacts, il faut inclure au moins un organisme de contrôle avec chaque lot de déterminations de CMI. Les organismes de contrôle sont disponibles à partir de différentes collections de souches

Une incubation de 18H à une température de 37°C. On ajoute 15µl de NBT à une concentration de 2mg/ml, on laisse le tout dans l'incubateur pendant 2H à une température de 37°C.

La lecture est basée sur la coloration des puits en bleu ce qui indique la présence de colonies, on estime que dans les puits qui gardent leur colorations, la croissance bactérienne est totalement inhibée.



**Photo 7. Détermination des CMI par la méthode des microdilutions**

### I.5.3. Activité antifongique des huiles essentielles

L'activité antifongique est mesurée par la technique de dilution en tubes sur la souche de référence *Candida albicans* ATCC 10231, selon la méthode de **Giordani, R. & al. (2002)**. Le milieu de culture utilisé est le Sabouraud chloramphénicol liquide.

Après une incubation de 24H à 35°C, la densité optique est mesurée à 560nm. Les données expérimentales (D.O. mesurées) sont soumises à une analyse statistique.

La présentation graphique de l'inhibition de la croissance fongique en fonction de la concentration en huile essentielle présente un aspect hyperbolique d'équation  $y = ax / (b+x)$ . L'utilisation d'un logiciel d'ajustement permet de déterminer les paramètres a et b de l'équation. On peut assimiler cette représentation graphique de l'inhibition à une courbe de saturation enzymatique d'où l'on déduit, d'une part, la concentration minimale inhibitrice (CMI 80%) qui caractérise le taux d'activité antifongique, et d'autre part, la constante d'affinité de l'antifongique pour la levure :  $K_{\text{aff}} = 1/b$ .

Le paramètre a représentant l'inhibition maximale calculée et le paramètre b, la concentration en antifongique qui induit une inhibition calculée égale à la moitié de l'inhibition maximale calculée.

#### Protocole opératoire

Une galerie de dilutions de l'huile essentielle a été réalisée en allant de la dilution au 1/2 vers la dilution au 1/1024, les tubes stériles ont été agités entre chaque passage.

En parallèle, une quantité suffisante du milieu de culture inoculé (MCI) a été préparée de façon à avoir une absorbance de 0,150 à 600 nm contre le milieu de culture non inoculé (MI).

0,5ml d'eau physiologique stérile a été introduite dans 10 tubes stériles, auquel est ajouté 0,9ml de MCI, couvrir les tubes de papier aluminium. La galerie d'essai est réalisée en introduisant dans chacun des tubes 0,1 ml de dilution.

Après incubation au bain-marie à 35,5°C pendant 24 heures sous agitation, l'absorbance est lue à 560nm contre un blanc constitué du milieu de culture inoculé.

### II.1. Screening chimique :

L'étude phytochimique a permis de mettre en évidence divers métabolites secondaires, les résultats de tous les tests sont regroupés dans le tableau 3.

**Tableau 3:** Criblage phytochimique de *Teucrium polium* L. et *Pituranthos chloranthus* Coss et Dur.

Principe actif	Résultat					
	<i>T. polium</i>				<i>P. chloranthus</i>	
	Ouenza		Meguessemia		Avant floraison	Floraison
	Avant floraison	Floraison	Avant floraison	Floraison		
Tanins catechique	++	++	++	++	+	+
Tanins gallique	+	+	+	+	-	-
Anthocyane	-	-	-	-	-	-
Alcaloïde	+	+	+	+	-	-
Quinone	-	-	-	-	-	-
Anthraquinone	-	-	-	-	-	-
Terpene et stérol	+++	++	+++	+	+	+
Flavonoïde	+++	++	+++	++	+++	+
Saponoïde	-	-	-	-	-	-
Leuco_anthocyane	-	-	-	-	-	-

(-) Absence      (+) Présence      (++) moyennement présent      (+++) fortement présent

Le screening phytochimique montre que l'espèce de *Teucrium polium* L. est riche en tanins, alcaloïdes, terpènes et stérols, flavonoïdes.

Ces résultats concordent avec ceux des travaux antérieurs effectués sur la même espèce (**Ardesrani, 2007 ; Milan, 2012**) qui ont déterminé quantitativement des flavonoïdes et des tanins (**Kheled khodja, 2014**). Ces métabolites actifs, pouvant être à l'origine d'activités biologiques intéressantes.

Les terpènes et stérols possèdent des propriétés anti inflammatoire (**Bruneton, 20009**).

Les flavonoïdes ont un rôle anti antioxydant et anti inflammatoire (Babayi, 2013) ce qui renforce l'action des stérols et terpènes, les tanins catéchiques ont des propriétés antimicrobienne.

Selon les travaux antérieurs (Neffati, 2009) et (Yangui, 2008), le *Pituranthos chloranthus* Coss et Dur. présente des activités anti-inflammatoire, antalgique, antidiabétique, et antimicrobienne, ces activités peuvent être expliquées par la présence de métabolites secondaires représentés par les flavonoïdes, les tanins catechiques, et les terpènes et stérols.

Ces résultats rejoignent ceux des travaux menés par (Adida H, 2005 ; Karifa, 2011) sur le même genre *Pituranthos*.

L'action antidiabétique des tanins pourrait être expliquée par son action au niveau cellulaire en favorisant l'action de l'insuline (Das et al, 2011).

## II.2. Extraction et caractérisation des principes actifs :

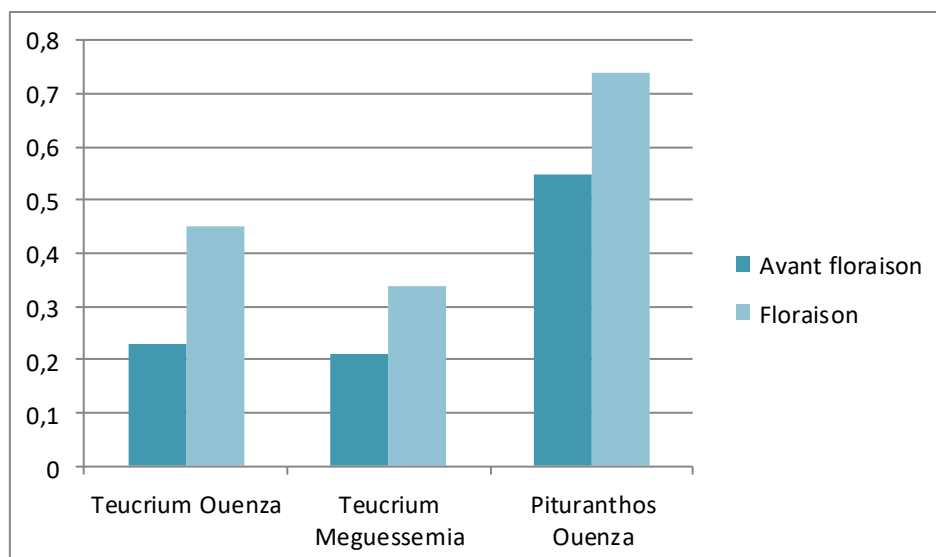
### II.2.1. Rendements en huiles essentielles et caractérisation organoleptique :

L'huile essentielle de *T. polium* est de couleur jaune claire ± foncée, celle de *P. chloranthus* est jaune claire. Les huiles des deux espèces présentent une odeur forte et agréable et sont plus légères que l'eau.

Les rendements moyens en huiles essentielles de *T. polium* et *P. chloranthus* ont été déterminé sur 4 essais. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau 4 : Rendements de l'hydrodistillation de *T. polium* et *P. chloranthus***

Espèce	Période	Site de récolte	Rendement moyen	Couleur	Odeur
<i>T. polium</i>	Avant floraison	Ouenza	0.23 ± 0.05	Jaune clair ± foncée	Forte et agréable
		Meguessemia	0.21 ± 0.05		
	Floraison	Ouenza	0.45 ± 0.043		
		Meguessemia	0.34 ± 0.045		
<i>P. chloranthus</i>	Ouenza	Avant floraison	0.55 ± 0.043	Jaune clair	Forte et agréable
		Floraison	0.74 ± 0.055		



**Figure 7. Représentation graphique des rendements en huiles essentielles**

Le rendement moyen en H.E de *Teucrium polium* L. a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne. Le rendement enregistré durant la période de floraison est de 0.45% pour le site d'Ouenza et de 0.34% pour le site de Meguessemia.

Ces valeurs obtenues paraissent plus importantes que celles enregistrées par **Kabouche et al, 2007** (0.17%) et **Belmeki et al, 2013** (0.21%) à partir de plantes prélevées respectivement au niveau de Constantine et Tlemcen.

Par ailleurs les échantillons provenant de l'Iran (**Mahmoudi et al, 2013 ; kel et al, 2015**) ont donné un rendement semblable à celui de Meguessemia. Cette différence en teneurs en H.E pourrait être attribuée aux facteurs édaphiques et climatiques.

De plus, les rendements obtenus durant la période d'avant floraison sont moindres par rapport à ceux obtenus durant la période de floraison.

Le rendement moyen en H.E de *Pituranthos chloranthus* Coss et Dur récolté dans la région de Ouenza est de 0.74% durant la période de floraison et de 0.55% durant la période avant floraison.

Dans les travaux de **Lograda et al, 2013** réalisés sur l'espèce *Pituranthos scoparius*, différentes valeurs ont été enregistrées dans différents sites du sud de la Tunisie et de l'Algérie

En effet, des rendements compris entre 0.47% et 2.29% ont été enregistrés pour des échantillons récoltés dans différentes régions d'Algérie (Tkout, Boussaada, Mechouneche et Elkantra) et dans le sud de la Tunisie (Benguerda, Gabés et Mednine) dont les rendements sont compris entre 0.3% et 0.6%.

Dans les travaux menés par **Neffati et al, 2009** sur l'espèce *Pituranthos chloranthus* Coss et Dur. Provenant de Tunisie, les rendements obtenus durant trois périodes différentes sont compris entre 0.15% et 0.42%, ce rendement est moins important que celui de l'échantillon récolté dans la région d'Ouenza.

### II.2.2. Indice de réfraction des H.E :

L'indice de réfraction (RI) est un critère de pureté des huiles essentielles. Il est utilisé pour identifier une HE et vérifier la qualité de la distillation : une distillation trop rapide, à température trop élevée, trop lente abaisse l'indice de réfraction. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Cette pureté est définie dans des intervalles considérés comme acceptable.

L'indice de réfraction des HE est généralement élevé. Il est supérieur à ceux de l'eau à 20 °C = 1.3356. Les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau 5.

**Tableau 5 :** indices de réfraction des huiles essentielles

<b>Espèces</b>	<b>Saisons</b>	<b>Régions</b>	<b>Indice de réfraction</b>
<i>Teucrium polium</i> L.	Avant floraison	Ouenza	1.497
		Meguessemia	1.840
	Floraison	Ouenza	1.498
		Meguessemia	1.850
<i>Pituranthos chloranthus</i> Coss et Dur.	Avant floraison	Ouenza	1.4720
	Floraison		1.4755



### II.2.3. Analyse qualitative des huiles essentielles par (CPG/SM) :

○ H.E de *Teucrium. polium*

L'HE de *T. polium* obtenue est de coloration jaune claire avec une odeur forte et agréable. La composition chimique est présentée par ordre d'élution dans le tableau 6.

Quarante composés ont été identifiés. Les principaux constituants sont :  $\alpha$ -cubébène (40.26%), 3-carène (12.64%), erémophilène (5,5%),  $\gamma$ -muurolène (4.16%), caryophyllène (4.02%), D-limonène (3.34%),  $\alpha$ -guaïène (3.27%) et thymol (3.26%).

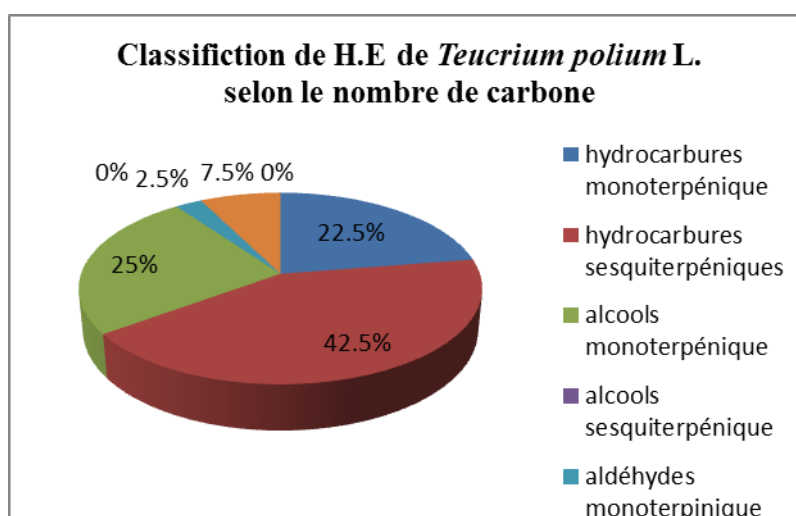
**Tableau 6** : Composition chimique de l'huile essentielle de *T. polium*

N°	Tr	Composé	%
1	6,51	1R- $\alpha$ -Pinène	2,23
2	7,71	3-Carène	<b>12,64</b>
3	8,08	$\beta$ -Pinène	1,43
4	8,94	$\alpha$ -Terpinolène	0,046
5	9,23	p-Cymène	0,25
6	9,38	D-Limonène	<b>3,34</b>
7	10,05	$\beta$ -cis-Ocimène	0,19
8	10,47	$\delta$ -Terpinène	0,12
9	12,07	$\alpha$ -Fenchène	0,40
10	13,17	$\alpha$ -Campholénal	0,13
11	13,4	4-Acétyle-1-méthylcyclohexène	0,08
12	13,71	L-trans-Pinocarvéol	1,59
13	13,98	trans-3-Caren-2-ol	0,42
14	14,72	Pinocarvone	0,57
15	14,91	cis-Verbénol	0,14
16	15,32	cis-4-Thujanol	0,27
17	15,93	$\alpha$ -Terpinéol	0,21
18	16,18	Myrténol	2,10
19	16,8	Verbénol	0,04
20	17,11	Carvéol	0,09
21	18,2	D-Carvone	0,12
22	20,32	Thymol	<b>3,26</b>
23	20,72	Carvacrol	<b>0,59</b>
24	22,09	Elixène	2,69
25	23,73	$\alpha$ -Copaène	0,12
26	24,1	$\beta$ -Bourbonène	0,70
27	25,52	Caryophyllène	<b>4,02</b>
28	25,93	$\gamma$ -Cadinène	1,71

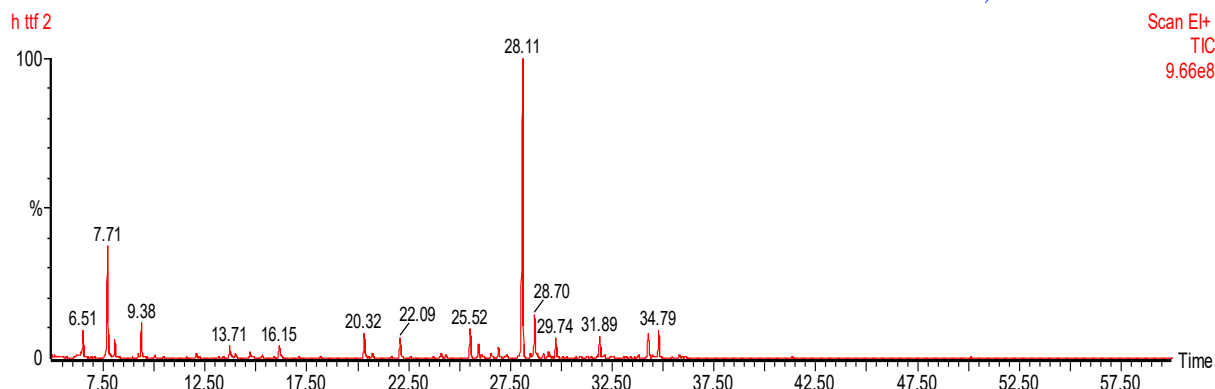
29	26,1	$\gamma$ -Elémène	0,17
30	26,56	D-Germacrène	0,7
31	26,93	$\delta$ -Muuroène	1,15
32	28,06	$\alpha$ -Cubébène	<b>40,26</b>
33	28,69	Erémophilène	5,5
34	28,84	$\alpha$ -Muuroène	0,14
35	29,14	$\alpha$ -Grujunène	0,5
36	29,73	$\beta$ -Cadinène	2,05
37	29,6	Patchoulène	0,14
38	31,89	Déhydroaromadendrène	2,44
39	34,28	$\gamma$ -Muuroène	<b>4,16</b>
40	34,79	$\alpha$ -Guaiène	<b>3,27</b>
Total			

**Tableau 7:** Classification de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. selon la fonction et le nombre de carbones.

		<i>Teucrium polium</i>	
		Nombre de carbones	%
Hydrocarbures	Monoterpéniques	9	22,5
	Sesquiterpéniques	17	42,5
Alcools	Monoterpéniques	10	25
	Sesquiterpéniques		
Aldéhydes monoterpéniques		1	2,5
Cétones monoterpéniques		3	7,5
Ethers			
<b>Total</b>		40	100



**Figure 8:** Répartition en % des composés de H.E de *Teucrium polium* L. selon le nombre de carbone.



**Figure 9 :** Chromatogramme de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L.

La composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. (tableau 5 et figure 3) est caractérisé par un taux élevé en hydrocarbures sesquiterpéniques (42.50%), alcools monoterpéniques (25%) et hydrocarbures monoterpéniques. Les cétones et les aldéhydes monoterpéniques ont enregistré respectivement des taux de 7.50% et 2.50%.

Des études réalisées dans différents pays présentent des compositions de l'huile essentielles de *Teucrium polium* avec des constituants majeurs plus ou moins variable :

En Grèce, les principaux constituants de l'HE étaient : carvacrol (10.1%),  $\alpha$ -cadinol (4.5%) et  $\alpha$ -humulene (3.8%) (**Federica, M., 2009**),

En Iran les principaux composés identifiés sont l' $\alpha$ -pinène (12.52%), le linalol (10.63%) et le caryophyllene oxide (9.89%) (**Moghtader, M., 2009**)

En Tunisie, les travaux réalisés par **Bakari, S., (2015)** décrivent une HE riche en hydrocarbures monoterpéniques (48.73%), hydrocarbures sesquiterpéniques (20.14%), monoterpènes oxygénés (14.50 %) et 5.54% en sesquiterpènes oxygénés.

En Algérie, l'étude effectuée sur la même espèce provenant de la région de Tlemcen a montré une huile essentielle riche en germacrène D (25.82%), le bicyclogermacrene (13%) et le carvacrol (8.93%) (**Belmekki, N., 2013**).

En comparant les résultats de notre échantillon qui a enregistré un taux faible en phénols (thymol + carvacrol = 3.58%) avec prédominance de thymol (3.26%), Celle récolté à Tlemcen a montré un taux en carvacrol de 8.93%.

Ce résultat met en évidence la grande variabilité chimique de l'HE de *T. polium* d'une région à une autre. Cette variabilité chimique pourrait être due à plusieurs facteurs : caractéristiques géologiques et physicochimiques de l'environnement de la population végétale, la partie de la plante utilisée, la période de récolte, la nature du sol et la méthode d'extraction des huiles essentielles.

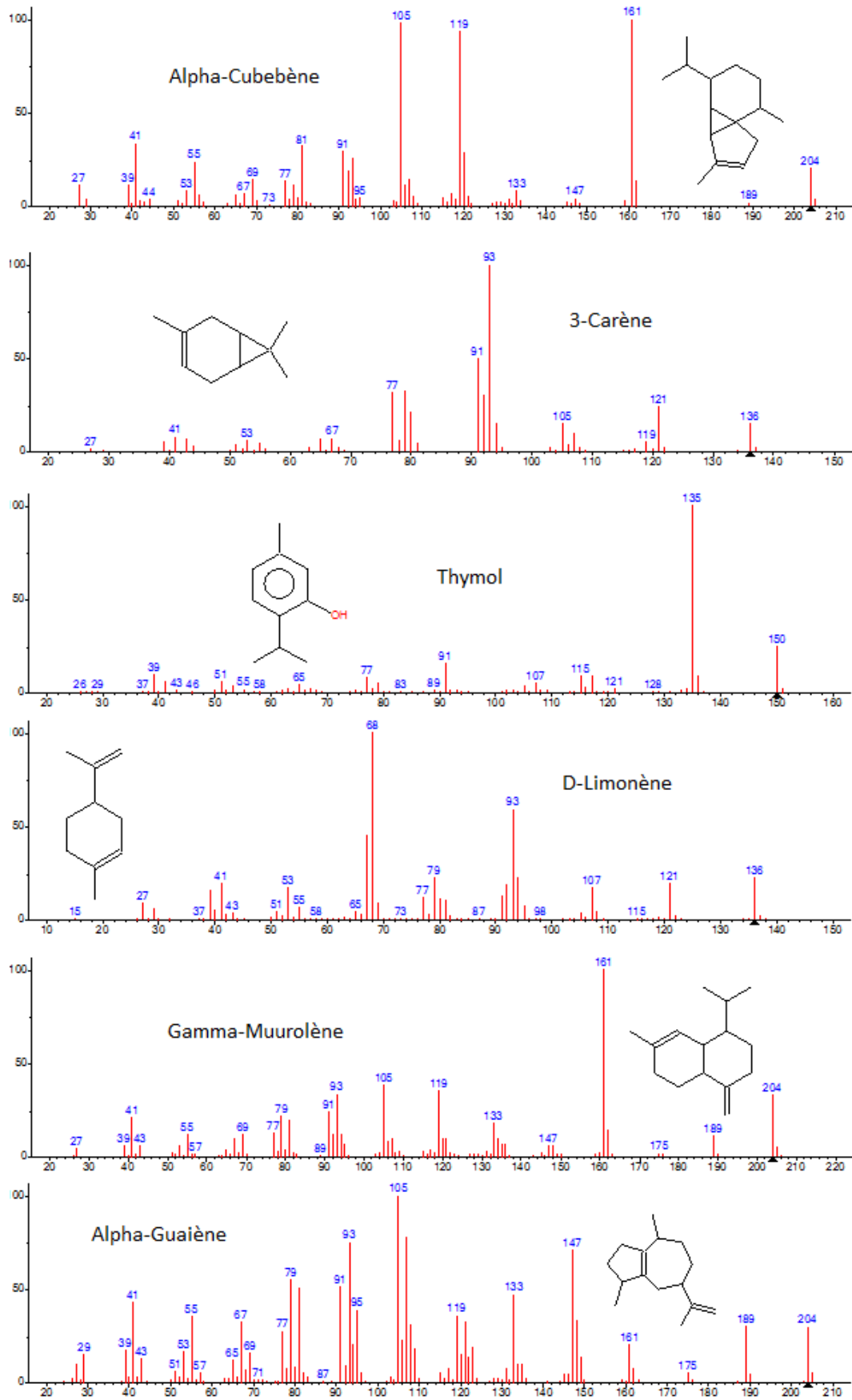


Figure 10 : Spectre de masse des principaux constituants de l'HE de *T. polium*

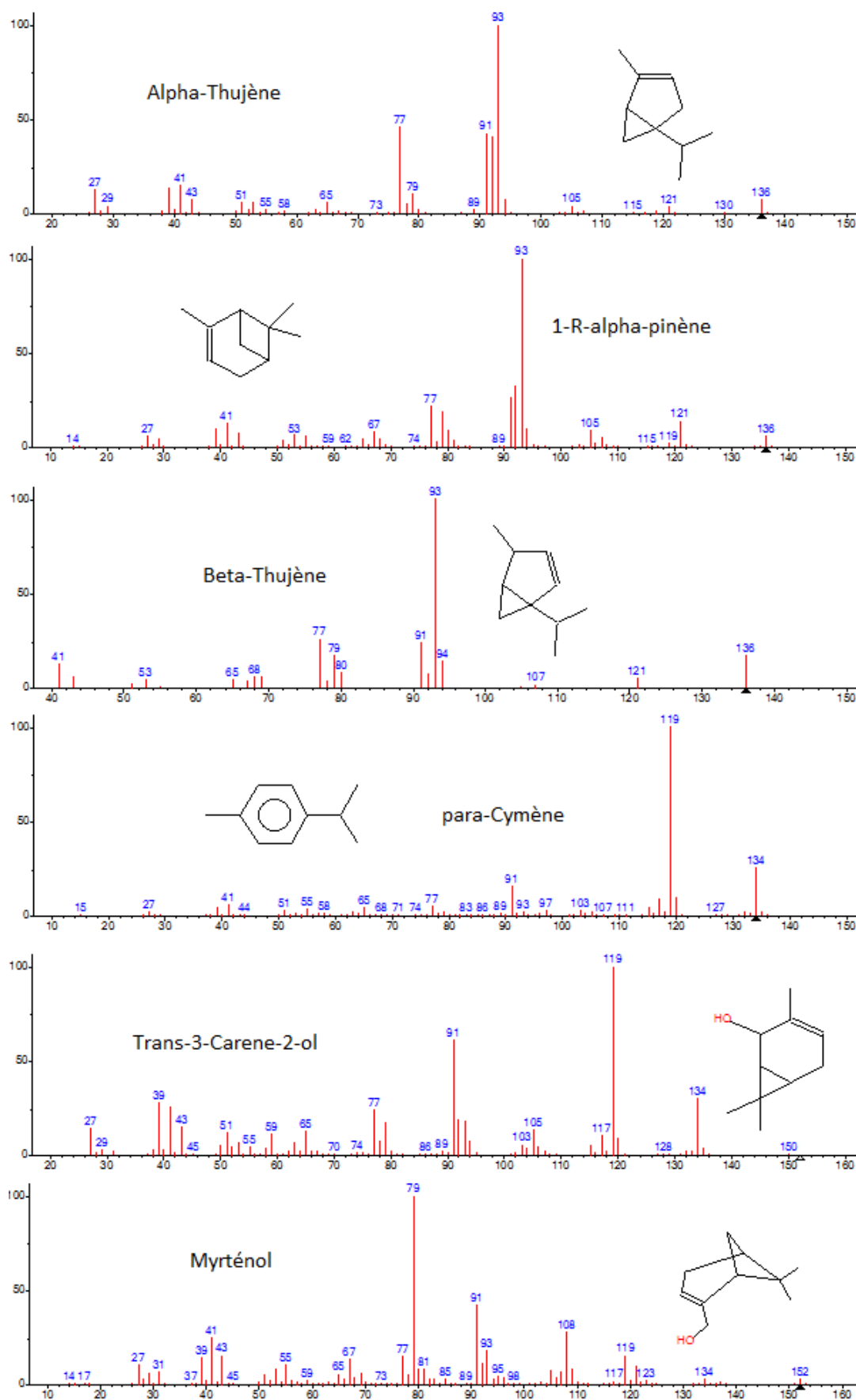


Figure 11 : Spectre de masse des principaux constituants de l'HE de *P. chloranthus*

○ **HE de *Pituranthos. Chloranthus* Coss et Dur.**

Quarante-quatre constituants ont été identifiés dans l'HE de *P. chloranthus*. Les principaux constituants sont : 1-R- $\alpha$ -pinène (18.63%), p-Cymène (14.69),  $\alpha$ -Thujène (9.77%), 3-carène (8.83%),  $\beta$ -Thujène (5,95%), cis-4-Thujanol (5,71%), trans-3-Caren-2-ol (3,70%).

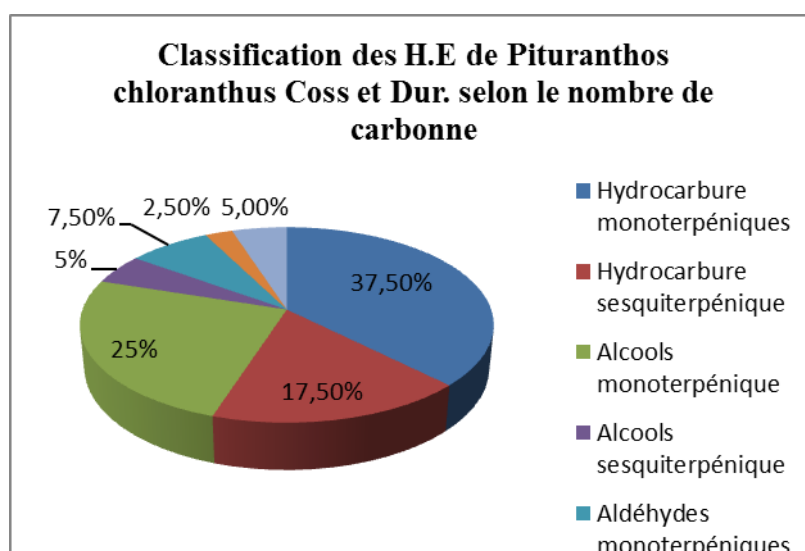
**Tableau 8** : Composition chimique de l'huile essentielle de *P. chloranthus*

Numéro	Tr	Composé	(%)
1	6,24	$\alpha$ -Thujène	<b>9,77</b>
2	6,45	1R- $\alpha$ -Pinène	<b>18,63</b>
3	6,72	Bicyclo[4.2.0]oct-1-ène, 7-endo-éthényl-	0,46
4	6,99	Camphène	0,36
5	7,54	$\beta$ -Thujène	<b>5,95</b>
6	7,67	3-Carène	<b>8,85</b>
7	8,04	$\beta$ -Pinène	0,45
8	8,52	$\alpha$ -Phellandrène	1,02
9	8,94	$\alpha$ -Terpinolène	0,79
10	9,24	p-Cymène	<b>14,69</b>
11	9,38	D-Limonène	1,36
12	9,66	trans- $\beta$ -Ocimène	0,90
13	10,45	$\gamma$ -Terpinène	1,72
14	10,85	$\beta$ -Terpinène	0,28
15	12,8	$\alpha$ -Thujone	0,41
16	13,16	$\alpha$ -Campholénal	1,37
17	13,73	L-trans-Pinocarvéol	2,37
18	14	trans-3-Caren-2-ol	<b>3,70</b>
19	14,73	Pinocarvone	0,66
20	14,91	cis-Verbénol	0,66
21	15,35	cis-4-Thujanol	<b>5,71</b>
22	15,93	$\alpha$ -Terpinéol	0,35
23	16,18	Myrténol	<b>2,11</b>
24	16,8	Verbénol	0,79
25	17,16	Carvéol	0,57
26	18	Cuminaldéhyde	0,28
27	20,3	p-Cymen-7-ol	0,34
28	20,74	Carvacrol	1,01
29	21,25	trans-2, trans-4-Décadiénal	0,11
30	23,18	NI	0,07
31	23,74	$\alpha$ -Copaène	0,10
32	25,03	Methyleugénol	0,73
33	25,54	Caryophyllène	0,05
34	28,06	$\alpha$ -Cubebène	0,03
35	29,75	$\beta$ -Cadinène	0,16

36	30,51	$\alpha$ -Calacorène	0,42
37	31,95	Déhydroaromadendrene	<b>9,15</b>
38	33,82	NI	0,57
39	34,34	$\gamma$ -Muuroolene	2,38
40	34,52	$\beta$ -Eudesmol	0,11
41	34,64	D-Longifolène	0,24
42	34,79	$\alpha$ -Guaiène	0,31
43	35,96	cis- $\alpha$ -Copaène-8-ol	0,19
44	37,08	Phthalide, 3-butylidène-	0,11
Total			

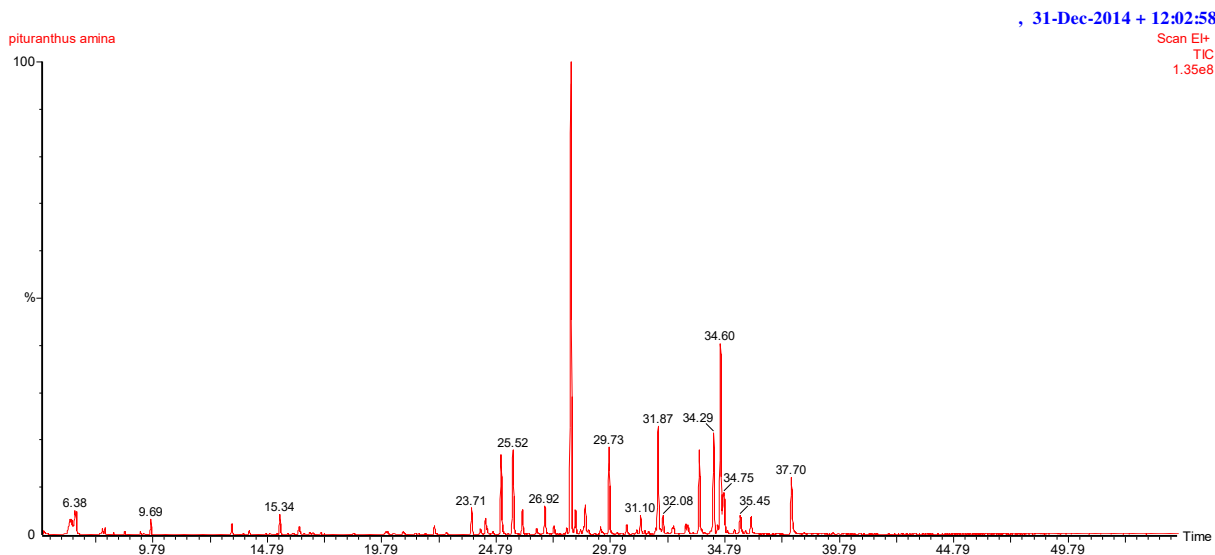
**Tableau 9 :** Classification de l'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus* selon la fonction et le nombre de carbone.

		<i>Pituranthos chloranthus</i>	
		Nombre de carbone	%
<b>Hydrocarbures</b>	<b>Monoterpéniques</b>	15	37,5
	<b>Sesquiterpéniques</b>	7	17,5
<b>Alcools</b>	<b>Monoterpéniques</b>	10	25
	<b>Sesquiterpéniques</b>	2	5
<b>Aldéhydes monoterpéniques</b>		3	7,5
<b>Cétones monoterpéniques</b>		1	2,5
<b>Ethers</b>		2	5
<b>Total</b>		40	100



**Figure 12:** Répartition en % des constituants chimiques des H.E de *Pituranthos chloranthus* Coss et Dur.





**Figure 13 :** Chromatogramme de l'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus* Coss et Dur.

La composition chimique de l'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus* (tableau 6 et figure 5) est caractérisé par un taux élevé en hydrocarbures mono terpéniques (37.50%), alcools monoterpéniques (25%) et hydrocarbures Sesquiterpéniques (17.50%). Les aldéhydes monoterpéniques, les cétones monoterpéniques et les éthers ont enregistré respectivement des taux de 7.50% et 2.50% et 5.00%.

Dans l'étude de Yanguï et al. (2009) portant sur l'huile essentielle de *P. chloranthus* provenant de Tunisie, on note la prédominance du terpinene-4-ol (30.34%), de Myrténol (4.12%) et de  $\alpha$ -terpinéol (3.5%).

La variabilité de la composition chimique des huiles essentielles dépend des facteurs bioclimatiques et édaphiques.

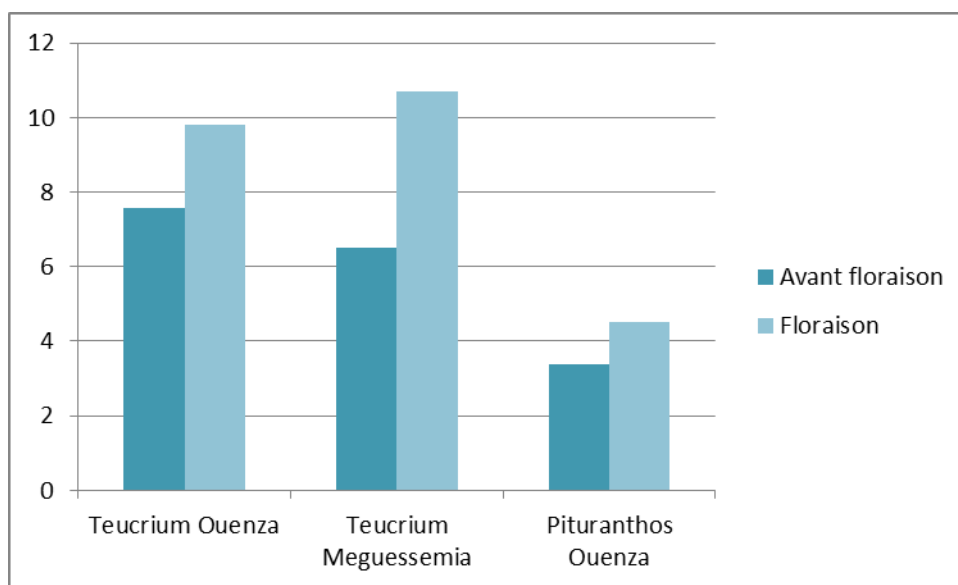
### II.3. Extraction et caractérisation des composés phénoliques :

#### II.3.1. Extraction des composés phénoliques :

Les résultats de l'extraction des polyphénols totaux sont exprimés dans le tableau 8 et la figure 14.

**Tableau 10:** Teneurs des polyphénols totaux

Espèces	Saisons	Régions	Rendements moyen	Couleurs
<i>T. polium</i>	Avant floraison	Ouenza	7,56%	Jaune foncée
		Meguessemia	6,5%	Jaune foncée
	Floraison	Ouenza	9,81%	Jaune foncée
		Meguessemia	10,7%	Jaune foncée
<i>P. chloranthus</i>	Avant floraison	Ouenza	3,39%	Jaune clair
	Floraison		4,51%	Jaune clair



**Figure 14.** Représentation graphique des rendements de la macération méthanolique

La macération méthanolique a donné des rendements plus élevés en période de floraison pour les deux espèces, la valeur notée pour *T. polium* récolté à Meguessemia en période de floraison est la plus élevée, la valeur la plus faible a été donnée par *T. polium* récolté à Ouenza en période végétative.

**II.3.2. Analyse quantitative des composés phénoliques par méthode spectrophotométrique :**

**II.3.2.1. Dosage des composés phénoliques totaux :**

Le tableau 10 regroupe les teneurs en polyphénols totaux de *T. polium* et *P. chloranthus* à différents stades de développement et différentes régions. La courbe d'étalonnage présente un aspect linéaire d'équation  $y = 0.009 x + 0.010$  (figure 15).

**Tableau 11: Teneurs en polyphénols totaux de *T. polium* et *P. chloranthus***

Espèces	Période de récolte	Régions	Teneurs moyenne en polyphenols (mg E acide gallique/gMS)	Ecartype
<i>Teucrium polium</i> L.	Avant floraison	Ouenza	157.01	1.66
		Meguessemia	127.04	1.66
	Floraison	Ouenza	200.26	2.08
		Meguessemia	228.41	1.83
<i>Pituranthos chloranthus</i> Coss et Dur.	Avant floraison	Ouenza	43.17	0.16
	Floraison		47.32	1.54

Le dosage a montré que l'extrait méthanolique est dans tous les cas plus riche en composés phénoliques en période de floraison. Pour *T. polium*, les valeurs en période de floraison ont dépassé les 200 mg EAG/gMS (228.41 mg EAG/gMS pour Meguessemia, et 200.26 mg EAG/ g MS pour Ouenza). Pour *P. chloranthus*, le taux obtenu est de 43.17 mg EAG/gMS avant la floraison et de 47.32 mg EAG/gMS en saison de floraison.

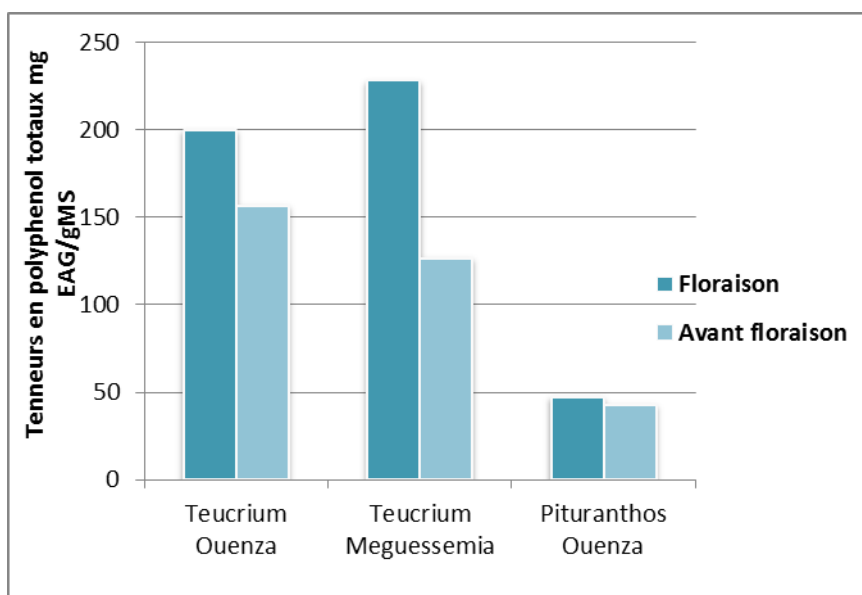


Figure 15 : Teneur en composés phénoliques totaux

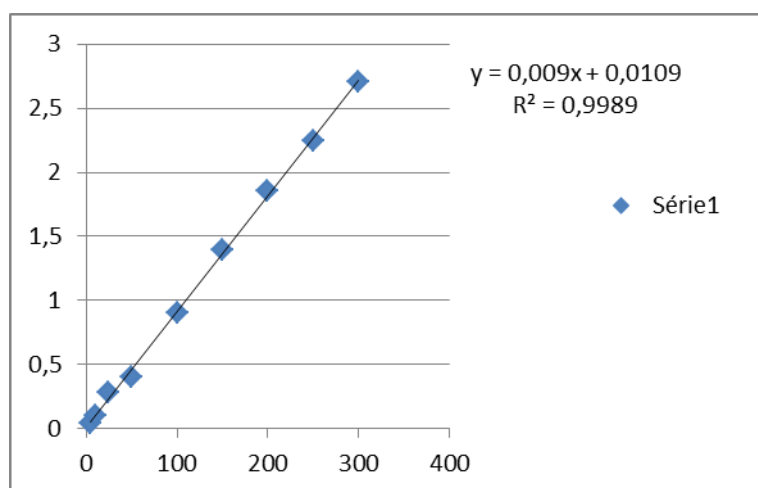


Figure 16: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

**Milan (2012)** a obtenu une valeur de  $233.68 \pm 0.18$  mg EAG/gMS pour les polyphénols contenus dans l'extrait méthanolique de *T. polium*,  $61.94 \pm 0.19$  mg EAG/gMS dans l'extrait éthylacétatique,  $147.77 \pm 0.77$  mg EAG/gMS dans l'extrait acétonique et  $140 \pm 0.29$  mg EAG/gMS dans l'extrait aqueux.

**Ardesrani (2007)** a trouvé un taux de 180.2 mg EAG/gMS pour les polyphénols contenus dans l'extrait éthanolique de *P. chloranthus*. **Hassan et Bahtiti (2012)**, a noté des taux de  $169.06 \pm 0.75$ ,  $170.62 \pm 1.05$  et  $50.50 \pm 1.26$  mg EAG/gMS dans les extraits dichlorométhanique, éthanolique et cyclohexanique.

La variabilité des teneurs en composé phénolique totaux dans les différents extraits, est en grande partie due à la polarité des solvants extractifs (Kumarasamy Y., 2007).

Le méthanol est un meilleur solvant d'extraction pour les composés phénoliques, présentant un rendement plus intéressant que ceux de l'hexane, l'acétone ou l'acétate éthyle selon Zarena A.S., 2009.

### II.3.2.2. Dosage de flavonoïdes :

Les résultats du dosage des flavonoïdes dans les mêmes extraits que précédemment sont regroupés dans le tableau 12. La courbe d'étalonnage est représentée dans la figure 17.

Tableau 12: Teneur en flavonoïdes totaux en mg EC/gMS.

Espèces	Période de récolte	Régions	Teneurs moyenne en flavonoïdes (mg EC/g MS)
<b>Teucrium polium L.</b>	Avant floraison	Ouenza	112.31±2.13
		Meguessemia	200.24±2.46
	Floraison	Ouenza	273.56±2.6
		Meguessemia	286.86±1.68
<b>Pituranthos chloranthus Coss et Dur.</b>	Avant floraison	Ouenza	33.4±0.2
	Floraison		53.47±1.37

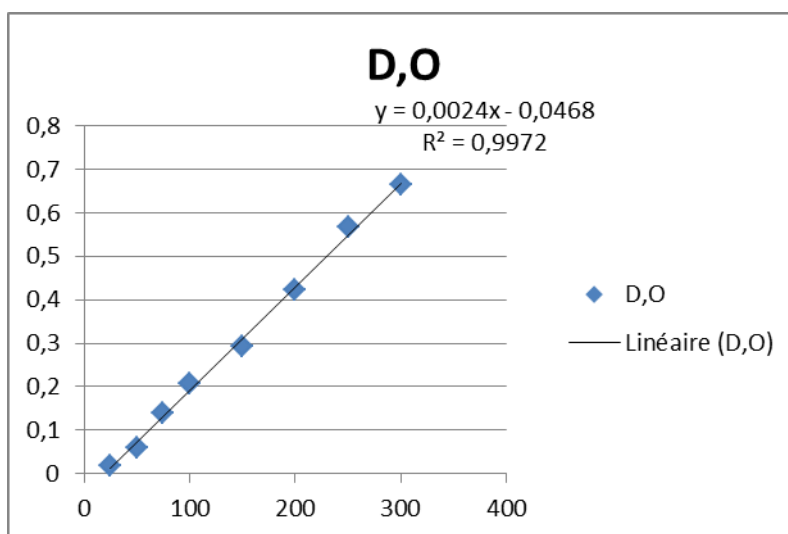
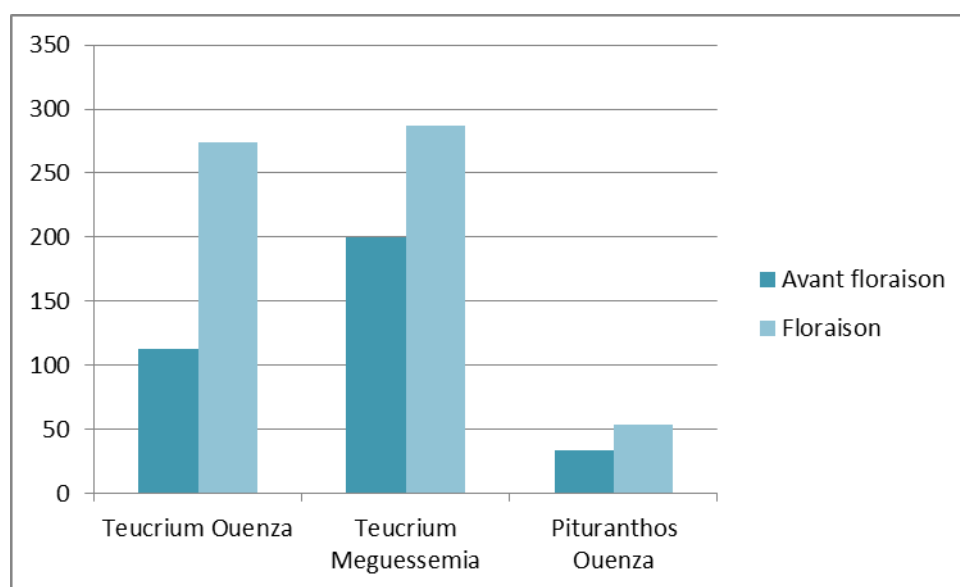


Figure 17: courbe d'étalonnage de la catéchine

La teneur en flavonoïde obtenue avec *T. polium* L., également plus élevée en saison de floraison qu'au stade végétatif, s'est révélée plus élevée dans la population récoltée à Meguessmia (112.31±2.13 et 286.86±1.68 mg EC/gMS) que celle récoltée à Ouenza (112.31±2.13 et 200.24±2.46 mg EC/gMS).

**Ardesrani (2007)** et **Razied (2007)** ont mesuré des taux de 135.2 mg EC/gMS dans l'extrait éthanolique et 197.4 mg EC/gMS dans l'extrait aqueux acide (acide acétique).

**Milan (2012)** a obtenu des teneurs de 242.95 et 335.40 mg EC/gMS dans les extraits acétonique et éthylacétatique et de 47.80 et 195 et mg EC/gMS dans les extraits méthanolique et aqueux.



**Figure 18** : Teneurs en flavonoïdes *mg E Catéchine/ g Matière sèches*

### II.3.2.3. Dosage de tanins totaux :

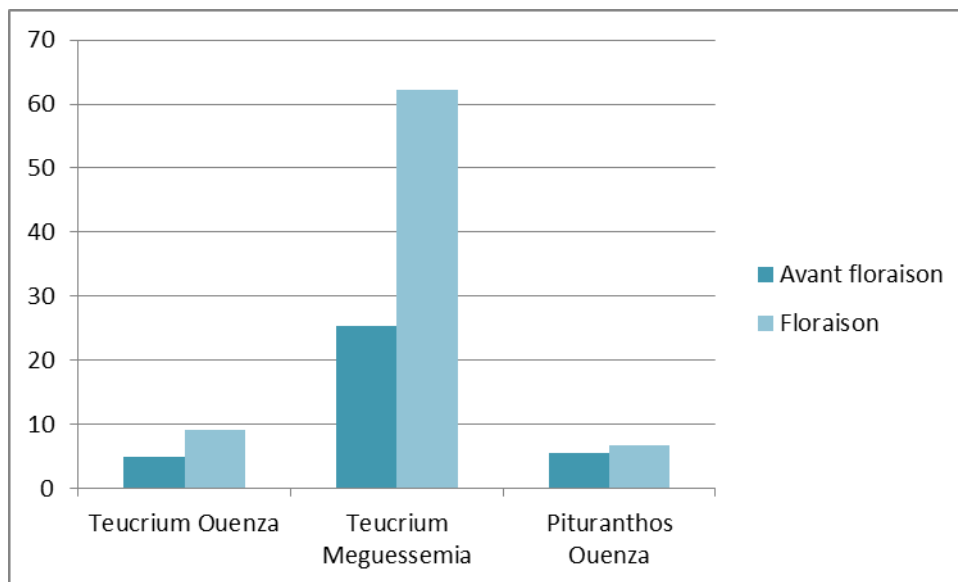
Les résultats de l'étude quantitative des extraits méthanoliques de *T. polium* et *P. chloranthus* selon la méthode au réactif de Folin denis sont résumés dans le tableau 13.

**Tableau 13** : Teneur en tanins totaux

Espèces	Saisons	Régions	Teneurs en flavonoïdes (mg EAT / g MS)
<i>Teucrium polium</i> L.	Avant floraison	Ouenza	4.96±0.48
		Meguessemia	25.37±0.28
	Floraison	Ouenza	9.01±0.41
		Meguessemia	62.23±0.74
<i>Pituranthos chloranthus</i> Coss et Dur.	Avant floraiso	Ouenza	5.54±0.1
	Floraison n		6.78±0.22

La teneur en tanins totaux obtenue avec *T. polium* L., toujours plus élevée en période de floraison qu'au stade végétatif, est la plus élevée dans la région de Meguessemia (62.23±0.74 mg EAT/gMS).

**Khaled-khodja (2014)** a évalué la teneur en tanins totaux dans l'extrait méthanolique par la même méthode et a obtenu 21.19 mg EAT/gMS.



**Figure 19** : Teneurs en tanins mg E acide tannique/ g Matière sèches

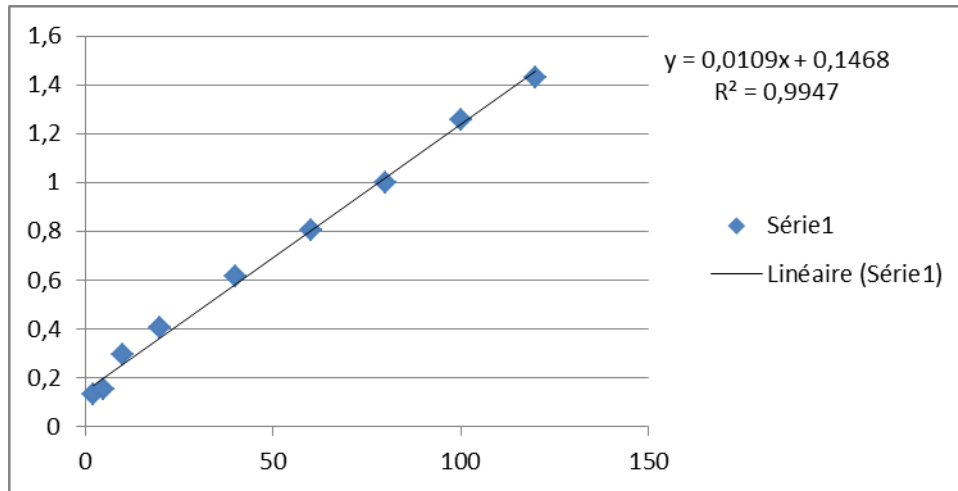


Figure 20: courbe d'étalonnage d'acide tannique

#### II.4. Activité biologique :

##### II.4.1. Activité antibactérienne :

##### II.4.1.1. Test de sensibilité :

- Huiles essentielles

Tableau 14 : diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne des H.E de *T. polium* L.

Souches	Diamètres d'inhibition des huiles essentielles <i>Teucrium polium</i> L. (mm)			
	Meguessemia		Ouenza	
	Avant floraison	Floraison	Avant floraison	Floraison
<b>Bacillus subtilis ATCC 7033</b>	12	12	12.5	11
<b>Escherichia coli ATCC 25922</b>	10	10.5	16	12
<b>Enterococcus faecalis ATCC 29219</b>	<20	<20	<20	15.5
<b>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</b>	9	15	14	13
<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</b>	12	12	11	15
<b>Salmonella typhimurium ATCC 10428</b>	10	11	18	19
<b>Staphylococcus aureus ATCC 25923</b>	16	22	17	20



Pour *T. polium*, les diamètres varient entre 10.5 et 20 mm en saison de floraison et entre 10 mm et 20 mm au stade végétatif. Dans les deux régions, Ouenza et Meguessemia, la plupart des souches se sont révélées sensible voir très sensibles.

Selon les travaux de **Belmekki (2013)** sur l'huile essentielle de *T. polium* ayant été testée sur deux des présentes souches : un diamètre d'inhibition plus important (15 mm) a été noté pour *E. feacallis* alors qu'un diamètre plus élevé dans la présente étude a été mesuré Pour *P. aeruginosa* (15 mm).

**Hammoudi (2012)** a mesuré une zone d'inhibition pour *S. aureus* de 12 mm, pour *E. coli* de 10 mm et pour *P. aeruginosa* de 9 mm.

**Tableau 15 :** diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne des H.E de *P.chloranthus* Coss et Dur.

Souche	Diamètres d'inhibition des huiles essentielles <i>Pituranthos chloranthus</i> Coss et Dur. (mm)	
	Ouenza	
	Avant floraison	Floraison
<b>Bacillus subtilis ATCC 7033</b>	<20	<20
<b>Eschirichilia coli ATCC 25922</b>	13	17
<b>Enterococcus feacalis ATCC 29219</b>	18	<20
<b>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</b>	13	13
<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</b>	11	11
<b>Salmonella typhymurium ATCC 10428</b>	12	12
<b>Staphylococcus aureus ATCC 25923</b>	16	16

L'huile essentielle de *P. chloranthus* a donné des diamètres d'inhibition plus ou moins importants variant de 11 à 20 mm pour les deux saisons, les souches qui se sont révélées les plus sensibles sont *Enterococcus feacallis* ATCC 29219 et *Bacillus subtilis* ATCC 7033 (diamètres supérieurs à 20 mm dans les deux saisons).

**Dahia (2007)** a testé l'H.E de *P. chloranthus* sur des souches de *P. aeruginosa*, *E coli* et *E. Faecalis* et a mesuré des zones d'inhibition respectives de 20 mm pour, 11 mm et 7 mm.

○ Extraits méthanoliques :

**Tableau 16:** diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de *T. polium* L.

Souches	Diamètres d'inhibition des extraits méthanoliques <i>Teucrium polium</i> L. (mm)			
	Meguessemia		Ouenza	
	Avant floraison	Floraison	Avant floraison	Floraison
<b>Bacillus subtilis ATCC 7033</b>	12	21	26	26
<b>Escherichia coli ATCC 25922</b>	9.5	12	16	17
<b>Enterococcus faecalis ATCC 29219</b>	10	09	12	12
<b>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</b>	13	12	15.5	22
<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</b>	11.5	15	19.5	12
<b>Salmonella typhimurium ATCC 10428</b>	11	11	R	22
<b>Staphylococcus aureus ATCC 25923</b>	10	14	11.5	22

Les souches bactériennes ont toutes présenté une sensibilité plus ou moins importante à l'exception de *Salmonella typhimurium*, résistante à l'action de l'extrait de *T. polium*, les diamètres varient entre 11.5 et 26 mm. La croissance des souches *Enterococcus faecalis* ATCC 29219 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 n'a pas été inhibée par l'extrait de *P. chloranthus* aux deux stades, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Salmonella typhimurium* ATCC 10428 a également résisté à l'action du même extrait en stade d'avant floraison.

Selon **Fertout (2016)** l'extrait butanolique a présenté, pour une concentration de 100 µg/mL, un diamètre de 14.5 mm pour *S. aureus*, de 13 mm pour *E. coli*, de 12 mm pour *P. aeruginosa* et *P. mirabilis*. La fraction éthylacétatique n'a pas eu d'action sur *E. coli* et a présenté des diamètres d'inhibition de 13 mm avec *P. aeruginosa* et *P. mirabilis* et 15.5 avec *S. aureus*. L'extrait butanolique a donné pour *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *P. mirabilis* des diamètres respectifs de 19.5, 8.5, 14 et 12.25 mm.

**Khaled-khodja (2014)** a trouvés pour une concentration de 0.2 mg/disque un diamètre de 15 mm contre *E. coli* et 14.75 mm contre *S. aureus*.

**Tableau 17:** diamètres d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de *P. chloranthus* Coss et Dur.

Souche	Diamètres d'inhibition des huiles essentielles <i>Pituranthos chloranthus</i> Coss et Dur. (mm)	
	Meguessemia	
	Avant floraison	Floraison
<b>Bacillus subtilis ATCC 7033</b>	14	19
<b>Eschirichilia coli ATCC 25922</b>	10	11
<b>Enterococcus feacalis ATCC 29219</b>	R	R
<b>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</b>	13	12
<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</b>	R	12
<b>Salmonella typhymurium ATCC 10428</b>	R	9
<b>Staphylococcus aureus ATCC 25923</b>	R	R

**II.4.1.2. Détermination des CMI des huiles essentielles :**

Les CMI des huiles essentielles testées sur les souches sensibles sont inscrits dans le tableau 18.

**Tableau 18 :** Concentration minimale inhibitrice des H.E de *T. polium* et *P. chloranthus*

Souches	<i>T. polium</i>				<i>P. chloranthus</i>	
	Ouenza		Meguessemia		Avant floraison	Floraison
	Avant floraison	Floraison	Avant floraison	Floraison		
<b>Bacillus subtilis ATCC 7033</b>	15uL/mL	10uL/mL	15uL/ml	10uL/mL	5uL/mL	3uL/mL
<b>Eschirichia coli ATCC 25922</b>	15uL/mL	10uL/mL	10uL/mL	10uL/mL	7uL/MI	3uL/mL
<b>Enterococcus feacallis ATCC 29219</b>	4uL/mL	1uL/mL	3uL/mL	1uL/mL	1uL/MI	1uL/mL
<b>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</b>	7uL/mL	1uL/mL	5uL/mL	1uL/mL	7uL/MI	5uL/mL
<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</b>	15uL/mL	15uL/mL	15uL/mL	15uL/mL	15uL/MI	15uL/mL
<b>Salmonella typhimurium ATCC10428</b>	15uL/mL	15uL/mL	5uL/mL	2uL/mL	15uL/mL	15uL/mL
<b>Staphylococcus aureus ATCC 25923</b>	7uL/mL	2uL/mL	5uL/MI	2uL/mL	7uL/mL	1uL/mL

Pour *E. feacallis* et *S. aureus*, **Belmekki (2013)** a obtenu des CMI respectives de 5 µg/mL et 3 µg/mL. La présente étude a montré pour les mêmes souches des CMI de 1 µg/mL, 15 µg/mL et 2 µg/mL. Pour *E. coli*, **Belmekki** a trouvé une CMI plus basse.

Les travaux de **Hammoudi (2012)** ont montré des CMI de 4.9 mg/mL avec *S. aureus*, 12.25 mg/mL avec *E. coli* et *P. aeruginosa*.

En étudiant l'huile essentielle de *P. chloranthus*, **Yangui (2009)** a trouvé des CMI plus importantes pour *P. aeruginosa* (3.75 mg/mL), *E. coli* (3.75 mg/mL) et *S. aureus* (1.875 mg/mL).

#### II.4.1.3. Détermination des CMI des extraits méthanoliques :

Les CMI des extraits méthanoliques testés sur les souches sensibles sont inscrits dans le tableau 19.

**Tableau 19 :** Concentration minimale inhibitrice des extraits méthanoliques

Souches	<i>Teucrium polium</i> L.				<i>Pituranthos chloranthus</i> (Coss et Dur) Benth et Hook (Ouenza)	
	Ouenza		Meguessemia		Avant floraison	Floraison
	Avant floraison	Floraison	Avant floraison	Floraison		
<b>Bacillus subtilis ATCC 7033</b>	12.5	3.125	3.125	3.125	4.68	4.68
<b>Escherichia coli ATCC 25922</b>	50	25	25	12.5	17.75	9.37
<b>Enterococcus faecalis ATCC 29219</b>	50	50	50	25	-	37.5
<b>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</b>	25	25	50	25	18.75	18.75
<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</b>	12.5	12.5	12.5	12.5	-	9.37
<b>Salmonella typhimurium ATCC10428</b>	12.5	12.5	-	12.5	-	-
<b>Staphylococcus aureus ATCC 25923</b>	50	50	50	25	-	37.5

L'évaluation des CMI de l'extrait de *T. polium* récolté à Ouenza a donné des valeurs de 3.125 et 12.5 mg/mL avec *B. subtilis* (stade végétatif et de floraison), de 12.5 mg/mL avec *P. aeruginosa* (les deux stades), de 12.5 mg/mL avec *S. typhimurium* (les deux stades), une valeur de 5 mg/mL avec *E. coli* et de 50 mg/mL avec *E. faecalis*, *S. aureus* et *E. coli*.

Une importante différence des valeurs de CMI s'est vue entre les stades végétatifs et de floraison pour *T. polium* du site de Meguessemia, nettement plus faible avec *E. faecalis*, *E. coli* et *S. aureus*, par contre aucune différence n'a été notée pour le reste des souches.

**Fertout (2016)** a trouvé des CMI de 6.25 ug/ml pour l'extrait ethylacétatique et 12.5 µg/mL pour l'extrait aqueux testés sur *S. aureus*.

#### II.4.2. Activité antifongique des huiles essentielles :

Les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles sont regroupés dans le tableau 20.

**Tableau 20 :** Activité antifongique des huiles essentielles

	<i>Teucrium polium</i> L.				<i>Pituranthos chloranthus</i> (Coss et Dur) Benth et Hook (Ouenza)	
	Ouenza		Meguessemia		Avant floraison	Floraison
	Avant floraison	Floraison	Avant floraison	Floraison		
<b>CMI 80%</b>	12.9ul/ml	2.97ul/ml	11.39ul/ml	7.08ul/ml	20.67ul/ml	9.4ul/ml

L'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *T. polium* et *P. chloranthus* sur *Candida albicans* a donné des CMI<sub>80%</sub> de 2.97 uL/mL et 9.4 uL/mL.

L'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle sur *Candida albicans* de *T. polium* provenant de Ouenza et récolté durant la période de floraison et d'avant floraison nous a permis de déterminer les valeurs de CMI<sub>80%</sub> respectivement de 2,97 µg/mL et 12,97µg/mL. Par contre celle provenant de Meguessmia a donné des valeurs de CMI<sub>80%</sub> de 7,08 et 11,39 µg/mL. Pour *P. chloranthus* provenant de Ouenza et récolté durant les périodes de floraison et d'avant floraison, les valeurs de CMI<sub>80</sub> sont respectivement de 9,04 µg/mL et 20,67 µg/mL. Ces valeurs montrent une très bonne activité antifongique des huiles essentielles. De plus, ce pouvoir antifongique est plus important avec les huiles essentielles des deux espèces récoltées durant la période de floraison. On note aussi que l'activité antifongique de *T. polium* est plus importante que celle de *P. chloranthus*.

Nous observons à travers les résultats de la concentration minimale inhibitrice de la croissance de *C. albicans* des HE étudiées une variabilité relative.

Selon **Cox et al (2000)** et **Jiang et al (2011)**, ces différences pourraient être attribuées à la variation du taux de pénétration des HE à travers la structure de la paroi et de la membrane cellulaire de la levure.

En général, les valeurs de CMI obtenues avec la méthode de dilution en tubes ont permis d'évaluer le pouvoir antifongique des HE étudiées. **Aligiannis et al (2001)** ont proposé une classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI comme suit :

- Forte inhibition : CMI < 500 µg/mL
- Inhibition moyenne : 600 µg/mL < CMI < 1500 µg/mL
- Faible inhibition : CMI > 1600 µg/mL

Selon cette classification, on constate une très forte inhibition de la croissance fongique par les huiles essentielles testées qui ont donné des valeurs de CMI 80% nettement inférieure à 500 µg/mL (2,76 µg/mL à 19,22 µg/mL)

D'une façon générale, les propriétés antifongiques des HE étudiées sont liées probablement à plusieurs phénomènes :

- Augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique de la levure suivie d'une rupture de celle-ci entraînant ainsi une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (**Cox et al , 2000**) ; (**Giordani et Kaloustian, 2006**).
- L'huile essentielle, par sa lipophilie et par conséquent entre en interaction avec la membrane cellulaire (**Cox et al ,1998**).
- L'inhibition de la chaîne respiratoire, en raison des interactions de l'HE avec les membranes mitochondriales, elle peut entraîner une diminution de la production d'énergie et par conséquent une inhibition de la croissance cellulaire ( **Pozzatti et al , 2010**)

Le profil chimique obtenu des huiles des deux espèces est dominé par les hydrocarbures sesquiterpéniques, alcools monoterpéniques , hydrocarbures monoterpéniques, les cétones et les aldéhydes monoterpéniques. Ces composés pourraient être directement liés avec le pouvoir antifongique.

Parmi ces composés, certains ont déjà été signalés dans la bibliographie comme ayant une activité antifongique : l' $\alpha$ -pinène (**Tangarife Castano et al, 2011**) et l' $\alpha$ -terpinéol (**Marcos Aias et al, 2011**). D'autres études ont démontré que ces terpènes agissent sur l'intégrité cellulaire, l'inhibition des processus de respiration et de transport des ions en augmentant la perméabilité des membranes de *Candida albicans* (**Cox et al, 1998 ; Tangarife Castano et al, 2011**)

En effet, la richesse des HE en plusieurs composés biochimiques actifs leur confère un large spectre d'effets antimicrobiens et limite ainsi le risque de résistance des souches en raison de la synergie des composés actifs, y compris les constituants minoritaires. Ces constatations ont été déjà signalées par **Aouni et al ,2013 ; Bendahou et al., 2008 ; Hammer et al, 1999** et **Karl et Jain, 1971**.

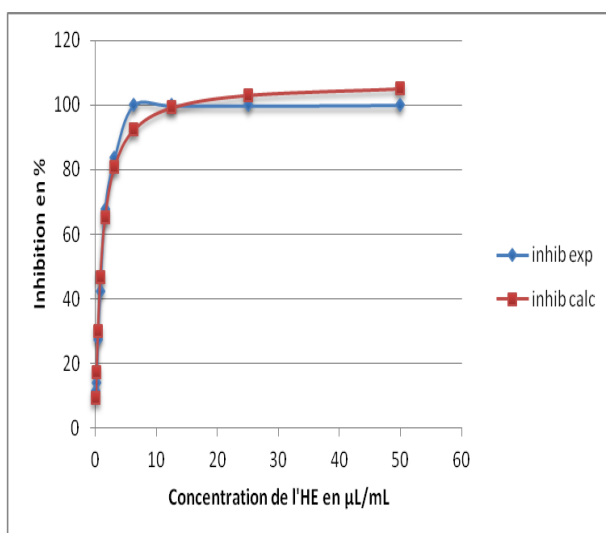


**Tableau 21 : Taux d'inhibition de la souche *Candida albicans* par l'HE de *T. polium*. (Ouenza, Floraison)**

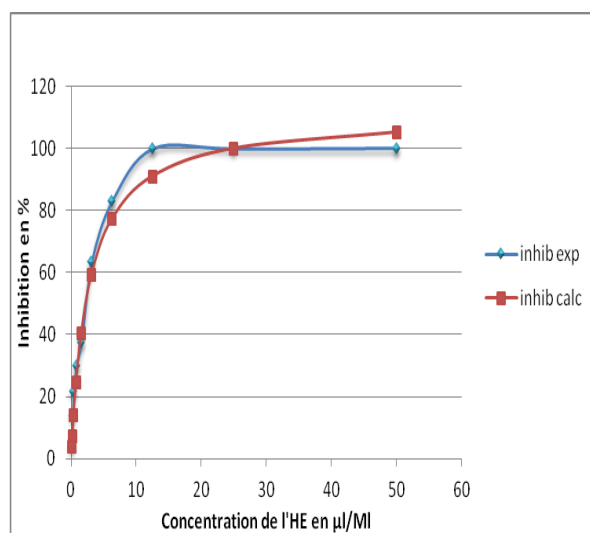
N°	[HE]	inhib exp	inhib calc
1	50	100	105,09498
2	25	100	103,052555
3	12,5	100	99,1969506
4	6,25	100	92,2910067
5	3,125	83,62	81,0112427
6	1,562	67,74	65,0904159
7	0,781	42,17	46,7292522
8	0,39	27,48	29,8471092
9	0,195	13,93	17,3365672
10	0,097	11,66	9,38658845

**Tableau 22 : Taux d'inhibition de la souche *Candida albicans* par l'HE de *T. polium*. (Meguessemia, Floraison)**

N°	[HE]	inhib exp	inhib calc
1	50	100	105,195298
2	25	100	100
3	12,5	100	91,0104987
4	6,25	82,97	77,1412681
5	3,125	63,29	59,1219096
6	1,562	37,54	40,2881265
7	0,781	29,84	24,6122579
8	0,39	21,45	13,8256869
9	0,195	13,63	7,37212947
10	0,097	3,72	3,79383856



**Figure 21 : Action antifongique de l'HE de *T. polium*. L'ajustement aux données expérimentales est représenté par une courbe de fonction  $y = 107,22 x / (1,011 + x)$**



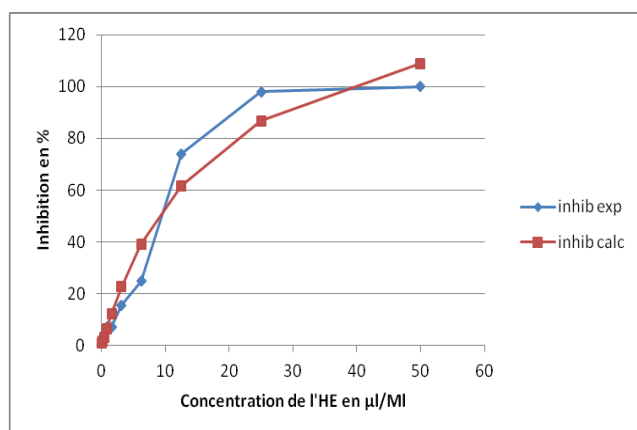
**Figure 22 : Action antifongique de l'HE de *T. polium*. L'ajustement aux données expérimentales est représenté par une courbe de fonction  $y = 110,56 x / (2,74 + x)$**

**Tableau 23 : Taux d'inhibition de la souche *Candida albicans* par l'HE de de *P. chloranthus*. ( Ouenza, Avant Floraison)**

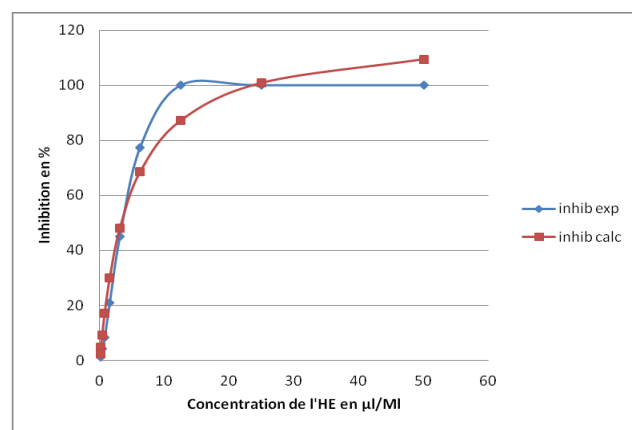
N°	[HE]	inhib exp	inhib calc
1	50	100	108,898704
2	25	98,04	86,790125
3	12,5	74,05	61,7266688
4	6,25	24,81	39,1278208
5	3,125	15,65	22,5882103
6	1,562	7,3	12,2365947
7	0,781	6,96	6,38567477
8	0,39	3,96	3,26007518
9	0,195	3,25	1,64842644
10	0,097	2,19	0,82466195

**Tableau 24 : Taux d'inhibition de la souche *Candida albicans* par l'HE de de *P. chloranthus*. (Ouenza, Floraison)**

N°	[HE]	inhib exp	inhib calc
1	50	100	109,449323
2	25	100	100,851315
3	12,5	100	87,157634
4	6,25	77,44	68,5437672
5	3,125	44,99	48,0290623
6	1,562	21,04	30,037496
7	0,781	8,26	17,1745359
8	0,39	4,16	9,24029703
9	0,195	4,9	4,80571576
10	0,097	1,17	2,43978348



**Figure 23 : Action antifongique de l'HE de *P. chloranthus*. L'ajustement aux données expérimentales est représenté par une courbe de fonction  $y = 146,12 x / (17,09 + x)$**



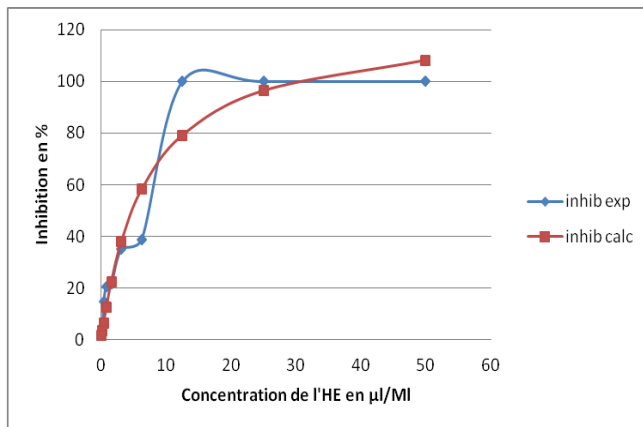
**Figure 24 : Action antifongique de l'HE de de *P. chloranthus*. L'ajustement aux données expérimentales est représenté par une courbe de fonction  $y = 119,65 x / (4,66 + x)$**

**Tableau 25 : Taux d'inhibition de la souche *Candida albicans* par l'HE de *T. polium*. (Ouenza, Avant Floraison)**

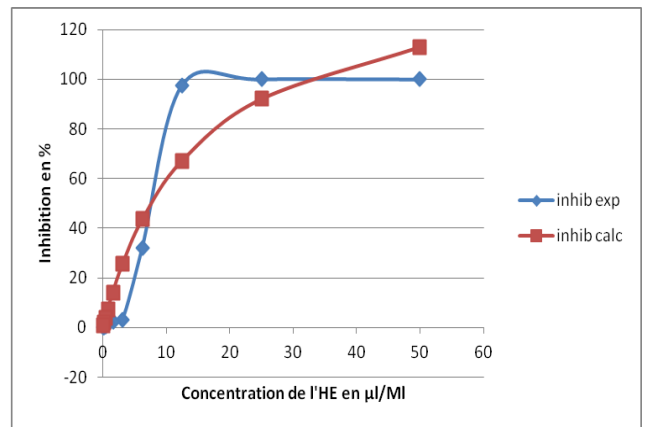
N°	[HE]	inhib exp	inhib calc
1	50	100	108,169533
2	25	100	96,3649156
3	12,5	100	79,1003593
4	6,25	38,84	58,234127
5	3,125	35,17	38,1215982
6	1,562	21,72	22,5412948
7	0,781	20,49	12,404828
8	0,39	14,81	6,52310719
9	0,195	5,12	3,35019512
10	0,097	2,78	1,68958457

**Tableau 26 : Taux d'inhibition de la souche *Candida albicans* par l'HE de *T. polium*. (Meguessemia, Avant Floraison)**

N°	[HE]	inhib exp	inhib calc
1	50	100	112,952087
2	25	100	92,0403023
3	12,5	97,56	67,1691176
4	6,25	32,12	43,6038186
5	3,125	3,12	25,6241234
6	1,562	2,45	14,0389817
7	0,781	1,5	7,37361669
8	0,39	0,43	3,77749503
9	0,195	0	1,91347432
10	0,097	0	0,95813476



**Figure 25: Action antifongique de l'HE de *T. polium*. L'ajustement aux données expérimentales est représenté par une courbe de fonction  $y = 123,27 x / (6,98 + x)$**



**Figure 26: Action antifongique de l'HE de *T. polium*. L'ajustement aux données expérimentales est représenté par une courbe de fonction  $y = 146,16 x / (14,7 + x)$**

### II.4.3. Activité anti oxydante

#### II.4.3.1. Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de DPPH

Le tableau 27 résume les valeurs des CE50 obtenues par la méthode au DPPH.

**Tableau 27:** Concentration efficace médiane des extraits méthanolique et HE de *T. polium* et *P. chloranthus*.

		<i>T. polium</i> (Meguessmia)	<i>T. polium</i> (Ouenza)	<i>P. chloranthus</i>	Acide ascorbique
<b>HE</b>	<b>Avant Floraison</b>	208,53	164,28	>5000	0,37
	<b>Floraison</b>	61,11	91,62	4073,16	
<b>EM</b>	<b>Avant Floraison</b>	22,76	32,79	140,65	
	<b>Floraison</b>	18,43	23,6	79,69	

HE : huile essentielle, EM : extrait méthanolique

Les travaux de **Khaled-Khodja (2014)** sur l'extrait méthanolique de *T. polium* ont donné une CE50 de 0.095 mg/mL. L'évaluation de l'activité antiradicalaire par **Ardestani (2007)** dans les extraits éthanolique, éthylacétatique, étheré et aqueux a donné des valeurs respectives de 48.9, 264, 100 et 100 mg EAA/ g extrait sec. **Mahmoudi (2013)** a mesuré une CE50 de 9200 µg/mL pour l'HE.

L'HE de *P. chloranthus* testée par **Yangui (2013)** a donné une CE50 de 59.92 mg/L. **Neffati, 2009)** a mesuré une CE<sub>50</sub> dans de 78 µg/mL.

**II.8.3.2. Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de FRAP :**

Le tableau 28 résume les valeurs des CE50 obtenues par la méthode au perchlorure ferrique.

**Tableau 28** : Les valeurs de CE50 du pouvoir réducteurs de fer.

		<i>T. polium</i> (Meguessmia)	<i>T. polium</i> (Ouenza)	<i>P. chloranthus</i>	Acide ascorbique
<b>HE</b>	<b>Avant Floraison</b>	140,45	178,24	81,726	1,961
	<b>Floraison</b>	83,8	107,38	190,74	
<b>EM</b>	<b>Avant Floraison</b>	15,44	32,86	38,90	
	<b>Floraison</b>	3,4	14,89	65,93	

Les CE50 les plus basses données par les HE de *T. polium* et *P. chloranthus* sont respectivement de 83.8 µg/mL (région de Meguessmia, période de floraison) et 81.726 µg/mL (période de floraison), valeurs nettement supérieures à celle de l'acide ascorbique qui a présenté une CE50 de 2.014 µg/mL.

Les CE50 les plus basses données par les EM de *T. polium* et *P. chloranthus* sont respectivement de 3.4 µg/mL (région de Meguessmia, période de floraison) et 38.90 µg/mL (stade végétatif), valeurs proches de celle de l'acide ascorbique.

**Khaled\_khodja (2014)** a trouvé une concentration de 414.65 µg/ml pour l'extrait méthanolique de *T. polium*. **Ardestani (2007)** a mesuré les CE50 d'extraits obtenus au moyen de différents solvants et a noté des valeurs de 88.8 mg équivalent troxol / g extrait sec pour l'éther, 264.2 mg équivalent troxol / g extrait sec pour l'acétate d'éthyle, 220.2 mg équivalent troxol / g extrait sec pour l'éthanol et 84.1 mg équivalent troxol / g extrait sec pour l'eau.

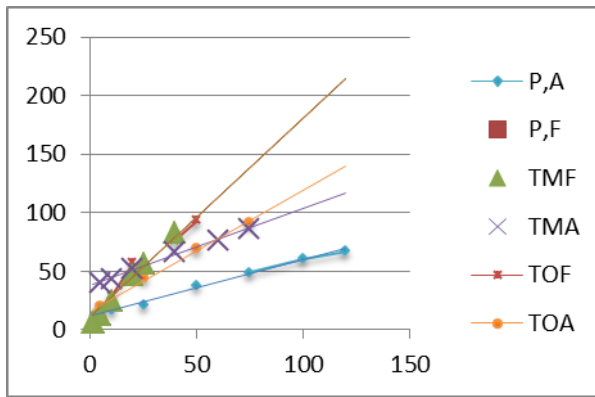


Figure 27 : La capacité antioxydant (DPPH) des extraits méthanolique

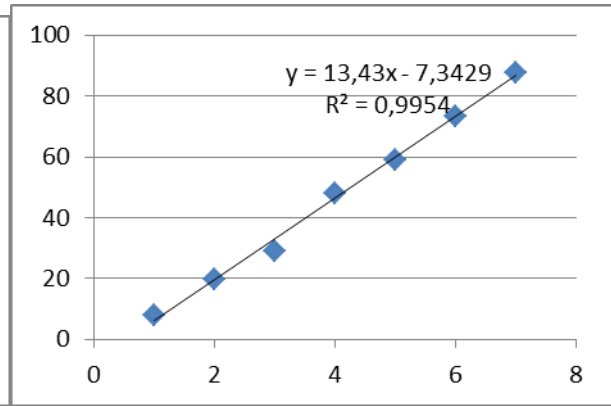


Figure 28 : La capacité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique

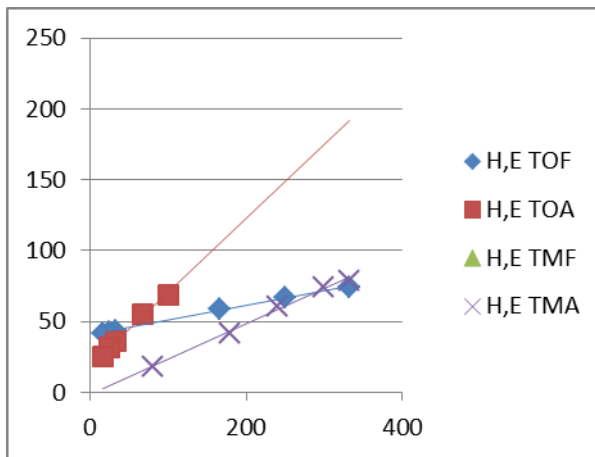


Figure 29 : La capacité antioxydant (DPPH) des H.E de *Teuicium polium* L.

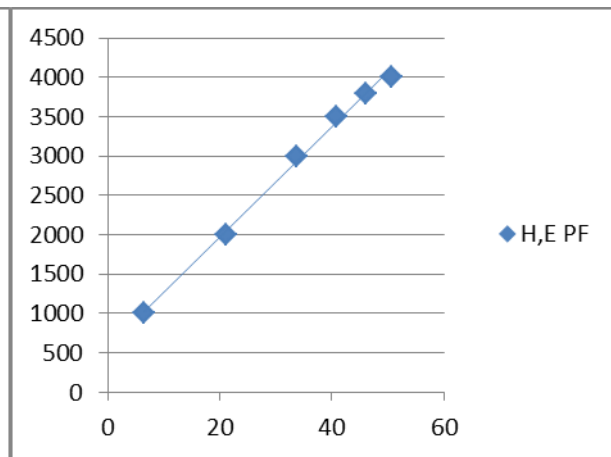


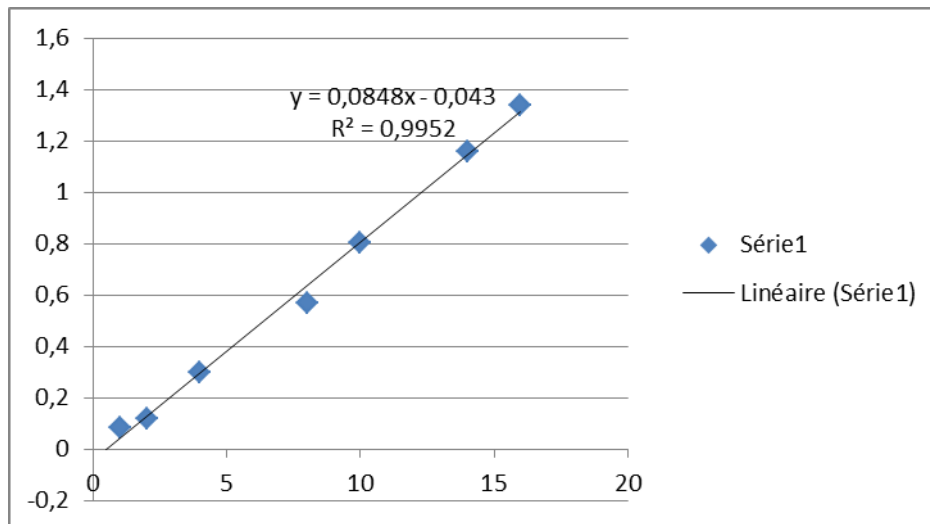
Figure 30 : La capacité antioxydant (DPPH) des H.E de *Pituranthos chloranthus* Coss et Dur

**II.4.3.3. Détermination de l'activité anti oxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium**

Le tableau 29 résume les valeurs des CE50 obtenues par la méthode au phosphomolybdate d'ammonium.

**Tableau 29 : Les valeurs de CE50 de l'activité anti oxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium**

Espèces	Saisons	Régions	Nombre de mg E Acide ascorbique / g extrait sec	
			H.E	E.M
<i>T. polium</i> L.	Avant floraison	Ouenza	H.E	356.67
			E.M	207.35
		Meguessemia	H.E	179.24
			E.M	197.57
	Floraison	Ouenza	H.E	263.82
			E.M	118.83
		Meguessemia	H.E	196.38
			E.M	137.59
<i>P. chloranthus</i>	Avant floraison	Ouenza	H.E	100.8
			E.M	38.42
	Floraison		H.E	117.29
			E.M	116.15



**Figure 31 : courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique**

*P. chloranthus* a présenté dans ce test une activité plus intéressante que celle de *T. polium*. Les EM sont plus actifs que les HE pour les deux espèces, à différents stades.

**Ardestani (2007)** a constaté que l'extrait éthylacétatique de *T. polium* présenté avec cette méthode de mesure, une valeur de 318.4 mg Equivalent Acide ascorbique/g d'extrait sec, nettement plus élevée que celles des extraits éthanolique, étheré et aqueux (respectivement 166.8, 78.3 et 93.5 mg Equivalent Acide ascorbique/g d'extrait sec).

La propriété antioxydante de nombreux extraits végétaux a été attribuée à leur contenu phénolique. Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres et la réduction des substances oxydantes.



# **Conclusion et perspective**

### Conclusion et perspectives :

Les Plantes Médicinales restent toujours un domaine qui attise la curiosité des chercheurs. Dans le cadre de la mise en valeur des substances naturelles nous avons tenté à travers notre thèse d'étudier deux espèces appelées: *Teucrium polim* L., et *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Hook. Dans la région de Meguessemia (Guelma) et Ouenza (Tebessa), qui présentes de nombreuses vertus médicinales.

Dans un premier lieu les résultats de notre étude phytochimique des deux plantes, nous a montré que *Teucrium polium* L. est plus riche en principe active que *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Hook.

Les deux plantes ont été soumises à deux types d'extraction :

Une des H.Es par hydrodistillation, l'essence obtenue se varie entre les deux espèces dont *Pituranthos* a un rendement plus élevé que *Teucrium* pour les deux saisons : 0.74% (F) et 0.55%(AF) pour la première, entre 0.45% -0.34 (F) et 0.23%-0.21% (AF) pour *Teucrium* a Ouenza et Meguessemia respectivement ; suivie par une analyse par CPG/SM . Elle a permis d'identifier 44 composés pour le *Pituranthos chloranthus* L dont les majoritaires sont 1-R- $\alpha$ -pinène (18.63%), paracymene (14.69%),  $\alpha$ -thuyene (9.77%), aromadendrene dehedro (9.15%) et 40 composés pour *Teucrium polium* L. dont : sont majoritaires D-cadinene (40.26%), 3-carene (12.64%) eremophilene (5.49%) pour la seconde.

La seconde extraction, c'est l'extraction des composés phénoliques par le méthanol, qui nous a donné une variabilité dans les rendements, *Teucrium* est plus riche en polyphenol que *Pituranthos* dans les deux saisons.

Les extraits méthanoliques ont révélé une forte teneur en polyphénol totaux de l'ordre de 47.32 ( F) et 43.17 (AF) , entre 200.26-228.41 (F) et 157.01-127.04 en (mg EAG/gMS) pour *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Hook. Et *Teucrium polium* L. Ouenza et meguessemia respectivement.

Une teneur en flavonoïde et tanin totaux importante pour *Teucrium* par rapport a *Pituranthos* dans les deux saisons.

## *Conclusion et perspective :*

---

Les tests biologiques effectués dans ce travail ont montré que l'effet antibactérien des deux plantes sur différentes souches bactériennes de gram positif et négatif est significatif. Cette efficacité est due à la présence des polyphénols qui sont des antioxydants naturels et les constituants des huiles essentielles qui sont des métabolites secondaires réputés pour leurs effets antibactériens.

En conclusion, ce travail nous a permis de nous initier à un grand nombre de techniques expérimentales pour mener à bien une étude phytochimique d'une plante. Ce travail constituera pour nous une base de départ pour des recherches plus approfondies dans l'axe que nous nous sommes fixé de suivre dans le cadre du projet sur les plantes médicinales.

# **Bibliographie et weebographie**

## *bibliographie*

### *A*

**Ahmadi F., 2010**, Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymeno crater longiflorus* Benth., of Iran, food and chemical toxicology, pp :1137-1144.

**Afanaseva, I.B., Ostrakhovitch, E.A., Mikhal'chik, E.V., Ibragimova, G.A., Korkina, L.G. (2001)**. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology*. **61**(6): 677-684.

**Amin A., Razieh Y., 2007**, Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxydation, Food and Chemical Toxicology, pp : 2402-2411.

**Amrouni S et al., 2014**, Effet de l'huile essentielle d'Origanum vulgare et de Thymus ciliatus sur Pseudomonas aeruginosa VIM-2carbapénèmase, phytothérapie, pp :309-313

**Andary C. , Rascolj P., Rousselj L., Et Privatg. , 1988**. Les esters de l'acide caféique dans la chimiotaxinomie des Teucrium de la section polium (Lamiaceae). Can. J. Bot. 66: 1007-1012.

**Aouni M., Farhat F., Chemli R., Harzallah-Skhiri5 F, Larbi Khouja M., 2012**, Chemical composition of 8 eucalyptus species essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities, complementary  $\delta$  Aternative Medicine, 12:81-96.

**Atailia I., djahoudi A., 2015**, Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) cultivé en Algérie , phytothérapie, pp : 156-162.

**Autore G., Capasso F., De Fusco R., Fasulo M.P., Lembo M. ,Mascolo N., Menghini A., 1984**, Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* L. Pharmacal. Res. Commun, 1:16.

### *B*

**Bakari S., Nacir M., Samir F., Hafedh H., Mongi S., Neji G., Adel K.I, 2015**, Chemical Composition and in vitro Evaluation of Total Phenolic, Flavonoid, and Antioxidant Properties

of Essential Oil and Solvent Extract from the Aerial Parts of *Teucrium polium* Grown in Tunisia, Food Sci, Biotechnol, 24(6),1943-1949.

**Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008;** Biological effects of essential oils- A review. Food Chem Toxicol. 46: 446-475.

**Barrett J.F., 1995.** A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavones gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 390: 59-69.

**Baudoux, D., &Zhiri A., 2003,** *Les cahiers pratiques d'aromathérapie selon l'Ecole Française. Vol. 2, Dermatologie.* Bruxelles: Amyris.

**Bate Smith E C.; Swain T., 1965,** Recent developments in the chemotaxonomy of flavonoid compounds. *Lloydia* ,28, 313-331.

**Belmekki N., Bendimerad N., Bekhechi C., 2013,** Fernandez X, Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. Essential oil from Western Algeria, Journal of Medicinal Plants Research , 7(14), 897-902.

**Benslimani A., 2011,** Techniques. In: Réseau algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries (ed) Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, médecine humaine et vétérinaire. 6e édition, pp. 23–37

**Bolou G.E.K., Attioua B., N'guessan A.C., Coulibaly A., N'guessanj D. , Djaman A.J, 2011,** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium* 80,772-790.

**Bondet V., Williams W. B., Berset C, 1997,** Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebens mittel- Wissen schaft Un Technologie*, 30, 609–615.

**Bonnier, G., Douin, R., 1990,** La grande flore de Gaston Bonnier, France, Suisse et Pays voisins. Ed. Belin, Paris, France.

**Boulila A., Mattoussi K. , M'rabet Y., Boussaid M., 2015,** Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extract sobtained from the fruit and leaves of Tunisian *Lycium tricatum* Boiss, food chemistry2015, 174 : 577-584.

**Bracke M. et al., 1991,** Effect Catechins an Citrus Flavonoids on invasion in Vitro, Clin Exp Metastasis. , 9, 13-25.

**Brokel M.,** Diyasena C.M.N., Gunatilaka AAL., Kraus W., 1988, Canaliculatol an fongical resveratrol trimer from *Stemona porosa canaliculata*, *Phytochem*, 27(2), 377-380

**Bruneton J., 1987,** *Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris, France.

**Bruneton J., 1999,** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Technique & Documentation*, Paris, 721-741.

**Bruneton J. ; 1999,** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Tec. & Doc.* Eds. Lavoisier. Paris; 199-388.

**Bruneton J., 2009,** *Pharmacognosie, II<sup>ème</sup> Edition*, Ed Lavoisier, Paris, 567, 571, 683. 737.573.

## **C**

**Chami N., Chami F., Bennis S., Trouillas J., Remmal A., 2004,** Antifungal Treatment With Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis in Immuno suppressed Rat, *BJID*, 8, 217-226.

**Chemat, F., Lucchesi, M., & Smadja, J, 2004,** *Brevet n° EP 2003000118320030121.*

**Couplan F., 2009.** *Le régal végétal: Plantes sauvages comestibles. Editions Sang de la terre, 1ère édition, Paris. p : 451.*

**Cowan M.M., 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 564- 582.

**Couplan F., 2000-***Dictionnaire Etymologique de Botanique, De la chaux et Niestlé S.A. Lausanne, Paris : 238.*

## **D**

**Dahia M., Laouer H., Chaker A N., Prado S., Meierhenrich U J., Baldovini N., 2007,** Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Pituranthos chloranthus* Volatile Oil, *Natural Product Communications*, 2(11), 1159-1162.

**De Wit H. 1965.** *Les plantes du monde, les plantes à fleurs. Tome 2 hachettes. 339p.*

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

**Dolatkhahi M., Ghorbani-Nahoji M., Mehrafarin E., Amininezhad G.R., Dolatkhahi E., 2013**, Ethnobotanical study of medicinal plants of Kazeroun: identification, transmittal and traditional uses. *J Med Plants*, 11(2), 45: 163-178.

**Duthie G. G., et coll., 2000**, Effet antiallergique, *Nutrition Research Reviews*, 13, 79- 106 1-6-2.

## Ε

**Elaissi A., Rouis Z., Abid Ben Salem N., Mabrouk S., Ben Salem Y., Bel Haj Salah K.,**

**El Gharras H., 2009**. Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44(12): 2512-2518.

**Escandar GM., Sala L.F. (1991)**. Complexing behavior of rutin and quercetin. *Can. J. Chem.* **69**: 1994-2001.

**Esmail D., HosseinMotamedi, Seyyed M., Sayed N., 2010**, Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens., *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 124-127.

## Ζ

**Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE., 1993**, Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol, *The lancet* 341, 1103-1104.

**Frankel E N. Waterhaouse A L., KinsellaHatano T., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Fujita Y., Yasuhara T., Yoshida T., Okuda T.,1989**, Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Chem. Pharm. Bull*37, 2016-2021.

**Fertout MN., Latreche A., Mehdadi Z., Bengherraz Z., 2016**, Activité antibactérienne de quatre extraits de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale), *Bulletin de la Société royale des Sciences de Miège*, 85, p ; 253-262.

## Θ



**Georges Sens-Olive, 1979**, Les huiles essentielles - généralités et définitions – dans *la phytothérapie et aromathérapie*, éd. Maloine,

**Giordani R. ; Buc J. ; Reli P., 2002**, Mycoses, 45, 482-487.

**Giodani R. ; Regli P. ; kaloustian J., Portugai H., Buc J., 2003**, J. Mycol. Med., 13, 87-91.

**Giordani R., Hadeff Y., Kaloustian J., 2008**, Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants, *fitoterapia journal*, pp,199-203.

**Goetz G., Fkeyrat A., Métais N., Kunz M. ,Tabacchi R., Pezet R., Pont V., 1999**, Resistance factors to grey mould in grape berries : Identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase, *Phytochem*, 52, 759-767.

**Grotewold E., 2006**, The Science of Flavonoids. Springer Science\_Business Media, Inc

Library of Congress Control Number: 2005934296.

**Guenther E., 1949**, The essential oils. D. Van Nostrand Co., New York, N.Y.

**Guignard J.L., 1980**. Abrège de botanique, 4<sup>e</sup> Ed: MASSON, paris. 259p.

## *H*

**Hammoudi R., Hadj M., Mahfoud I., Ould El Hadj M.D., 2013**, Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Teucrium polium geyrii* (Labiatae), *academix journals*, 7, 897-902.

**Harborne J.B., 1980**. Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology, New series, 8, pp 329-402.

**Harborne J B., Tome-barberan F A., Williams C A. et Gil M.L., 1986**- A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry*, Vol. 25, No. 12: 281 I-2816.

**Hasani P. et al., 2007**, In vivo antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to alpha-tocopherol, *Acta pharm*, pp : 123-129.

**Hatano T., Kagawa H., Yasuhara T., Okuda T., 1988**. Two new flavonoids and other constituents in licoriceroot: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36 , pp : 2090–2097

**Hilliard J.J., Krause H.M., Bernstein J.I., Fernandez J.A., Nguyen V., Ohemeng K.A. & Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K. & Kinoshita T., 1998.** Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. 48: 125-129.

**Huglin P ., Schneider C., 1998,** Biologie et Ecologie de la vigne, technique et documentation, Paris.

## *J*

**Inspir S.A., Baudoux D., Zhiri A., 2001,** Les cahiers pratiques d'aromathérapie selon l'école française, Luxembourg.

**Irith W., Kai H., Robert E., Hancock W., 2008,** Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, natural protocols, 3(2), pp: 163-175.

**Isabel C.F.R. et al., 2007,** Free-radical scavenging capacity and reducing power of wilde diblemush rooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity, Food Chemistry, pp : 1511-1516.

**IUCN., 2005,** A guide to medicinal plants in north Africa, ISBN, Spain, pp: 2-8317-0893-1, 256.

**Izzo A.A., 1996.** PAF and the digestive Tract. A Review. J Pharm Pharmacol. (48), pp: 1103-1111.

## *J*

**Jodoin J. et al., 2002,** Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols, *J. Biochem. Biophys.Acta*, 1542, 149-159.

## *K*

**Kang J., et al. , 2005.** Synthesis and characterization of coordination compounds of Cd (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) with rutin. Indian journal of chemistry. Sect. A: Inorganic, physical, theoretical & analytical. **44**(10), 2010-2014.

**Kammer G., Winterlter, P., Schwab M., Scherier P., 1991**, Glycosidically bound aroma compound in the fruits of Prunus species: apricot (*P.armeniaca*), peach (*P. persica* L.), yellow plum (*P.Domestica* L.), *J. Agric, Food chem.*, 39, 737-758

**Kempf M., Eveillard M., Kowalczyk F., 2011**, Antibacterial activity against 224 clinical bacterial strains of JCA 250 and JCA 251 compounds containing essential oils provided from Aroma Technologies research. *Pathol Biol* 59: 39–43.

**Khaled-Khodja N., Boulekbache-Makhlouf L. , Khodir M., 2014**, Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae, *Industrial Crops and Products*, 61, 41-48.

**Kim H.P., Son K.H., Chang H.W., Kuang SS., 1996**, Flavonoids: Potential anti-inflammatory agents. *Nat Prod Sci*, 2(1), 1-8.

**Korkina L.G., Afanas'ev I.B., 1997**. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* 38: 151–163

**Krammer.G. et al. 1991**. glycosidically bound aroma compound in the fruits of Prunus species : apricot (*P.armeniaca*.L.), peach (*P.persica* L), yellow plum ( *P. domestica* L. ssp. *Syriaca*). *J. gric.Food.Chem.*, 39, 778-781.

**Kumarasamy Y., Byres M., Cox P. J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D.,2007**, Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytother Res*, 21(7):615-621.

## L

**Lagnika L., 2005-** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat de l'université louis pasteur

**Lakhdar L. , 2015**, Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* : étude in vitro, thèse de doctorat.

**Laleh K., Sedigheh B., Abbas D., Hossein N., 2012**, Antioxidant Total Phenol and Flavonoid Contents of Two *Pedicularis* L. Species from Eastern Azerbaijan, Iran. *Bio Impacts*, 2(1), pp: 47-53.

**Lograda T., Ramdani M., A. Kiram, Chalard P., Figueredo G. 2013.** Variation of essential oils composition of *pituranthos scoparius* in Algeria, *Global J Res. Med. Plants & Indigen. Med.* (2):1–9.

## *M*

**Mahmoudi R., Nosratpour S., 2013,** *Teucrium polium* L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties, *International Food Research Journal*, 20, 1697-1701.

**Manthey J.M., 2000,** Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirc*, 7, 28-34.

**Milan S.S., Neda N., Vladimir M., Marina T., 2012,** Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *Polium*, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(2):117-122.

**Mohsen S.M., Ammar A.S.M.,2009,** Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem*,112(3):595-598.

**Möller K., 2008.** La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Ed. UNICO, Paris.

**Monti D., Chetoni P., Burgalassi S., Najarro M0, Saetton M.F. & Boldrini E., 2002.-** Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 237: 209-214.

**Muanda N.F., Kone D., Dicko A., Soulimani R., Younos C., 2007,** Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian Medicinal plant parts, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 109: 1 - 8.

**Muhammed A. et al. , 2011,** Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Northern Badia Region, *journal of ethnopharmacology*, pp : 27-35.

**Murota K., Mitsukuni Y., Ichikawa M., Tsushida T., Miyamoto S., et Terao J. (2004).** Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(7): 1907-1912

## *N*

**Nabila B . et al., 2013**, Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Sature jacala mintha ssp.Nepeta (L.) Briq, nature et technologie, pp.14-19

**Nabila B, 2016**, Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*, thèse de doctorat.

**Naouel O., 2015**, Chimie organique : Etude chimique et biologique des huiles essentielles de Coriandre de Fenouil et de Persil, Thèse de doctorat,Oran.

**Nasser A., Awadh A., Martina W., Norbert A., Ulrike L., Ludger W., 2008**, Chemical Composition of the Essential Oil of *Teucrium yemense* DeFlers, records of natural products,2, 25-32.

**Nassim D., Vanina L., Elodie G., Stéphane A., Marie-Cécile G., Jean-Marie D., Jean-Michel B., Jean C., Liliane B., Anne L., Alain M., 2011**, Phyto chemical composition of Corsican Teucrium essential oils and antibacterial activity against food borne or toxic-infectious pathogens, Food Control, 30:354-363.

**Nawal H.A.B., 2012**, "Teucrium polium" Extracts Jordanian Ja'adeh, Asian Journal of Agricultural Sciences 4(6), 379-382.

**Neffati A. et al., 2009**, A comparative evaluation of mutagenic, antimutagenic, radical scavenging and antibacterial activities of essential oils of *Pituranthos chloranthus* (Coss. et Dur.), 32 (4): 372-380.

**Neffati A. et al., 2009**, Antigenotoxic and antioxidant activities of *Pituranthos chloranthus* essential oil, environmental toxicology and pharmacology. pp : 187-194.

**Négre, R., 1962**, Petite Flore des Régions Arides du Maroc Occidental, Tome 2 Ed. CNRS, Paris France.

*©*

**O'Kennedy R. &Thornes R.D., 1997**, Coumarins: biology, applications and mode of action. Ed. John Wiley& Sons Inc., New York.

**Oganesyan GB, Galstyan AM, Mnatsatanyan VA, Shashakov AS, Agababjan PV. 1991**, Chem Nat Comp; 27:556.

**Oussou K.R., 2009.** –Etude chimique et activités biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.

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

**Oyvind M. et al., 2006,** Flavonoids" Chemistry, Biochemistry and Applications, Ed: CRC, America.

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

## **P**

**Padma R., Parvathy N.G., Renjith V., Kalpana P., 2013,** Quantitative estimation of tannins, phenols and antioxidant activity of methanolic extract of *Imperata cylindrical*, *IJRPS*, 4(1), 73-77.

**Paris M. & Hurabielle M., 1981.** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome 1: généralités, monographies. Ed. Masson, Paris.

**Parsaee H., Shafiee-Nick R., 2006,** Anti-Spasmodic and Anti-nociceptive effects of *Teucrium polium* aqueous extract. *Iran Biomed J*, 10:145-9.

**Pellecuer J., Jacob M., Simeon B., Dusart G., Attiso M., Barthez M., Gourgas L., Pascal B., Tmei B., 1980,** *Plant Méd. Phytother* 14, 83.778-781.

**Peyron L., 1992 :** Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. Chapitre 10, pp 217 – 238. *Cité In* : Les arômes alimentaires.

**Richard H. Et Multon J. L.** Ed. Tec & Doc-Lavoisier et Apria. pp : 438.

**Pharmacopée européenne, 2008,** 6<sup>ième</sup> Edition, pp : 1898.

**Pharmacopée Européenne, 2010,** 7<sup>e</sup> édition. Strasbourg: Conseil de l'Europe.

**Pibiri M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat ès sciences. EPFL, Lausanne, Suisse.

**Pistrick K., 2002-** Notes on neglected and underutilized crops Current taxonomical overview of cultivated plants in the families Umbelliferae and Labiatae, *Genetic Resources and Crop Evolution*, Vol 49: 211–225.

**Polsherriwa S.A., Ganjiwale R.O., 2007.** Spectrophotometric estimation of total tannins in some Ayurvediceye drops. *Ind J PharmSci.* 69 (4), 574-576.

**Ponce A.G. et al., 2003,** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, 36, 679-684.

**Prieto P., Pineda M., Aguilar M.M., 1999,** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341.

**Proestos C., Sereli D., Et Komaitis M., 2006,** Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, Vol. 95: 44–52.

**Proestos C., Sereli D., Et Komaitis M., 2006.** Ultra-sonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants comparison with conventional extraction technics. *Journal of Food Quality.* Vol. 29: 567–582.

## Q

**Quezel P., et Santa S., 1963,** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Centre National de la Recherche Scientifique, Tome 2, Paris, 788.

**Quezel P., Santa S. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, Editions du CNRS: Paris.1170p.

## R

**Rasekh H.R. et al., 2001,** Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats, *Fitoterapia* , pp : 937-939.

**Rasekh, H.R., Yazdanpanah, H., Hosseinzadeh, L., Bazmohammadi, N., Kamalinejad M., 2005,** Acute and sub chronic toxicity of *Teucrium polium* total extract in rats .*Iranian Journal of Pharmaceutical Research.*4: 245-249.

**Rawel H.M., Frey S.K., Meidtner K., Kroll J., Schweigert FJ. (2006).** Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Molecular Nutrition & Food Research.* **50**: 705-713.

**Ribereu-Gayon P., 1968-** Les composés phénoliques des végétaux. Ed. DUNOD Paris.

## S

**Sadeghi H., Jamalpoor S., Shirzadi M.H., 2014**, Variability in essential oil of *Teucrium polium* L. of different latitudinal populations, *Industrial Crops and Products*, 54, 130-134.

**SBF., 2011**, Document sur les activités de la société botanique de France « Flore et végétation de la Tunisie méridionale », 281-359.

**Seladji M., Bekhechi C., Beddou F., Dib H., Bendimerad N., 2014**, Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta petella* aqueous and methanolic extracts from Algeria, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(02) : 12-16.

**Shahraki M.R.etal., 2007**, The effect of *Teucrium polium* (Calpoureh) on liver function, serum lipids and glucose in diabetic male rats, *Iran biomed*, pp :65-8.

**Singleton V L, Rossi JA., 1965**, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J EnolVitic*, 16:144-158

## T

**Tanka T., Ohyama M., Morinmoto K., Asai F., Linuma M., 1998**, Resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata*, *Phytochem*, 48(7), 1241-1243.

**Touil A., Rhouati S., Creche J., 2006**, Flavonoid glycosides from *Pituranthos chloranthus*. *Chem Nat Compd* 42, 104–105.

**Thompsen J. C., et Mottola H. A., 1984** . Kinetics of the complexation of iron (II) with ferrozine. *Analytical Chemistry* . 56(4): 755-757.

## W

**Ward J. 1994**. Free radicals, antioxidants and preventi vegeriatrics *Aust Fram Physiian.*, 23, 1297-301.

## Y



**Yangui T., Bouaziz M., Dhouib A., Sayadi S., 2009**, Potential use of Tunisian *Pituranthos chloranthus* essential oils as a natural disinfectant, *Letters in Applied Microbiology*,24, 112-117.

## Z

**Zambonelli A et al., 2004) Aurelio A.Z, Severi A, Benvenuti E, Maggi L et Bianchi A., 2004**, Chemical composition and fungicidal activity of commercial oils of thymus vulgaris L. *J. Essent. Oil Res.* 16(1) : p. 69 - 74.

**Zarena A.S., Sankar K.U., 2009**. A study of antioxidant properties from *Gar ciniaman gostana*L. Pericarp extract. *Acta Sci Pol Technol Aliment.*, 8:23-34.

**Zhao R.J., Koo B.S., Kim G.W., Jang E.Y., Lee J.R., Kim M.R., Kim S.C., Kwon Y.K., Kim K.J., Huh T.L., Kim D.H., Shim I., Yang C.H., 2005**, The essential oil from *Angelicagigas Nakai* suppresses nicotine sensitization, *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2323-2326.

**Zhi-hong Wang et al., 2009**, Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit, *food chemistry*, pp : 914-918.

**Zhishen J., MengchengT., Jianming W., 1999**, The determination of flavonoid contents in mulberry and theirs scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4) :555-559.

**Scalbert A., 1991**. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* 30: 3875-3883.

**Cowan M.M., 1999**. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4):564- 582

**Daglia M., 2012**. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23(2): 174-181.

**Zhang H., Kong B., Xiong Y .L. & Sun X., 2009**. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Sci.* 81: 686-692.

## **Webographie :**

**Site 1 :** [http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosart/imgArt/chromato/chromato\\_gaz1.html](http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosart/imgArt/chromato/chromato_gaz1.html): **consulté le 31/03/2018.**

**Site 2 :** <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/8ModuleL1CSG/4ConfBioPhysique/3PresHTMLbioPHYS/2Figures/5SpectroMasse/1SpectroMasse.html> **consulté le 31/03/2018.**

**Site 3 :** <http://chimactiv.agroparistech.fr/aliments/antioxydant-dpph/principe> **consulté le 04/04/2018.**

# **Annexe**

## Determination of Total Phenol, Flavonoid, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of *Teucrium polium* L. in Algerian East

Dridi A<sup>1\*</sup>, Hadeff Y<sup>2,3</sup>, Bouloudani L<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Plant Biology and Environment, Department of Biology, University of Badji Moukhtar, Annaba 23000, Algeria

<sup>2</sup>Laboratory of Analytical Chemistry, Pharmacy Department, Medical Faculty, University of Badji Moukhtar, Annaba 23000, Algeria

<sup>3</sup>Laboratory Development and control of research of pharmaceutical preparations hospital, University of Badji Moukhtar, Annaba 23000, Algeria

Available Online: 15<sup>th</sup> October, 2016

### ABSTRACT

The phenolic compounds are one of the main group of components, which act as antioxidant of the free radicals; it reduces and decrease the accumulation of their products. This article presents the anti-oxidizing activity of *Teucrium polium* L. Methanolic extract which was evaluated by two methods; capacity of reduction of iron and the trapping of the free radical DPPH, which expressed by a remarkable but weak IC<sub>50</sub> in front of ascorbic acid: 32 mg/ml for the first and 23.09 mg/ml for the reduction of DPPH. Determination of the total polyphenol content in the extracts of *Teucrium polium* L.; has been estimated by the method of Folin-Ciocalteu. The result shows that our plant is rich in polyphenol, which is equal to 288.41±1.83 mg equivalent of gallic acid/gdry material. The total flavonoids were determined by the colorimetry method using AlCl<sub>3</sub>, and were expressed out of mg equivalent of catechine/g of dry material, which was estimated at 200.24±2.46 mg EC/gDM. The antimicrobial activity was tested on seven strains of bacteria of ATCC type: *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella typhimurium* ATCC10428, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Bacillus subtilis* ATCC7033 and one yeast *Candida albicans* ATCC10231. The antibacterial activity was estimated by the test of sensitivity and calculation of the minimal inhibiting concentration (MIC) according to the method of micro dilution. The diameter of inhibition varies between 11.5 mm and 26 mm and resistant for *Salmonella typhimurium* ATCC10428 for a concentration of 600 mg/ml, whereas the values of the MIC are varied between 3.125 mg/ml and 50 mg/ml which showed an important activity for some strains.

**Keywords:** *Teucrium polium* L., DPPH, FRAP, antibacterial, polyphenol totals, flavonoid

### INTRODUCTION

The medicinal herbs are regarded as an important source of new chemical substances, which have an important therapeutic effect<sup>1</sup> and in the last years there was a crescent interest for the study of these plants. Algeria, offers a rich and various vegetation with a large amount of spontaneous aromatic plants, our research is related to *Teucrium polium* L. East Algerian area of "Meguessemia". *Teucrium polium* L (Germandrée tomenteuse), of the Lamiaceae family is a plant from 10 to 35cm long, perennial, robust stems with branches covered of cottony bristles. The leaves are tight or oval-elongated, the inflorescences -of white aspect- are tight, globular or ovoid at least a centimetre in diameter. The calice is instituted of 5 unequal teeth whose higher is larger and blunt at the top. The corolla is white, rarely purpurin. Stamens are not rolled up on themselves after flowering<sup>2</sup>. Scientific researchs confirmed the traditional remedies of this plant. According to Alzeweiri et al.<sup>3</sup> infused air part of *Teucrium polium* L. is used for its anti-

inflammatory and anti-anorexia effects, it's used also against the jaundice and the spasmodic and gastric colics, and it has an antidiabetic and an antibacterial activity<sup>4,5</sup>, it is an antioxidant<sup>6</sup>; We were interested to this plant after noting its interest in local population. Therefore, the aims of the present study were to determine the phenolic compounds (contents of polyphenol on the one hand and flavonoïds on the other hand) in methanolic extract and investigate its antimicrobial and antioxidant activities.

### MATERIALS AND METHODS

#### Plant materiel

The crop of the air part of *Teucrium polium* L. was in the area of "Meguessemia" during 2013. The species was identified in the laboratory of vegetable biology, Department of pharmacy (Faculty of Medical sciences, Badji Mokhtar University-Annaba-Algeria).

#### Microbial strains

\*Author for Correspondence: [bilamina@hotmail.com](mailto:bilamina@hotmail.com)

The tested strains are of type ATCC (American Type Culture Collection), provided by the laboratory of microbiology of the teaching hospital of Annaba: *Bacillus subtilis* ATCC 7033, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 10428, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* ATCC 10231.

#### Preparation of the extract

After drying in a dry and aired place -with the shelter- the plant is crushed. About 100g of the vegetable material was put to maceration during 24 hours in 100 ml of methanol. After; a vacuum filtration and evaporation of the solvent using a steam rota at a temperature between 45 and 50 °C, the dry residue is conserved in 3ml of methanol at a temperature of 4 °C<sup>7</sup>.

#### Determination of total polyphenol contents

The proportioning of polyphenols was realized according to the method of Folin-Ciocalteu described by Singleton et al.<sup>8</sup>.

0.2 ml of the methanolic extract is mixed with 1 ml of folin diluted at 1/10, after five minutes; we add 0.8 ml of recently prepared sodium carbonate (at 7.5%), the whole is agitated by a vortex. We leave the mixture during 30 minutes in darkness at room temperature; using a spectrophotometer at 700 nm<sup>7</sup>. The calibration curve is realized under the same conditions using the gallic acid. The content of total polyphenol is expressed in milligrams of equivalent of dry material per gram of gallic acid.

#### Determination of total flavonoid contents

A colorimetric process described by Zhishen et al.<sup>9</sup> determined the content in total flavonoids of methanolic extract of our species. 1 ml of sample was mixed with 4 ml of distilled water, and then we add 0.3 ml of NaNO<sub>2</sub> solution. After 6 minutes we add 0.3 of AlCl<sub>3</sub> (10%) we let it rest during 6 minutes then we add 2 ml of a NaOH solution (1N) and the total is adjusted at 10 ml with distilled water. We leave the mixture resting for 15 min, the absorbance was determined a length of 510 nm. The results were expressed with reference to the catechine (mg equivalent catechine /g dried material)

#### Antioxidant activity

##### Capacity of trapping of the free radical "2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl" (DPPH)

The capacity of trapping of free radical DPPH was evaluated according to the method described by Boulila et al.<sup>11</sup>.

1 ml of each extract with various concentrations was mixed with 2 ml of a methanolic solution of DPPH (at 0.04 g/L). After 60 minutes of incubation at darkness, the absorbance was measured at 517 nm using a spectrophotometer (JENWAY 6300) against methanol used as a blank. The percentages of inhibition of the DPPH were calculated according to the formula:

$$\% \text{ of inhibition DPPH} = \frac{A_0 - A_{eq}}{A_0} \times 100.$$

Where A<sub>eq</sub> is the absorbance of the methanolic solution of DPPH added with the antioxidant at equilibrium and A<sub>0</sub> is the absorbance of the DPPH solution added with only methanol at the same proportions. The curve expressing

the percentage of inhibition of the DPPH according to the concentration of the antioxidant in microgram per millilitre (µg/mL) has permitted to deduce the median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) defined as the antioxidant concentration necessary to decrease the initial concentration of the DPPH at 50%. The ascorbic acid was used as positive control<sup>12</sup>.

#### Reduction of iron

The reduction of iron was measured according to the method of Oyaizu et al.<sup>13</sup>. The extracts were diluted in methanol, then 2.5 ml of tri chloroacetic acid at 10% (w/v) were added and the whole was centrifuged to 3000 round/min during 10 minutes. To 2.5 ml of each supernatant were added 2.5 ml of distilled water and 0.5 ml of ferric chloride at 0.1% (w/v). The absorbance was measured by a spectrophotometer (Jenway6300) at 700 nm against a blank prepared by replacing the extracts by methanol. The ascorbic acid was used as positive control. The result is expressed by inhibitory concentration IC<sub>50</sub>.

#### Antibacterial activity

##### Disc diffusion assays

The sensitivity of the bacterial strains to the extract was assessed by the method of diffusion on discs<sup>15</sup>. Bacterial suspensions were prepared in a physiological solution starting from young colonies (18-24 hours) by adjusting turbidity with 0.5 McFarland. Using a sterile swab, the bacteria in suspension were sown on a dry agar-agar surface (Mueller-Hinton agar liquefied cooled in Petri dishes). Sterile discs of What man paper (6 mm diameter) were then placed, then impregnated with 10 µL of the extract (concentration: 600 mg/ml). Petri dishes were incubated at 37 °C during 24 hours. The strain is regarded as non-sensitive to the extract for a diameter lower than 8 mm, moderately significant between 8 and 14 mm, significant between 14 and 20 mm and very significant if the diameter is higher than 20 mm<sup>16</sup>.

##### Minimal Inhibition Concentration (MIC)

The method of minimal inhibition concentration was described according to the method of microdilution<sup>17</sup>. Bacterial suspensions of the young bacterial cells were prepared in sterile tubes containing physiological water at a value of 0.5 McFarland. It must be used in maximum 30 minutes in order to avoid the change in the cellular number. 50 µl of this suspension is completed at 5 ml with liquid MH because the number of bacterial cells for this test is very important and it must be equal to 5x10<sup>5</sup> Colony Forming Units(CFU)/ml. The 96-well plates were prepared by dispensing into each well 50µl of different methanolic dilutions of the *Teucrium polium* L. extract prepared in DMSO at 10% with 50 µl of inoculated liquid MH. To check that the results of sensitivity are exact, it is necessary to include at least an organization of control with each batch of determinations of MIC. The organizations of control are available starting from different collections of strains. After incubation of 18 hours at a temperature of 37°C, 15µl of nitro blue tetrazolium (NBT) at a concentration of 2 mg/ml were added to the wells and incubated at 37°C for 2 hours. The reading is based on the colouring of the wells in blue, which indicates the presence

of the microorganism growth, however the persistence of the initial yellow colour of NBT implied the total inhibition of bacteria cells.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Determination of total polyphenol and flavonoid contents**  
The methanolic content of the extract's total polyphenol of *Teucrium polium* L. was given according to the method of Folin Ciocalteu. The results obtained was calculated out of mg of equivalent of gallic acid per gram of dry material (mg EGA/gDM), which produced a colouring proportional to the quantity of polyphenols present in the methanolic extracts.

The results presented in table 1 have shown high percentage of polyphenol ( $288.41 \pm 1.83$  mg EGA/gDM) compared to Milan et al.<sup>18</sup> who found a value of  $233.68 \pm 0.18$  for the methanolic extract, whereas the other extracts have lower polyphenol contents:  $61.94 \pm 0.19$  for acetate ethyl,  $147.77 \pm 0.77$  for acetone and  $140 \pm 0.29$  for water. Amin et al.<sup>19</sup> found a total polyphenol contents estimated at 180.2 mg EGA/gDM for the ethanolic extract and less important values were found for other solvents<sup>20</sup>:  $169.06 \pm 0.75$  mg EGA/gDM,  $170.62 \pm 1.05$  mg EGA/gDM, and  $50.50 \pm 1.26$  mg EGA/gDM for dichloromethane, ethanol and cyclohexane, respectively. The variability of the contents of total phenolic compounds in the different extracts can be due to the polarity of solvent<sup>21</sup>. It is well known that methanol is a better extraction solvent for the phenolic compounds than hexane, acetone and ethyl acetate<sup>22</sup>. The total flavonoids were estimated according to the colorimetric method with aluminium tri chloride and sodium hydroxide, by using the catechine as standard. According to the obtained results, we noticed an important content of flavonoid  $200.24 \pm 2.46$  EC/gDM comparing to Amin et al.<sup>19</sup> who found 135.2 EC/gDM for ethanol extract and 197.4 EC/gDM for the ethyl acid extract. Milan et al.<sup>18</sup> have found a variability of the flavonoids contents in various extracts, acetone and ethyl acetate showed the more important values estimated at  $242.95 \pm 1.45$  EC/gDM and  $335.40 \pm 0.71$  EC/gDM, respectively. However, water and methanol extract presented a less important flavonoide content equal to  $195 \pm 1.04$  EC/gDM and  $47.80 \pm 0.44$  EC/gDM, respectively. The significant difference of the flavonoid content for various solvents depends on the solvent choice.

### Antioxidant Activity

The antioxidant capacity of the methanolic extracts of *Teucrium polium* L. was evaluated by iron reduction which measures the reducing capacity of an antioxidant by the transformation of  $Fe^{3+}$  into  $Fe^{2+}$  and the capacity of trapping of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

(DPPH) which depends on the structural formation of the antioxidant. Some compounds react very rapidly with DPPH which reduces a certain number of DPPH molecules<sup>23,24</sup>. *Teucrium polium* L. gave an IC50 equal to 23.09  $\mu$ g/ml (DPPH) and 32  $\mu$ g/ml (reduction of iron) however our extract has a less pronounced activity compared to that obtained by Sharififar et al.<sup>25</sup>, in the chloroforme, petroleum ether and water extracts which are successively in  $\mu$ g/ml 73.2, 85.4 and 40.6, but our results are more important than methanolic extract obtained by Sharififar et al.<sup>25</sup> (20.1 mg/ml) and Ahmed et al.<sup>26</sup> ( $18.3 \pm 0.8$  mg/ml).

### Antibacterial activity

The measurement of the diameter of the inhibition zone allows an estimation of the character of sensitivity or resistance of the bacterial strain to the extract. Table 2 shows that all the bacterial strains are sensitive to very sensitive except *Salmonella* which is resistant, these diameters vary between 11.5 mm and 26 mm. The sensitivity of a microorganism to a natural substance depends on the properties of the last<sup>27</sup>. The MIC values (table 2) are about 3,125 mg/ml for *Bacillus subtilis* ATCC7033, 12.5 mg/ml for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 25 mg/ml in the case of *Escherichia coli* ATCC 25922 and 50 mg/ml for the other three: *Enterococcus faecalis* ATCC 29219 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

The antimicrobial activity of the extracts *Teucrium polium* L. is related to the presence of many bioactive secondary metabolites, especially phenolic compounds<sup>28</sup>. The results of several researches showed an antibacterial activity less important than ours. According to Darabpour et al.<sup>29</sup>, the methanolic extract of *Teucrium polium* L. was tested on some strains, with a concentration of 600 mg/ml. their results showed that the diameter of inhibition of the strains: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* are equal to 9 mm, while the strain *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium* showed a certain sensitivity since the diameter of inhibition reached 15 mm and 16 mm, respectively. In another study, the methanolic and aqueous extracts of *Teucrium polium* L. at a concentration of 2 mg/ml proved a total growth of the strains which can be explained by a lack of their biological activities<sup>30</sup>. The MIC values obtained by Darabpour et al.<sup>29</sup> were 40 mg/ml for *Staphylococcus aureus* and higher than 200 mg/ml for *Salmonella typhimurium*.

## CONCLUSION

A large number of aromatic plants contain chemical compounds having antioxidant and antimicrobial

Table 1: The total polyphenol values in (mg EGA/gDM) and the concentration of the flavonoids (mg EC/g DM) and the antioxidant activity (IC50 in  $\mu$ g/ml) of the extract of *Teucrium polium* L.

Methanolic extract of <i>Teucrium polium</i> L.	Polyphenol	flavonoid	Antioxidant			
			DPPH		FRAP	
			Methanolic extract	Ascorbic acide	Methanolic extract	Ascorbic acide
	$288.41 \pm 1.83$	$200.24 \pm 2.46$	23.09	0.37	32	2.04

Table 2: Diameter of the inhibition zones (mm) and the minimal inhibition concentration (mg/ml).

Bacterial strain	inhibition zone diameter (mm)	Minimal inhibition concentration (mg/ml)
Bacillus subtilis ATCC 7033	26	3.125
Escherichia coli ATCC 25922	16	25
Enterococcus faecalis ATCC 29219	12	50
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	15.5	50
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	19.5	12.5
Salmonella typhimurium ATCC10428	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	11.5	50

properties. In this context, we tried to evaluate, *in vitro*, biological activities (antibacterial and antioxidant) of the methanolic extract of *Teucrium polium* L., beginning with a quantitative identification of polyphenols and flavonoids in this extract. The methanolic extract exhibited an important antioxidant and antibacterial activities and this is probably due to its high polyphenol and flavonoid contents.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

I thank all the people who helped me to realize this work.

#### REFERENCE

- Belmekki N, Bendimerad N, Bekhechi C, Xavier Fernandez X. Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria. *J. Med. Plants Res* 2013 7(14) : 897-902
- Quezel P, et Santa S, Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Centre National de la Recherche Scientifique, Tome 2, Paris, 1963, 788
- Alzeweiri M, Al Sarhan A, Mansi K, Hudaib M, Aburjai T, Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Northern Badia Region, *Journal of ethnopharmacology*, 2011, 137: 27-35
- Shahraki MR, Arab MR, Mirimokaddam E, Palan MJ. The effect of *Teucrium polium* (Calpoureh) on liver function, serum lipids and glucose in diabetic male rats. *Iran biomed* 2007, 11(1) :65-8. 2007
- El Amri F, Rhallab A, Alaoui T, ElBasaoui K, Chakir S. Etude ethnopharmacologique de quelques plantes utilisées dans le traitement du diabète dans la région de Meknès-Tafilalet (Maroc), *Phytothérapie* 2010, 8 :161-165
- Hasani P, Yasa N, Vosough\_ghanbari S, Mohamammadirad A, Dehghan G, Abdollahi M. In vivo antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to alpha-tocopherol, *Acta pharm* 2007, 57: 123-129.
- Seladji M, Bekhechi C, Beddou F, DIB H, BENDIMERAD N. Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2014, 4(02): 12-16
- Singleton C P, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 1965, 16 : 144-158
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 1999. 64(4) :555-559.
- Laleh K, Sedigheh B, Abbas D, Hossein N. Antioxidant, Total Phenol and Flavonoid Contents of Two *Pedicularis* L. Species from Eastern Azerbaijan, Iran. *BioImpacts* 2012, 2(1): 47-53.
- Boulila A, Mattoussi K, M'rabet Y, Boussaid M. Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of Tunisian *Lycium intricatum* Boiss, *Food chemistry* 2015, 174: 577-584
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging affects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1988, 36 : 2090-2097.
- Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr* 1986, 44: 307-315.
- Isabel C.F.R.Ferreira, Paula B, Miguel V.B, Lillian B. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity, *Food Chemistry* 2007, 100(4) :1511-1516
- Elaissi A, Rouis Z, Abid Ben Salem N, Mabrouk S, Ben Salem Y, Bel Haj Salah K, Aouni M, Farhat F, Chemli R, Harzallah-Skhiri F, Larbi Khouja M. Chemical composition of 8 eucalyptus species essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities, *complementary & Alternative Medicine* 2012, 12:81-96
- Nassim D, Vanina L, Elodie G, Stéphane A, Marie-Cécile G, Jean-Marie D, Jean-Michel B, Jean C, Liliane B, Anne L, Alain M. Phytochemical composition of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxic-infectious pathogens, *Food Control* 201. 30:354-363
- Irith W, Kai H, Robert E, Hancock W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *natural protocols* 2008. 3(2): 163-175.
- Milan S.S, Neda N, Vladimir M, Marina T, Slavica. Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *Polium*, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 2012. 81(2):117-122.
- Amin A, Razieh Y. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein

- glycooxidation, Food and Chemical Toxicology 2007,45:2402-2411.
20. Al Bahti NH. *Teucrium polium* Extracts Jordanian Ja'adeh. Asian Journal of Agricultural Sciences 2012,4(6): 379-382
  21. Kumarasamy Y, Byres M, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD. Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. Phytother Res. 2007, 21(7):615- 621.
  22. Zarena AS, Sankar KU. A study of antioxidant properties from *Garcinia mangostana*L. pericarp extract. Acta Sci Pol Technol Aliment 2009. 8 : 23-34.
  23. Mohsen SM, Ammar ASM. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. Food Chem 2009. 112(3):595-598.
  24. Bedir, E., Tasdemi, D., Çalis, I., Zerbe, O., & Sticher, O. Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium*. Phytochemistry 1999, 51: 921–925.
  25. Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. Food Chemistry 2009. 112:885-888.
  26. Ahmed H, Al-Mustafa, Osama Y, Antioxidant Activity of Some Jordanian Medicinal Plants Used Traditionally for Treatment of Diabetes, Pakistan Journal of Biological Sciences 2008, 11(3): 351-358
  27. Fertout-Mouri N, Latrèche A, Mehdadi Z, Toumi-Bénali F, Khaled M.B. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Teucrium polium* L. of Tessala Mount (Western Algeria), Phytothérapie 2016: 1-7
  28. Kizil S, Sogut T. Investigation of Antibacterial Effects of Some Spices. Crop Research. 2003, 25(1): 86-90.
  29. Darabpour E, Motamedi H, Mansour Seyyed Nejad S, Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2010: 124-127.
  30. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria “*in vitro*”, Journal of Paramedical Sciences 2013, 4(4): 58-62.