

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJIMOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY

RSITE BADJI MOKHTAR- ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

Année: 2017

Faculté des Sciences
Département de Chimie

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en Chimie

Option : Synthèse et Développement de Molécules Bioactives

THEME

**Etude phytochimique de quelques plantes
de la Numidie Algérienne**

Par :

M^{lle}. KADRI Hadjer

Devant le jury :

Président :	Pr. DJEROUROU Abdelhafid	Univ- Badji Mokhtar-Annaba
Encadreur :	Pr. DJILANI Salah Eddine	Univ- Badji Mokhtar-Annaba
Examineurs :	Pr. KABOUCHE Zahia	Univ- Mentouri-Constantine 1
	Pr. KADRI Mekki	Univ- 08 Mai 1945-Guelma
	Pr. AOUF Nour-Eddine	Univ- Badji Mokhtar-Annaba

Dédicace

A la mémoire de mon défunt Papa **BRAHIM ..**

A ma très chère **Maman**

Ma source de tendresse, aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis toujours.

A mon très cher frère **MOHAMED AMINE** présent dans tous mes moments d'examens par son soutien moral et ces encouragements.

A tous les membres de ma famille et mes ami(e)s qui m'ont beaucoup aidé et qui ont toujours cru en moi.

Merci pour vos encouragements, votre soutien moral, dont je suis reconnaissante. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur.

Remerciements

Le grand Merci ..

- A Monsieur **DJILANI Salah Eddine**, Professeur - Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique (LSBO), Université Badji Mokhtar, Annaba– directeur de cette thèse, pour son encadrement, sa disponibilité, sa compétence et son sens du devoir.
- Monsieur **DJILANI Abdelouaheb**, Professeur - Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique (LSBO), Université Badji Mokhtar, Annaba– en me proposant ce thème, pour m'avoir guidé pendant ces années de recherche et pour ses judicieux conseils.
- Mes sincères remerciements au Monsieur **DJEROUROU Abdelhafid**, Professeur et Directeur du Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique (LSBO), Université Badji Mokhtar, Annaba– d'avoir accepté d'être président de jury.

J'aimerais également remercier les examinateurs:

- Madame **KABOUCHE Zahia**, Professeur et Directeur du Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), Université des frères Mentouri , Constantine.
- Monsieur **KADRI Mekki**, Professeur et Directeur du Laboratoire de Chimie Physique (LCP), Université 08 Mai 1945-Guelma.
- Monsieur **AOUF Nour-eddine**, Professeur et Directeur du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée (LCOA), Université Badji Mokhtar, Annaba–

Merci d'avoir accepté me donner de votre temps pour juger cette thèse malgré vos obligations professionnelles.

- Ainsi au Monsieur **DICKO Amadou**, Professeur - Laboratoire de Chimie et de Méthodologie de l'Environnement (LCME), Université de Lorraine, Metz, France–, de m'avoir accueilli dans son laboratoire aussi pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses précieux conseils.

- Sans oublier Monsieur **DJAHOUDI Abdelghani**, Professeur - Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar, Annaba-, pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé et pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

- Monsieur **LAYEB Hatem**, Docteur - Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique (LSBO), Université Badji Mokhtar, Annaba-, pour son aide précieuse, ses conseils et son soutien moral.

- Mlle. **MELIANI Saïda**, doctorante au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar –Annaba, pour son aide et son sérieux.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

ملخص.....	I
Abstract.....	II
Résumé.....	III
Abréviation.....	IV
Table des figures.....	VI
Liste des tableaux.....	IX
Introduction.....	1

Partie I

Chapitre 1: Etude botanique des plantes étudiées.....	3
I- Les plantes en Algérie.....	3
II- Description des plantes étudiées.....	4
II-1. <i>Daucus carota ssp.maritima</i>	4
II-1-1. Description botanique.....	5
II-1-2. Classification.....	7
II-1-3. Constitution chimique.....	8
II-1-4. Quelques utilisations de la plante.....	9
II-2. <i>Ammi visnaga</i>	10
II-2-1. Description botanique.....	10
II-2-2. Classification.....	12
II-2-3. Constitution chimique.....	13
II-2-4. Quelques utilisations de la plante.....	14
II-3. <i>Arisarum vulgare</i>	15
II-3-1. Description botanique.....	16
II-3-2. Classification.....	18
II-3-3. Constitution chimique.....	19
II-3-4. Quelques utilisations de la plante.....	20
Chapitre 2: Les métabolites secondaires.....	21
I- Classification des métabolites.....	21
I-1. Métabolites primaires.....	21
I-1-1. Définition.....	21
I-1-2. Classification.....	21
• Les protéines.....	22
• Les lipides.....	22
• Les hydrates de carbone.....	22
I-2. Métabolites secondaires.....	22
I-2-1. Définition.....	22
I-2-2. Classification.....	22
• Terpènes.....	23

• Alcaloïdes.....	24
• Composés phénoliques.....	24
II- Les composés phénoliques.....	25
II-1. Les non flavonoïdes.....	25
• Les saponines.....	25
• Les acides phénoliques.....	26
• Les tanins.....	27
• Les lignanes.....	28
• Les coumarines.....	29
• Les stérols.....	29
• Les stéroïdes.....	29
II-2. Les flavonoïdes.....	30
• Les flavonoïdes.....	30
• Les anthocyanes.....	32
III- Rôle et intérêt des composés phénolique.....	33
Chapitre 3: Méthodes d'analyse physico-chimiques.....	35
I- Etude par spectrophotométrie (UV-visible).....	35
I-1. Principe.....	35
I-2. Appareillage et technique.....	36
II- Etude par chromatographie.....	37
II-1. Principe.....	37
II-2. La chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).....	38
II-2-1. Définition.....	38
II-2-2. Appareillage et technique.....	38
II-2-3. Choix de Solvants.....	38
II-3. La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).....	39
II-3-1. Définition.....	39
II-3-2. Appareillage et technique.....	39
Chapitre 4: Etude de quelques activités biologiques.....	41
I- Activité antioxydante.....	41
I-1. Mécanisme d'action.....	41
I-2. Les antioxydants.....	43
I-2-1. Les antioxydants endogènes.....	43
• Les antioxydants enzymatiques.....	43
• Les antioxydants non enzymatiques.....	43
I-2-2. Les antioxydants exogènes.....	44
• Les antioxydants synthétiques.....	44

• Les antioxydants naturels.....	44
I-3. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante.....	44
a) Le test du DPPH.....	45
b) Le test d'ABTS.....	45
c) Le test TPTZ.....	47
II- Activité antibactérienne.....	48
II-1. Définition et caractéristiques des bactéries.....	48
II-2. Les antibiotiques.....	49
II-3. Sources d'antibiotiques.....	49
II-4. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne (l'antibiogramme).....	50
a) Méthode de diffusion.....	50
b) Méthode de dilution.....	50
II-5. Présentation des micro-organismes testés.....	51
a) <i>Escherichia coli</i>	51
b) <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase.....	51
c) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
d) <i>Staphylococcus aureus</i>	52
e) <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline MRSA.....	53

Partie II: Partie expérimentale

Chapitre 1: matériel et méthodes.....	54
I- Origine et période de récolte.....	54
II- Screening phytochimique.....	55
III- Dosage des composés phénoliques.....	57
III-1. Préparation des extraits.....	58
III-2. Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	58
III-2-1. Principe.....	58
III-2-2. Mode opératoire.....	58
III-3. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT).....	59
III-3-1. Principe.....	59
III-3-2. Mode opératoire.....	59
IV- Caractérisation de quelques composés phénoliques.....	60
IV-1. Préparation des extraits.....	60
IV-2. Préparation des standards.....	62
IV-3. Appareil et conditions d'analyse.....	63
IV-3-1. Paramètres de séparation.....	63
IV-3-2. Gradient d'élution.....	63
IV-3-3. Paramètre d'ionisation et de détection.....	63
V- Caractérisation des terpènes.....	64
V-1. Préparation des extraits.....	64
V-2. Appareil et conditions d'analyse.....	64

V-3. Paramètres de séparation.....	64
VI- Etude de l'activité antioxydante.....	65
VI-1. Préparation des extraits.....	65
VI-2. Méthodes utilisées.....	65
VI-2-1. Test DPPH.....	65
• Principe.....	65
• Mode opératoire.....	66
VI-2-2. Test ABTS.....	67
• Principe.....	67
• Mode opératoire.....	67
VII- Etude des activités antimicrobiennes.....	67
VII-1. Préparation des extraits.....	68
VII-2. Micro organismes testés.....	68
VII-3. Méthode utilisée.....	68
VII-4. Principe.....	68
VII-5. Mode opératoire.....	69
Chapitre 2: Résultats et discussion.....	71
I- Screening phytochimique.....	71
II- Dosage des composés phénoliques.....	73
II-1. Dosage des polyphénols totaux.....	74
II-2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	75
III- Identification des composés phénoliques par LC-MS.....	77
III-1. Analyse des extraits de <i>Daucus carota ssp.maritima</i>	78
III-2. Analyse des extraits <i>Ammi visnaga</i>	81
III-3. Analyse des extraits <i>Arisarum vulgare</i>	82
III-4. Analyse des extraits issus de l'extraction classique des flavonoïdes.....	83
IV- Identification des terpènes par GC-MS.....	86
V- Evaluation de l'activité antioxydante.....	90
VI- Etude de l'activité antibactérienne.....	95
VI-1. Activité antibactérienne des extraits de <i>Daucus carota ssp. maritima</i>	95
VI-2. Activité antibactérienne des extraits d' <i>Ammi visnaga</i>	100
VI-3. Activité antibactérienne des extraits d' <i>Arisarum vulgare</i>	104
Conclusion et perspectives.....	111
Références Bibliographiques.....	113
Annexe.....	126

ملخص

إن الهدف الرئيس من هذا البحث هو تقييم ثلاثة نباتات برية من الغطاء النباتي للشمال الجزائري وهي:

Arisarum vulgare و *Daucus carota ssp.maritima*, *Ammi visnaga*

ينقسم هذا العمل إلى قسمين رئيسيين، قسم فيتوكيميائي وقسم بيولوجي. في القسم الأول، عملنا الى تحديد بعض المركبات الفينولية والتربينية الموجودة في مستخلصات من الميثانول و الماء / ميثانول (7/3) لعدة أجزاء من النبات وذلك باستخدام اثنان من الطرق الكروماتوغرافية: LC-MS و GC-MS . بالإضافة إلى ذلك، قمنا بتكميم البوليفينولات الإجمالية والفلافونويدات الإجمالية و لقد أظهر مجموع القيم المتحصل عليها، ثراء هذه النباتات بمضادات الأكسدة، وهو الاستنتاج الذي دعمته دراسة القدرة المضادة للأكسدة باستخدام اختباران (DPPH و ABTS)

تم في القسم الثاني اختبار المستخلصات السابقة في المختبر، وظهرت النتائج بان معظمها يملك نشاط مضاد للبكتيريا على عدة سلالات بكتيرية.

الكلمات الدالة

نباتات برية - GC-MS - LC-MS -البوليفينول - النشاط المضاد للأكسدة - النشاط المضاد للجراثيم.

Abstract

The main objective of this work is the valorization of three spontaneous and toxic plants of the flora of the Algerian north namely: *Daucus carota ssp.maritima*, *Ammi visnaga* and *Arisarum vulgare*.

It is divided into two parts; phytochemical part and biological part. In the first part, the identification of some phenolic and terpene compounds from the methanolic and hydromethanolic (7/3) extracts of the various organs were carried out, using two chromatographic techniques: LC-MS and GC-MS. In addition, measurements of total polyphenols and total flavonoids were completed and the found values showed the richness of this plant in antioxidants, conclusion supported by evaluation of the antioxidant capacity determined by using two tests (ABTS and DPPH).

In the second part, the preceding extracts were tested *in vitro* and the majority of them showed antibacterial activities on several bacterial strains.

Keywords

Toxic plants, LC-MS, GC-MS, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Résumé

L'objectif principal de ce travail est la valorisation de trois plantes spontanées et toxiques de la flore du nord algérien à savoir : *Daucus carota ssp.maritima*, *Ammi visnaga* et *Arisarum vulgare*.

Il est divisé en deux parties ; partie phytochimique et partie biologique. Dans la première partie, on a procédé à l'identification de quelques composés phénoliques et terpéniques présents dans les extraits méthanoliques et hydro-méthanoliques (7/3) des différents organes, en utilisant deux techniques chromatographiques : LC-MS et GC-MS. En outre, les quantifications des polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux ont été réalisés et les valeurs trouvées ont montré la richesse de cette plante en antioxydants, conclusion corroborée par l'évaluation de la capacité antioxydante déterminée en utilisant deux tests (ABTS et DPPH).

Dans la seconde partie, les extraits précédents sont testés *in vitro* et la majorité d'entre eux ont manifesté des activités antibactériennes sur plusieurs souches bactériennes.

Mots clés

Plantes toxiques, LC-MS, GC-MS, polyphénols, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abréviation

H₂O	Eau
HCl	Acide chlorhydrique
NH₄OH	Ammoniaque, ou hydroxyde d'ammonium
FeCl₃	Chlorure de fer
CHCl₃	Trichlorométhane ou Chloroforme
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
C₂H₅OH	Ethanol
CH₃COOH	Acide acétique
H₂SO₄	Acide sulfurique
ml	Millilitre
G	Gramme
PPT	Polyphénols totaux
FVT	Flavonoïdes totaux
NaNO₂	Nitrite de sodium
Na₂CO₃	Carbonate Sodium
AlCl₃	Chlorure d'aluminium
NaOH	Hydroxyde de sodium
mg/l	Milligramme par un litre
Nm	Nanomètre
P	Poids
V	Volume
NaOH	Hydroxyde de sodium
Mg	Milligramme
T	Temps
C	Concentration
A	Absorbance
mg EAG/ 100g MS	Milligrammes équivalents d'acide gallique par rapport à 100 g de matière sèche
mg EC/ 100g MS	Milligrammes équivalents de catéchine par rapport à 100 g de matière sèche
H	Heure
MeOH	Méthanol

BuOH	Butanol
AcOEt	Acétate d'éthyle
UV-VIS	Ultraviolet-visible
LC-MS	Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
M	Masse molaire
µm	Micromètre
Mm	Millimètre
µL	Microlitre
°C	Degré Celsius
%	Pourcentage
Min	Minute
kV	Kilovolt
Tr	temps de rétention
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
eV	Electron volt
ATB	Antibiotique
ABTS	Acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
DPPH	2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle
(NH₄)₂S₂O₈	Ammonium persulfate
mg EVC/ 100 g MS	milligrammes équivalents de vitamine C par rapport à 100 g de Matière Sèche
DCM	<i>Daucus carota ssp.maritima</i>
Ammi V.	<i>Ammi visnaga</i>
A.V	<i>Arisarum vulgare</i>

Liste des figures

Figure 01: Image descriptive du <i>Daucus carota ssp.maritima</i>	6
Figure 02: Fleur du <i>Daucus carota ssp.maritima</i>	7
Figure 03: Structure de quelques composés identifiés dans les extraits de <i>Daucus carota ssp.maritima</i>	9
Figure 04: Image descriptive de l' <i>Ammi visnaga</i>	11
Figure 05: <i>Ammi visnaga</i>	12
Figure 06: Structure de quelques composés identifiés de l' <i>Ammi visnaga</i>	14
Figure 07: Image descriptive de l' <i>Arisarum vulgare</i>	17
Figure 08: Fleurs de l' <i>Arisarum vulgare</i>	17
Figure 09: Graines de l' <i>Arisarum vulgare</i>	18
Figure 10: Structure de quelques composés identifiés pour l' <i>Arisarum vulgare</i> ..	20
Figure 11: Structure de base des terpènes.....	23
Figure 12: Structure de base des alcaloïdes.....	24
Figure 13: Structure de base de polyphénols.....	25
Figure 14: Structure exemple de saponines.....	26
Figure 15: Exemple de quelques acides phénoliques de la série benzoïque.....	26
Figure 16: Exemple de quelques acides phénoliques de la série cinnamique.....	27
Figure 17: Structure de l'acide gallique.....	27
Figure 18: Structure des tanins condensés.....	28
Figure 19: Structure des dérivés des lignanes.....	28
Figure 20: Structure de la coumarine.....	29
Figure 21: Structure de la squalène.....	30
Figure 22: Structure du cortisol.....	30
Figure 23: Squelette de base des flavonoïdes	31
Figure 24: Les différents types de flavonoïdes.....	31
Figure 25: Les différents types des anthocyanes	32
Figure 26: schéma simple d'un spectrophotomètre UV-VIS.....	36
Figure 27: Modèle de système LC-MS.....	38
Figure 28: Modèle de système GC-MS.....	40
Figure 29: Mécanisme de production de quelque ROS.....	42
Figure 30: Forme libre et réduite du DPPH.....	45
Figure 31: Oxydation partielle de l'ABTS.....	46

Figure 32: Formation et piégeage du radical ABTS+ par un antioxydant.....	47
Figure 33: Localisation géographique du Parc National d'El Kala.....	55
Figure 34: Structure de la catéchine.....	58
Figure 35: Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	61
Figure 36: Réaction de test DPPH.....	66
Figure 37: Acide ascorbique (vitamine C).....	66
Figure 38: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	73
Figure 39: Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	73
Figure 40: Teneurs en polyphénols totaux des différents parties des plantes exprimés en mg EGA/100g MS.....	75
Figure 41: Teneurs en flavonoïdes totaux des différents parties des plantes exprimés en mg EC/100g MS.....	76
Figure 42: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait hydro-méthanolique des fleurs de <i>Daucus carota</i>	79
Figure 43: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait méthanolique des fleurs de <i>Daucus carota</i>	79
Figure 44: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de <i>Daucus carota</i>	80
Figure 45: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Daucus carota</i>	80
Figure 46: Profil chromatographique (LCMS) de la phase d'éther diéthylique des graines de l' <i>Arisarum vulgare</i>	84
Figure 47: Profil chromatographique (LCMS) de la phase d'acétate d'éthyle des graines d' <i>Arisarum vulgare</i>	84
Figure 48: Profil chromatographique (LCMS) de la phase n- Butanol de l' <i>Arisarum vulgare</i>	85
Figure 49: Profil chromatographique (LCMS) de la phase aqueuse de l' <i>Arisarum vulgare</i>	85
Figure 50: Profil chromatographique (GCMS) des fleurs de <i>Daucus carota</i>	87
Figure 51: Profil chromatographique (GCMS) des fleurs d' <i>Ammi visnaga</i>	87
Figure 52: Profil chromatographique (GCMS) des feuilles d' <i>Ammi visnaga</i>	88
Figure 53: Courbe de la vitamine C en utilisant le test DPPH.....	90
Figure 54: Courbe de la vitamine C en utilisant le test ABTS.....	91
Figure 55: Histogramme de la capacité antioxydante exprimée en mg EVC/100g MS déterminée par le test DPPH.....	93
Figure 56: Histogramme de la capacité antioxydante exprimée en mg EVC/100g MS déterminée par le test ABTS.....	94
Figure 57 : Histogramme de la capacité antibactérienne des extraits des feuilles de <i>Daucus carota maritima</i>	99

Figure 58: Histogramme de la capacité antibactérienne des extraits des fleurs d' <i>Ammi visnaga</i>	103
Figure 59: Histogramme de la capacité antibactérienne des extraits des feuilles d' <i>Arisarum vulgare</i>	108
Figure 60: Quelques exemples de l'effet antibactérien des plantes étudiées avec différents germes.....	110
Figure 61: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait 7/3 des fleurs d' <i>Ammi visnaga</i>	126
Figure 62: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait MeOH des fleurs d' <i>Ammi visnaga</i>	126
Figure 63: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait 7/3 des feuilles d' <i>Ammi visnaga</i>	127
Figure 64: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait MeOH des feuilles d' <i>Ammi visnaga</i>	127
Figure 65: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait 7/3 des graines d' <i>Arisarum vulgare</i>	128
Figure 66: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait MeOH des graines d' <i>Arisarum vulgare</i>	128
Figure 67: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait 7/3 des fleurs d' <i>Arisarum vulgare</i>	129
Figure 68 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait MeOH des fleurs d' <i>Arisarum vulgare</i>	129
Figure 69 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait 7/3 des feuilles d' <i>Arisarum vulgare</i>	130
Figure 70 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait MeOH des feuilles d' <i>Arisarum vulgare</i>	130

Liste des tableaux

Tableau 01: Classification de <i>Daucus carota ssp.maritima</i>	7
Tableau 02: Classification de l' <i>Ammi visnaga</i>	12
Tableau 03: Classification de la plante <i>Arisarum vulgare</i>	18
Tableau 04: Activités biologiques de quelques composés phénoliques.....	34
Tableau 05: Quelques plantes à activité antimicrobienne.....	50
Tableau 06: Etalons standards utilisés (LCMS).....	62
Tableau 07: Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition.....	70
Tableau 08: Résultats du criblage phytochimique des différents organes des plantes étudiées.....	72
Tableau 09: Teneurs en polyphénols totaux.....	74
Tableau 10: Teneur en flavonoïdes totaux.....	76
Tableau 11: Temps de rétention des standards.....	78
Tableau 12: Résultats de l'analyse chromatographique de <i>Daucus carota</i>	81
Tableau 13: Analyse qualitative des extraits des différentes parties d' <i>Ammi visnaga</i>	82
Tableau 14: Analyse qualitative des extraits des différentes parties d' <i>Arisarum vulgare</i>	83
Tableau 15 : Analyse qualitative des extraits d' <i>Arisarum vulgare</i>	86
Tableau 16: Analyse qualitative des terpènes.....	88
Tableau 17: Capacité antioxydante exprimée en mg EVC/100g MS déterminée par le test DPPH.....	91
Tableau 18: Capacité antioxydante exprimée en mg EVC/100g MS déterminée par le test ABTS.....	92
Tableau 19: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des fleurs de <i>Daucus carota maritima</i>	97
Tableau 20: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des feuilles de <i>Daucus carota maritima</i>	98
Tableau 21: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des fleurs d' <i>Ammi visnaga</i>	101
Tableau 22: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des feuilles d' <i>Ammi visnaga</i>	102
Tableau 23: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des graines d' <i>Arisarum vulgare</i>	105
Tableau 24: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des fleurs d' <i>Arisarum vulgare</i>	106
Tableau 25: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des feuilles d' <i>Arisarum vulgare</i>	107

Introduction

Introduction

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'Homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois même dans ses rites religieux, car ils avaient attribué un pouvoir qui d'ailleurs n'est pas sans valeur psychothérapeutique [1-3].

L'histoire des plantes et leurs utilisations sont associées à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que les plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. La Chine, berceau de la phytothérapie, l'Inde, le Moyen-Orient, notamment au cours de l'ère arabo-musulmane, l'Égypte, la Grèce, Rome, constituent des civilisations phares chez lesquelles les plantes aromatiques et médicinales ont occupé une place de premiers choix [4].

C'est ainsi que depuis quelques années et à travers le monde nous assistons à un regain d'intérêt pour l'utilisation des plantes comme médicament à action lente et douce et même parfois mieux tolérée par l'organisme que les médicaments de synthèse, ou une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes.

La recherche sur les substances naturelles est une pratique fondée sur les avancées et les preuves scientifiques qui recherchent des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, leur circulation est soumise à l'autorisation de mise sur le marché pour les produits finis, et à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique pour les préparations magistrales de plantes médicinales, celles-ci étant délivrées exclusivement en officine. On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique [4,5].

Dans le cadre de l'exploitation et de la valorisation des substances naturelles des plantes de la flore de la Numidie Algérienne qui est particulièrement riche en plantes médicinales et aromatiques [6], nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de trois plantes spontanées et toxiques du nord est Algérien : *Daucus Carota ssp. maritima*, *Ammi Visnaga* et *Arisarum Vulgare*, en évaluant quelques activités pharmacologiques de leurs divers extraits.

Le présent travail est scindé en deux grandes parties. La première, sous forme d'une synthèse bibliographique, est composée de quatre chapitres :

Le chapitre I rapporte pour les trois plantes étudiées, la description botanique, la composition chimique et quelques utilisations de chaque plante.

Le chapitre II est réservé aux métaboliques secondaires : classification, présentation des principales familles, rôle et intérêt des composés phénoliques.

Le chapitre III se focalise sur deux propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires : activité antioxydante et activité antimicrobienne. Après avoir présenté quelques généralités sur ces deux activités biologiques, on a décrit le mode d'action, les méthodes de détermination et les tests spécifiques de chaque activité.

Le dernier chapitre constitue une description des techniques analytiques utilisées dans ce travail. Il s'agit particulièrement de la spectrophotométrie et les méthodes chromatographiques : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

La seconde partie, qui est la partie expérimentale, compte deux chapitres, le matériel et la méthode de travail (préparation des différents extraits, screening phytochimique, dosage des polyphénols et des flavonoïdes, analyses chromatographiques ainsi que les méthodes d'étude des activités antioxydante et antibactérienne font l'objet du premier chapitre. Les principaux résultats obtenus suivis des discussions sont présentés dans le deuxième chapitre, il représente le cœur de notre travail.

Nous terminons notre manuscrit par une conclusion.

Partie I:
Partie bibliographique

Chapitre 1

CHAPITRE – 1 –

ETUDE BOTANIQUE DES PLANTE ETUDIEES

Le royaume végétal contient environ 300 000 espèces et se divise en deux grands groupes :

- plantes supérieures

Tout végétal ayant des vaisseaux, et des cellules contenant de la cellulose et possède : des racines, des feuilles, des tiges, des fleurs et des graines.

- Plantes inférieures

Tout végétal dépourvu de vaisseaux, de feuilles, de fleurs, de racines, de tiges et de graines comme les Thallophytes.

En ayant des feuilles et des tiges mais n'ayant ni racines ni fleurs, ni graines comme les Bryophytes.

Après le développement de la science et des techniques ; une nouvelle classification des plantes est apparue : les plantes sont divisées selon leur importance dans la vie quotidienne ; les plantes alimentaires, fourragères, médicinales et les décoratives [7].

I. Les plantes en Algérie

La flore d'Algérie, celle des plantes spontanées ou indigènes, est riche de plusieurs milliers d'espèces botaniques appartenant au domaine de la flore d'Afrique du nord. Elle se compose d'une partie de la flore méditerranéenne et est un sous-ensemble de la flore d'Afrique.

L'Algérie fait partie du climat méditerranéen qui est caractérisé par une longue période de sécheresse estivale variant de 3 à 4 mois sur le littoral, de 5 à 6 mois au niveau des Hautes Plaines et supérieur à 6 mois au niveau de l'Atlas Saharien. Etant donnée son extension en latitude, le territoire algérien touche plusieurs zones climatiques. Tous les bioclimats méditerranéens (humide, subhumide, semi-aride aride et saharien) sont ainsi représentés. Ces paramètres climatiques provoquent des mécanismes de diversité biologique particulièrement intéressante.

L'Algérie a adopté récemment une loi relative aux ressources biologiques permettant un contrôle strict à l'accès aux ressources génétiques et au transfert du matériel génétique de l'Algérie. Cette loi vient renforcer la conservation et la valorisation des ressources biologiques [site 1].

II. Description des plantes étudiées

II-1. *Daucus carota ssp.maritima* [Acronyme international GDB: Id-013_05]

Daucus carota ssp.maritima est une plante de la famille des Apiacées ; appelée aussi Ombellifères (*Umbelliferae*, nom alternatif), compte près de 3000 espèces réparties en 420 genres et présentent surtout dans les régions tempérées du monde. C'est une famille relativement homogène caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle et certaines sont toxiques.

La plupart sont des herbes aromatiques avec des feuilles de plumes divisées de rechange qui sont gainés à la base. Les fleurs forment souvent une ombelle aplatie remarquable. Chaque petite fleur individuelle est généralement bisexuelle, avec cinq sépales, cinq pétales, et un disque élargi à la base du style.

Les Apiacées sont généralement des plantes herbacées ou vivaces annuelles, parfois bisannuelles. La famille compte aussi des arbres et arbustes. La tige est souvent creuse et porte à l'extérieur des sillons dans le sens de la longueur.

Les feuilles sont alternes, sans stipules, et le plus souvent composées à folioles finement découpées, mais certaines espèces ont des feuilles entières. Souvent les pétioles sont élargis à leur base, engainant la tige.

L'inflorescence typique des Apiacées, justement appelées ombellifères, est l'ombelle qui peut être simple ou composée d'ombellules, souvent munies à leur base d'un involucre formé de bractées.

Les fleurs, petites, à symétrie pentamère, sont le plus souvent blanches ou jaunâtres, quelque fois rougeâtres comme la fleur centrale de l'ombelle de carotte.

Parfois, les fleurs périphériques de l'ombelle sont irrégulières, avec des pétales externes nettement plus grands, et contribuent à faire de l'ombelle une simili-fleur.

Les fruits, secs, se scindent en deux à maturité, chaque partie contenant une graine. Ils sont très diversifiés par leurs formes externes : présence de crochets ou d'épines, ou de poils, parfois d'ailes, qui sont importantes à observer pour la détermination des espèces.

La famille des Apiacées est présente dans tous les continents habités, mais surtout dans les régions tempérées. Le genre *Daucus* comprend des plantes adventices d'environ 60 espèces, largement diffusées et couramment cultivées pour leurs racines charnues. *Daucus Carota L.ssp. Carota* (carotte sauvage) est indigène en Europe et utilisée comme un antibactérien et comme un stimulant [8].

Certaines espèces des Apiacées sont utilisées dans l'industrie cosmétique [9], vue que cette famille possède de différentes activités biologiques comme l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne et antifongique, l'activité anti tumorale et l'activité spasmolytique, antiseptique, carminative, diurétique, hépato-protecteur, anti-stéroïdogenique [10-14], anticancéreuse, anti-inflammatoire [15-18], ainsi utilisée dans le traitement de la jaunisse et de troubles de l'estomac [19].

II-1-1. Description botanique

Etymologie :

Daucus : emprunt du latin *daucos* (*daucum*) (nom) = à diverses Ombellifères.

Carota : emprunt du latin *carota-ae* (nom) = carotte.

La *Daucus carota ssp.maritima* est une plante bisannuelle herbacée, à tiges poilues ou glabres, souvent striées de 10 cm à 1,5 m. Les feuilles sont alternes composées bipennées ou tripennées, à folioles linéaires ou étroitement lancéolées. Les feuilles de la base pouvant atteindre 30 cm de longueur.

Floraison de mars à juin où les fleurs sont à symétrie radiaire, blanches à rosâtres, réunies en larges ombelles composées planes à nombreux rayons. Les pétales extérieurs des fleurs extérieurs sont plus grands, la fleur du centre est plus grande purpurine. Les fruits sont globuleux, avec une surface épineuse, ovoïdes de 2 à 4 mm de longs.

Sur le plan taxonomique, les carottes cultivées ont été séparées des carottes sauvages à plusieurs niveaux. Les types sauvages se rencontrent en Europe, dans le sud-ouest centre d'Asie, ainsi qu'en Afrique du Nord.

Écologie : Sables de tout le littoral méditerranéen.

Répartition : Espagne ; Italie ; Sardaigne, Sicile ; Afrique septentrionale [site 2].

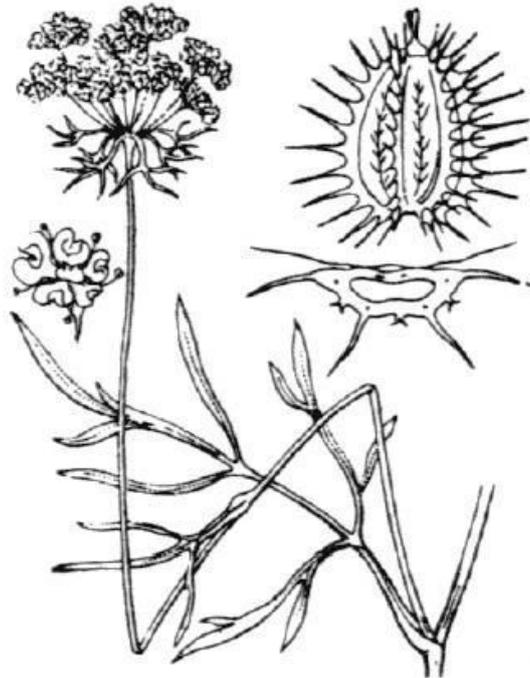


Figure 01 : Image descriptive du *Daucus carota* ssp. *maritima* [site 2].



Figure 02 : Fleurs du *Daucus carota ssp.maritima* [Photo prise mai 2011 par Kadri Hadjer].

II-1-2. Classification

La classification de cette plante est désignée dans le tableau 01 :

Tableau 01 : Classification de *Daucus carota ssp.maritima* [site 2].

Règne	Plantae
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i>
Genre	<i>Daucus</i>
Espèce	<i>Daucus Carota</i>
Sous Espèce	<i>Daucus Carota subsp. Maritima</i>
Nom vernaculaire	<i>Carotte sauvage</i>
Nom retenu	<i>Daucus maritimus Lam</i>

II-1-3. Constitution chimique

La famille des *Apiacées* est connue par ses propriétés pharmacologiques d'après la constitution chimique et les composants identifiés. Les saponines, les polyphénols, et les alcaloïdes sont des métabolites secondaires caractéristiques de cette famille.

Les *Apiacées* ont été signalé comme étant une famille très riche en anthocyanes, flavonoïdes, coumarines [20] et les dérivés d'acide p-hydroxybenzoïque comme l'acide 4-(β -D-glucopyranosyloxy) benzoïque [21].

Des études ont montré que l'huile des graines de cette espèce contient des alcools sesquiterpéniques comme le trans-dauc-8-ène-4b-ol, le trans-dauca-8,11-diène, le dauca-5,8-diène, l'acora-4,9-diène et l'acora-4,10-diène, le carotol, le daucol, et des furocoumarine qui ont été identifiés également [22-24].

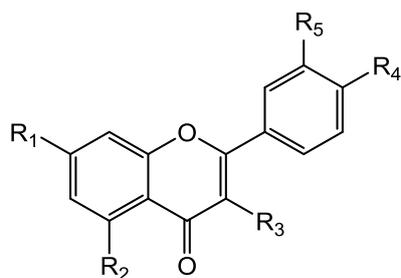
De plus les principaux constituants isolés à partir de l'extrait méthanolique des graines de *Daucus carota* étaient trois flavones : lutéoline, lutéoline 3 -O- β - D-glucopyranoside et lutéoline 4 -O- β - D-glucopyranoside [25].

D'autres recherches ont révélé la présence de (figure 03) :

- flavonoïdes, polyacétylènes, huiles grasses, β -carotène [26-28] ;
- ferulenol [27] ;
- falcarindiol 3-acetate, falcarinol, falcarindiol [29] ;
- nouveaux dérivés de daucane sesquiterpène, fercomin, falcarindiol [19, 30, 31].

L'analyse par LC-MS des extraits de la carotte sauvage (*Daucus carota* L. ssp. sativus var. atrorubens Alef.) a révélé la présence de cinq anthocyanes à base de cyanidine : cyanidine 3-xylosyl-glucosyl-galactoside, cyanidine 3-xylosyl-galactoside et les acides sinapique, férulique et coumarique [32].

Concernant la *Daucus carota* ssp. *maritima*, plusieurs composés ont été identifiés comme : xylosylglucosyl galactoside, xylosyl galactoside, feruloylxylosylglucosyl galactoside, p-coumaroylxylosylglucosylgalactoside et le feruloylglucosyl galactoside [33].



Quercetine: $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=OH$

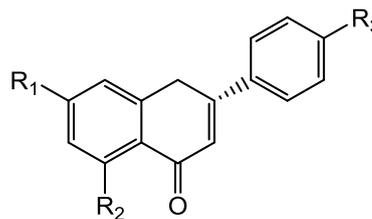
Kaempferole: $R_1=R_2=R_3=R_4=OH$, $R_5=H$

Apigenine: $R_1=R_2=R_4=OH$, $R_3=R_5=H$

Rutine: $R_1=R_2=R_4=R_5=OH$, $R_3=rutinose$

Quercétine-3-O-glucoside: $R_1=R_2=R_4=R_5=OH$,

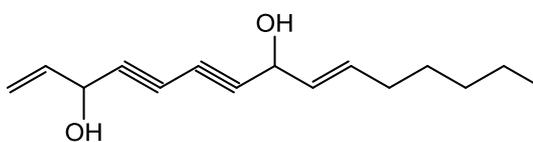
$R_3=\beta\text{-D-glucopyranose}(\beta\text{-Glu})$



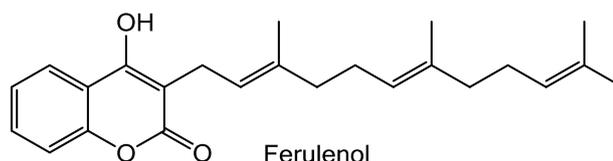
Naringenine: $R_1=R_2=R_3=OH$

Naringenine-7-O-glucoside: $R_1=\text{glucose}$, $R_2=R_3=OH$

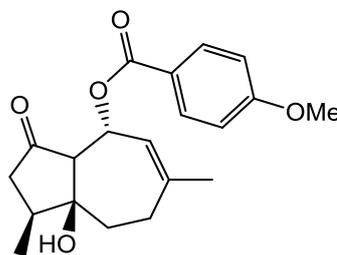
Naringine: $R_1=b\text{-neohesperidose}$, $R_2=R_3=OH$



Falcarindiole



Ferulenol



Fercomin

Figure 03 : Structure de quelques composés identifiés dans les extraits de *Daucus carota ssp.maritima* [19,33].

II-1-4. Quelques utilisations de la plante

Daucus carota est utilisée dans la médecine populaire comme un tonique, apéritif, carminatif, emménagogue et diurétique [34]. Les graines de *Daucus carota* sont utilisées pour le traitement des tumeurs, alors que les racines sont utilisées comme cataplasme dans le carcinome mammaire et utérin, ainsi que le cancer de peau [19].

D'autres utilisations ethnobotaniques de cette espèce ont été signalées : applications dans le traitement de la toux, la diarrhée, la dysenterie, le paludisme, et comme antiseptique, abortif, aphrodisiaque, stimulant et stomachique [25].

II-2. *Ammi visnaga* [Acronyme international GDB: Id-031_30]

II-2-1. Description botanique

Cette plante appartient à la famille des *Apiaceae* (Apiacées).

Etymologie :

Ammi visnaga : dérivé du Aztèques du Mexique nahuatl « *huiznahuac* » qui signifie entouré d'épines, les habitants du Mexique en font garnir les épines d'or et d'argent et s'en servent comme cure-dents [35].

L'Ammi visnaga est une plante ombellifère annuelle robuste de 30 à 90 cm de haut, selon la fraîcheur du terrain, entièrement glabre et verte, à odeur aromatique généralisée dans tous les tissus rappelant nettement celle de la Carotte cultivée.

Feuilles bi- ou tripennatiséquées ; segments des feuilles linéaires, canaliculés. Racine pivotante courte, blanche, Tige rameuse, épaisse, sillonnée surtout au sommet, feuillue tout entière.

Les ombelles comportent de 40 à 80 rayons insérés sur un réceptacle en disque (figure 04), se dilatant à maturité. Involucre et involucelles grands, étalés, à nombreuses folioles divisées en lanières linéaires. Pédoncules (rayons des ombelles) s'épaississant et se courbant vers l'intérieur après la floraison ; à la fin, redressés, connivents par le sommet et indurés. Ils sont alors très aromatiques et constituent les « cure-dents » utilisés par certaines populations.

Fleurs blanches (figure 05) à pétales à deux lobes inégaux à pointe courbée avec styles à la fin réfléchis. Floraison normale de juillet à septembre ; parfois dès le mois de mai (années sèches ou zones xérophiles).

Fruits ovoïdes, comprimés sur le côté, glabres ; à graine petite, brun foncé.

Son aire géographique est la région méditerranéenne proprement dite avec les îles atlantiques : Canaries, Açores et Madère. Elle n'est abondante qu'en Afrique du Nord et en Asie Mineure. Il varie progressivement d'Est (Asie, Egypte) en West (Maroc, Espagne).

Écologie : la région méditerranéenne proprement dite avec les îles atlantiques : Canaries, Açores et Madère

Répartition : abondante qu'en Afrique du Nord et en Asie Mineure. Il varie progressivement d'Est (Asie, Egypte) en West (Maroc, Espagne) [35].



Figure 04 : Image descriptive de l'*Ammi visnaga* [site 3].



Figure 05 : *Ammi visnaga* [Photo prise mai 2011 par Kadri Hadjer]

II-2-2. Classification

L'*Ammi visnaga* est classée selon le tableau 02 suivant :

Tableau 02 : *Classification de l'Ammi visnaga* [site 3].

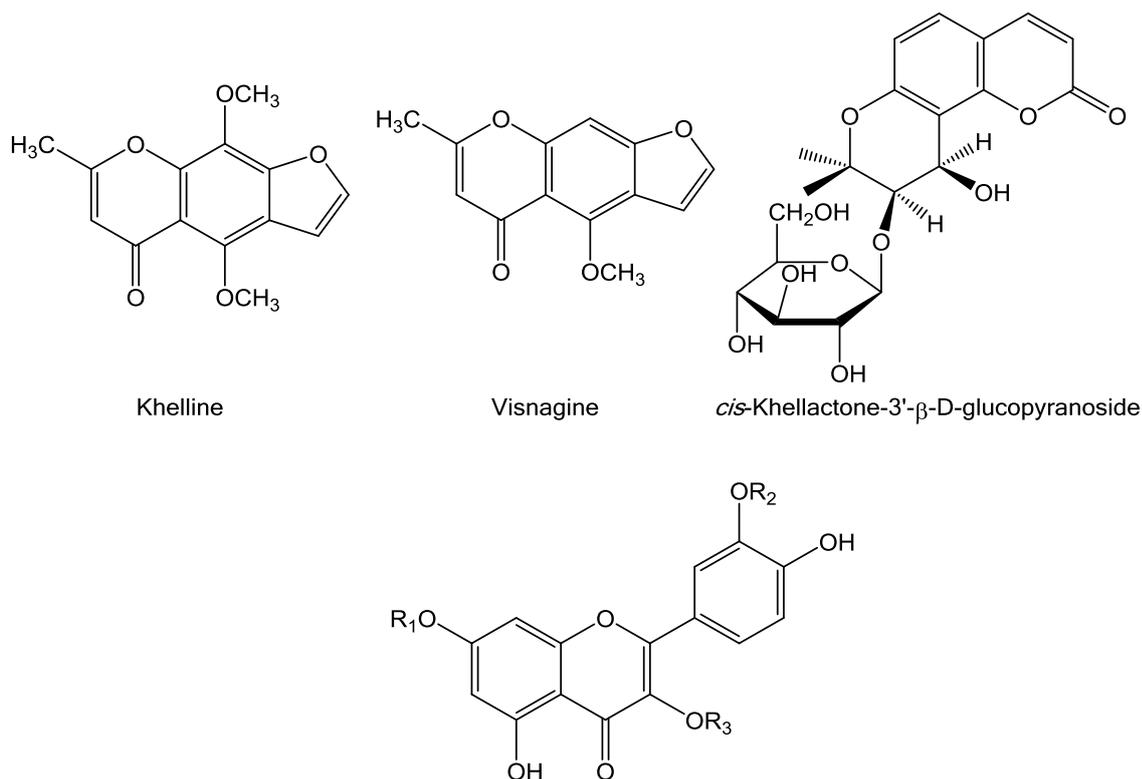
Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i>
Genre	<i>Visnaga</i>
Espèce	<i>Visnaga daucoides</i>
Sous Espèce	<i>Ammi visnaga</i>
Nom vernaculaire	<i>Khella</i>
Nom retenu	<i>Visnaga daucoides</i> Gaertn

II-2-3. Constitution chimique

L'*Ammi visnaga* est connu comme une plante qui contient des huiles essentielles, des flavonoïdes, des anthocyanes, des terpénoïdes et les coumarines [36]. Parmi les composés chimiques qui ont été isolés, on peut citer :

- la Khelline et la Visnagine [37] ;
- la Visnadine, la Cimifugine, la β -sitostérol [38] ;
- le 2-méthyl-5: 8-diméthoxy-6-7-furano-chromone, la Khellinine, le glucoside, le Khellol [35] ;
- les coumarines comme: cis-Khellactone-3'- β -D-glucopyranoside [39], les flavonoïdes comme : la quercétine et le kaempférol (ces deux produits sont connus de leurs activités anti-inflammatoires et antioxydantes élevées) [40], le rhamnétine-3-O-glucosides, rhamnazine-3-O-glucosides, isorhamnétine-7-O-glucoside, quercétine 3-O-rutinoside, quercétine 7,3,3-O-triglucoside connus pour avoir des activités antioxydantes, et antibactérienne [36, 41, 42].
- Les flavonoles comme : les dérivés de l'isorhamnétine (3-glucoside ; 3 Rut, 3-rutinoside) [43].
- Aussi l'*Ammi visnaga* est connue par sa propriété principale autant qu'un antispasmodique causée par la présence du produit majoritaire (furanochromone) de quantité maximale de 0,14 mg/g poids sèche [44, 45].

Nous présentons dans la figure suivante les principaux composés identifiés :



Khelline

Visnagine

cis-Khellactone-3'-β-D-glucopyranoside

Rhamnetine-3-O-glusides: R₁=CH₃, R₂=H, R₃=Glucose
 Rhamnezine-3-O-glusides: R₁=CH₃, R₂=CH₃, R₃=Glucose
 Isorhamnetin-7-O-glucoside: R₁=Glucose, R₂=CH₃, R₃=H
 Quercetine-3-O-rutinoside: R₁=H, R₂=H, R₃=Rutin
 Quercetine-7,3,3-O-triglucoside: R₁=Glucose, R₂=Glucose, R₃=Glucose

Figure 06 : Structure de quelques composés identifiés de l'*Ammi visnaga* [36, 42].

II-2-4. Quelques utilisations de la plante

Dans la partie occidentale de la Méditerranée, les propriétés thérapeutiques de l'*Ammi visnaga* ne paraissent pas connues, sauf l'usage anodin comme cure-dents pour les soins de la bouche (gingivite) ou notant l'effet calmant sur les gencives [35, 42].

Les fruits comme aromatiques, apéritifs, diurétiques, carminatifs et stimulants, propriétés qui s'appliquent plutôt à l'*Ammi* d'Orient dont les graines contiennent une huile essentielle à Thymol bien connue. Il s'ajoute que les médecins arabes préconisent l'*Ammi visnaga* contre l'aménorrhée, la gravelle et extérieurement contre le rhumatisme, la gingivite et la carie dentaire [35], utilisée aussi autant que cardio-vasculaire, support respiratoire / immunitaire, urinaire dans la culture du Moyen-Orient [46].

Dans la médecine traditionnelle de la Syrie jusqu' aujourd'hui l'*Ammi visnaga* est utilisée contre le diabète [47]. Bien connue sous le nom de *Khella*, les usages populaires en Égypte que sont sorties toutes les observations scientifiques qui ont abouti à la découverte de la khelline, qui possède également un pouvoir vasodilatateur puissant au niveau des artères coronaires, utilisée dans les angines de poitrine, l'infarctus du myocarde et l'asthme bronchique. Des études sur d'autres maladies ont été menées et l'on signale déjà que sa toxicité est pratiquement nulle [35].

La décoction des graines de *Khella* est réputée pour avoir plusieurs propriétés curatives, qui est souvent prescrite par les médecins comme diurétique et antispasmodique pour les patients atteints par des pierres urémiques. La plante est également connue pour guérir le vitiligo, le psoriasis, les troubles cardio-vasculaires, l'obstruction légère des voies respiratoires dans l'asthme et les crampes gastro-intestinales [48].

Khella est utilisée également pour le traitement des maladies rénales ainsi que pour la prévention de la formation de calculs rénaux [49, 50].

II-3. *Arisarum vulgare*

Arisarum vulgare est une plante de la famille des *Araceae* (Aracées), qui est une famille de plantes monocotylédones, plantes herbacées parfois arborescentes, connu dans les régions sub-tropicales, tropicales et en nombre réduit, les régions tempérées et la région méditerranéenne.

De nombreuses espèces de cette famille sont utilisées pour leur qualité ornementale en plantes d'appartement, et rares qui sont cultivées à des fins alimentaires.

Les aracées (arums) peuvent être très irritantes et toxiques lors de la mastication à cause de la forte teneur en oxalate qui est sous forme des cristaux de raphides [51, 52].

Les aracées possèdent une inflorescence typique, qui est constituée d'un spadice (axe d'inflorescence), sur lequel sont placées de minuscules fleurs, et d'une large bractée, appelée spathe. Cette dernière est soit complètement étalée soit repliée en forme de cornet ; sa portion inférieure protégeant ainsi la base du spadice.

Les aracées possèdent de différentes activités biologiques comme les activités antioxydante, antibactérienne, anti tumorale, anti-inflammatoire, Anti diarrhéique et anti-

oestrogénique [53-57]. Ils sont aussi utilisés dans la médecine traditionnelle de certains pays pour le traitement de plusieurs maladies : le choléra, la grippe, l'inflammation de l'intestin et les morsures de serpent [58].

II-3-1. Description botanique

Etymologie :

Arisarum: nom donné par Dioscoride, médecin et botaniste grec mort en 90 après J-C.

Vulgare: emprunt du latin *vulgaris* (adjectif) ou *vulgus* (nom)= la foule, la multitude=ordinaire et banal.

L'*Arisarum vulgare* est une plante vivace herbacée de 10 cm à 30 cm, monoïque à racine tubéreuse, poussant généralement en colonie. Les feuilles à la base sont simples ovales à cordiformes entières, de 6 à 12 cm de long, glabres à dessus uniformément vert brillant (parfois taché) portées par un long pétiole grêle et taché.

Floraison d'octobre à mai où les fleurs sont sans périanthes, mâles et femelles rapprochées, groupées en épi autour d'un spadice libre, grêles à massue terminale nue, verdâtre, recourbée en avant et saillante au-dessus du tube avec spathe d'environ 1 cm de diamètre et de 1 à 5 cm de long, brune ou jaune verdâtre, rayée de pourpre, en tube jusqu'au milieu, courbée en capuchon et acuminée au sommet.

Les fruits baies verts capsulaires, en forme de tête hémisphérique à 2 à 8 graines.

Écologie : Lieux du littoral méditerranéen.

Toxicité : toute la plante est toxique à cause de la présence d'oxalate de calcium [51, site 4].



Figure 07 : *Image descriptive de l'Arisarum vulgare* [site 4].



Figure 08 : *Fleurs de l'Arisarum vulgare* [Photo prise novembre 2011 par Kadri Hadjer]



Figure 09 : *Graines de l'Arisarum vulgare* [Photo prise juin 2011 par Kadri Hadjer]

II-3-2. Classification

La classification de cette plante est désignée dans le tableau 03.

Tableau 03 : *Classification de la plante Arisarum vulgare* [site 4]

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Ordre	<i>Arales</i>
Famille	<i>Aracée</i>
Genre	<i>Arisarum Targ.Tozz</i>
Espèce	<i>Arisarum vulgare</i>
Nom vernaculaire	<i>Capuchon de moine, Karioua</i>
Nom retenu	<i>Arisarum vulgare O.Targ.Tozz</i>

II-3-3. Constitution chimique

Les principaux métabolites secondaires qui caractérisent la famille des *Aracées* sont les saponines, les polyphénols, les composés cyanogènes, et les alcaloïdes [59-63], ce qui confère à cette famille quelques propriétés pharmacologiques.

Récemment, l'*Araceae* a été signalé comme étant une riche famille de lectines comme le N-acetyllactosamine [64-67], l'acide 13-phenyl tridécanoïque, l'acide 11-phenylundécanoïque, l'acide 15-phenylpentadécanoïque [68], les méthyl ester de l'acide hexadécanoïque, l'acide 9-octadécénoïque et l'acide 9,12-octadécadiénoïque, aussi des aliphatiques ont été identifiés comme dodécane, le tridécane, le tétradécane, pentadécane, hexadécane, héptadécane, octadécane, nonadécane et eicosane.

La famille des *Aracées* contient aussi des composés phénoliques comme les anthocyanines, les flavone C-glycosides, les flavonols, les flavones, et les proanthocyanidines [69].

- Sachant que les flavone C-glycosides sont les composants majoritaires des feuilles et ils sont aussi les flavonoïdes caractéristique de cette famille : orientine. isoorientine, isovitexine [61].

- Les anthocyanines comme : cyanidin 3-rutinoside ; proanthocyanidins.

- Les flavones comme : luteoline, chrysoériol, acacétine.

- Les flavonoles et les flavonoles glycosides comme : kaempférol, quercétine, kaempférol 3-xylosylgalactoside [61], glucosylvitexine et isolariciresinol [54, 70, 71].

- Plus spécifiquement l'*Arisarum vulgare* contient les Flavone C-glycosides [61], les cristaux d'oxalate de calcium dans la plante entière [51], les alcaloïdes comme : (2R)-N-méthyl-2-(9-phénylnonyl) pyrrolidine (irniine), (2R)-N-méthyl-2-tetradecylpyrrodine (bgugaine), (-)-(2S,3S,6R)-1,2-diméthyl-3-hydroxy-6-(9'-phénylnonyl) piperidine (N-méthylirnigaine) isolés à partir des tubercules [72-74].

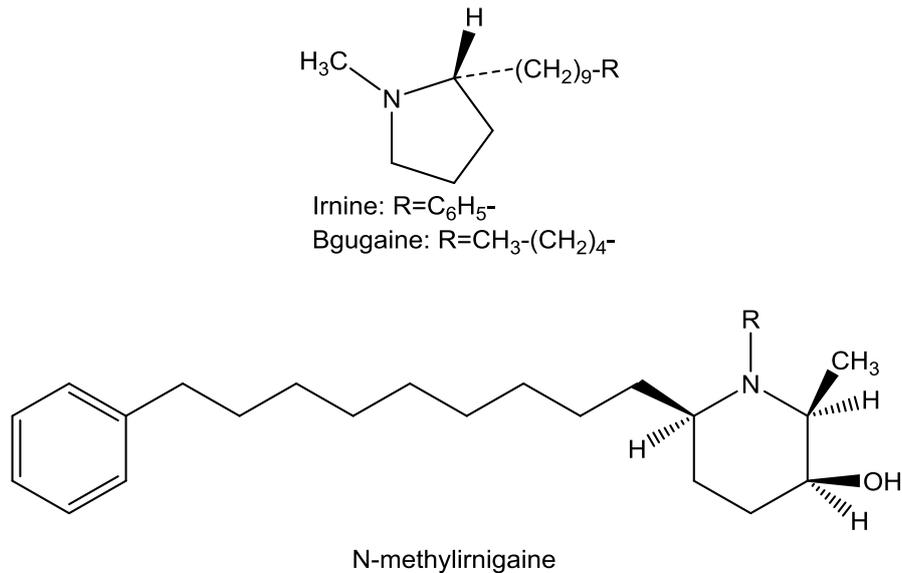


Figure 10 : Structure de quelques composés identifiés pour l'*Arisarum vulgare* [72-74]

II-3-4. Quelques utilisations de la plante

Dans le nord algérien, l'*Arisarum vulgare* est très connu pour ses vertus thérapeutiques ; les feuilles sont utilisées pour le traitement de plusieurs maladies telles que les maux de tête, l'asthme et la grippe, aussi utilisés pour favoriser la guérison des plaies. Les feuilles de la plante sont chauffées sur un feu doux, puis on lui ajoute de l'huile d'olive ; le mélange est appliqué comme pommade pour accélérer la cicatrisation. Les bulbes ou les tubercules ont été consommés pendant les périodes de pénurie après les avoir longtemps faits bouillir en rejetant plusieurs fois l'eau de la décoction, les racines ont été aussi utilisées dans la médecine traditionnelle comme un éméto-cathartique et contre les maladies des voies respiratoires [73-75].

Chapitre 2

CHAPITRE – 2 –

LES METABOLITES SECONDAIRES

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'Homme et des différents écosystèmes, car elles renferment une part importante des composés utilisés pour prévenir, soigner ou soulager divers maux (par la consommation ou l'utilisation en voie externe de produits à base de plante) s'appelle phytothérapie. Donc, on ne consomme pas seulement le principe actif mais tout ce que contient la plante. Ces dernières années l'isolement de principes actifs a contribué à l'amélioration des connaissances des structures, ce qui a permis de passer progressivement d'une phytothérapie traditionnelle parfois avec une certaine méfiance à une thérapie moderne, acceptée scientifiquement [76,77].

Les plantes peuvent être réparties selon différentes classifications : botanique, thérapeutique, industrielle et classification chimique où cette dernière est une division qui dépend sur les structures chimiques des groupes des composants qui sont produit naturellement dans les cellules et les tissus des plantes appelées métabolites primaires et métabolites secondaires, malgré la différence botanique des plantes [78].

I. CLASSIFICATION DES METABOLITES

I-1. Métabolites primaires

I-1-1. Définition

Les métabolites primaires sont des molécules qui existent dans toutes les cellules végétales et elles sont nécessaires à la vie de la plante. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides, et des hydrates de carbone qui servent à la subsistance et la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais aussi les êtres vivants qui s'en nourrissent [79,80].

I-1-2. Classification

Les métabolites primaires sont le plus souvent classés en trois catégories principales :

- Les protéines

Une protéine est une macromolécule biologique composée par une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques, possède dans sa structure les deux fonctions : Amine (NH₂) et Acide (COOH).

- Les lipides

Les lipides peuvent se présenter à l'état solide, comme dans les cires, ou à l'état liquide, comme dans les huiles. Les lipides constituent un groupe hétérogène de substances insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques (alcool à chaud, chloroforme, benzène). La structure de base est l'acide gras composé d'une chaîne hydrocarbonée de diverses longueurs, terminée par un radical d'acide (COOH).

- Les hydrates de carbone

Les hydrates de carbone sont une classe de molécules organiques contenant le groupement carbonyle (C=O) et qui possèdent la formule chimique C_n(H₂O)_n.

I-2. Métabolites secondaires

I-2-1. Définition

Ce sont des molécules qui ne sont pas produites directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures (résultat secondaire) du métabolisme, Ils sont synthétisés par les plantes, entre autres en tant qu'agents protecteurs, odorants et colorants et aussi agents de défense pour la survie dans l'écosystème. Ils sont d'une variété structurale extraordinaire mais elles sont produites en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique [81].

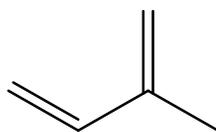
I-2-2. Classification

Il existe trois classes principales de métabolites secondaires chez les plantes, les terpènes (dérivés de lipides), les composés phénoliques (dérivés de glucides) et les alcaloïdes (dérivés d'acides aminés) [81].

- **a/ Terpènes**

Les terpènes forment une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence de térébenthine produite à partir de résine.

Ils ont pour formule de base des multiples de l'isoprène (C_5H_8)_n (figure 11) qui est considéré comme l'un des éléments de construction préférés de la nature. Leur squelette de carbone est constitué d'unités isopréniques reliées entre eux, c'est ce que l'on appelle la règle de l'isoprène. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former de cycles.



Isoprène

Figure 11 : *Structure de base des terpènes*

En fonction du nombre n (entier) d'unités, on peut distinguer pour :

$n = 2$: les monoterpènes (C_{10}). Ce sont les plus communs. Ils ont pour formule $C_{10}H_{16}$ et comptent de nombreux isomères ;

$n = 3$: les sesquiterpènes (C_{15}) ;

$n = 4$: les diterpènes (C_{20}) ;

$n = 5$: les sesterpènes (C_{25}) ;

$n = 6$: les triterpènes (C_{30}) [82].

Parmi les terpènes les plus importants on trouve : l' α -pinène, le β -pinène, le δ -3-carène, le limonène, le carotène...

Les terpènes ont deux propriétés fondamentales [83] :

- leurs sensibilités à la lumière du fait des liaisons conjuguées qui sont caractéristiques de la molécule.

- leurs caractères odoriférants (comme le géranium), cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbone.

- **b/ Alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des hétérocycles possédant tous au moins un atome d'azote (figure 12). De ce fait, ce sont des bases qui existent le plus souvent dans la plante sous forme de sels et qui présentent un goût amer. A l'exception de ceux qu'on appelle parfois des pseudo-alcaloïdes (comme la solanine et la conine), ils sont plutôt hydrophiles

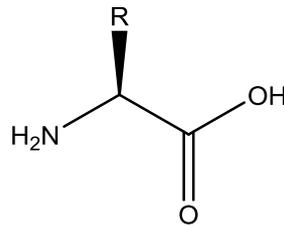


Figure 12 : *Structure de base des alcaloïdes*

Les principaux précurseurs sont des acides aminés simples comme la tyrosine, le tryptophane, l'ornithine, l'arginine ou la lysine. Ils sont stockés dans les cellules végétales au niveau des vacuoles. Ils possèdent de nombreuses propriétés pour la plante jouant un rôle de défense et sont également utilisés en médecine, où ils sont connus par leur effet sur le système nerveux [84].

- **c/ Composés phénoliques**

Les composés phénoliques ou les molécules phénoliques sont des substances caractérisées par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de hauts poids moléculaires, constituées d'un groupement phényle (C6) et d'un hydroxyle (-OH) (figure 13). Il en existe environ 4500. Selon le nombre d'unité phénolique présente, on les classe en composés phénoliques simples et en polyphénols [85].

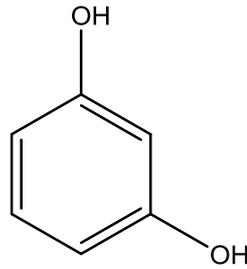


Figure 13 : *Structure de base de polyphénols.*

II. LES COMPOSÉS PHENOLIQUES

Les polyphénols peuvent être répartis en deux classes majeures : les flavonoïdes et les non flavonoïdes :

II-1. Les non flavonoïdes

Cette classe contient plusieurs composés chimiques, parmi lesquels : les acides phénoliques, les stilbenes hydroxylés, les coumarines, les lignanes, les lignines et les xanthones.

- Les saponines

Le nom saponine dérive du mot latin « sapo », qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou à plusieurs sucres (Figure 14). Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Ainsi, on distingue fondamentalement, saponines stéroïdiques et les saponines triterpéniques dérivant tous deux, biosynthétiquement de l'oxydosqualène [86].

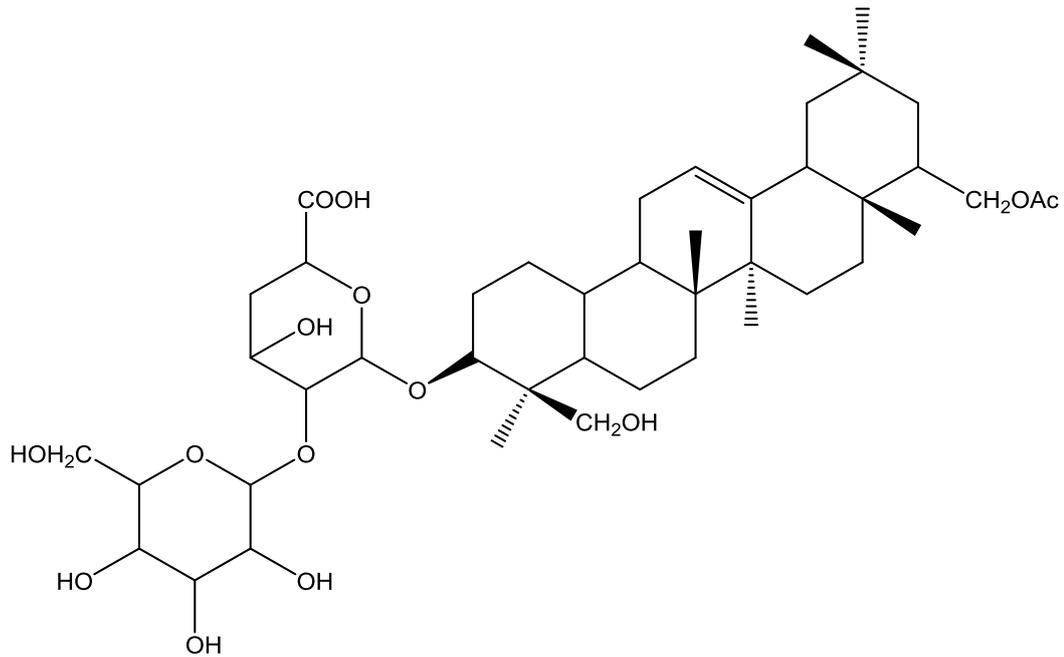


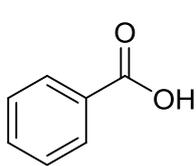
Figure 14 : Structure exemple des saponines (exemple saponine de soja).

- Acides phénoliques

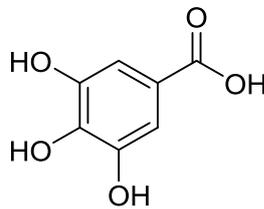
Ils ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols, ils se divisent en deux catégories [87] :

Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque (Figure 15) qui sont très communs, aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides.

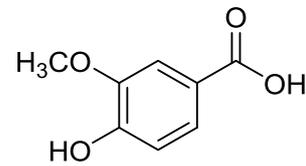
Exemple: l'acide gallique qui est un élément principal de la structure des tanins hydrolysables.



Acide benzoïque



Acide gallique



Acide vanilique

Figure 15 : Exemple de quelques acides phénoliques de la série benzoïque.

Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés ; les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, dont certains sont représentés par la figure suivante.

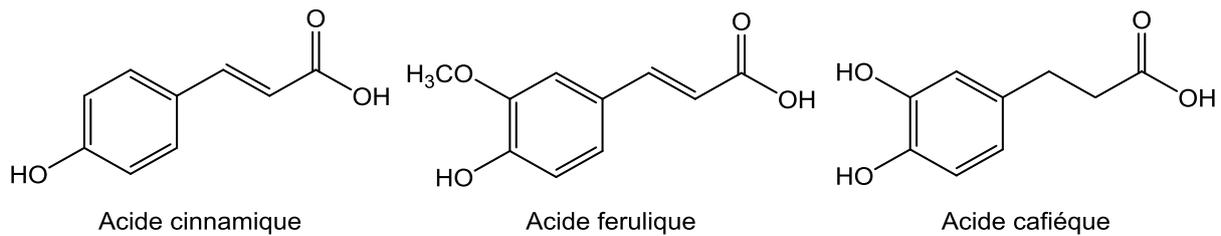


Figure 16 : Exemple de quelques acides phénoliques de la série cinnamique.

- Tanins

Ce sont des composés phénoliques de hauts poids moléculaires. Ils sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux ; ces macromolécules se divisent selon leur structure en deux groupes principaux [88] :

- Les tanins hydrolysables : sont des esters d'acide gallique (figure 17) qui se lient aux molécules de glucose. Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique [89].

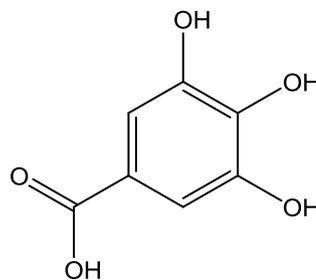


Figure 17 : Structure de l'acide gallique.

- Les tanins condensés (pro-anthocyanidines) : ce sont des composés phénoliques hétérogènes (figure 18). Ils se trouvent sous forme d'oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5 désoxy-3 flavanols et flavan-3-4-diols, liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) [90, 91].

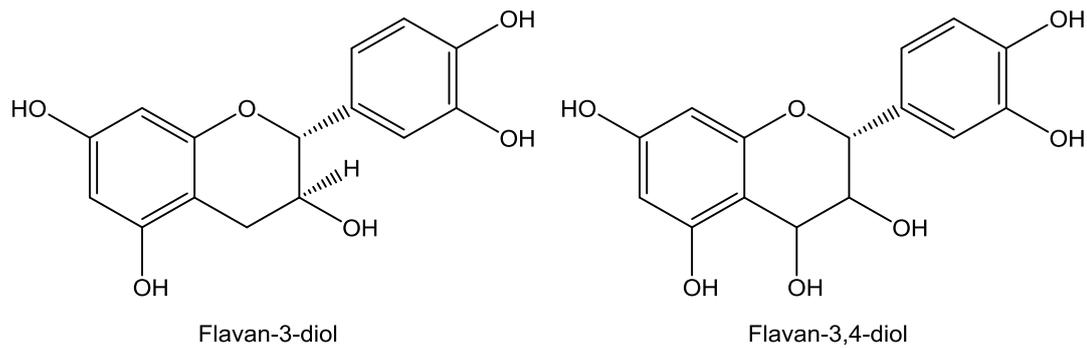


Figure 18 : Structure des tanins condensés.

- Lignanes

Les lignanes constituent une classe importante de substances naturelles du règne végétale. Ils constituent un groupe de produits naturels caractérisés par une représentation de type (C₆C₃)₂, Il s'agit des dimères ramifiés de phénylpropènes.

Ces derniers sont formés par dimérisation de trois types d'alcools : alcool p-coumarique, alcool coniférique et alcool sinapique (figure19). Le sécoisolaricirésinol et le matairesinol constituent les principales lignanes d'origine végétale [92].

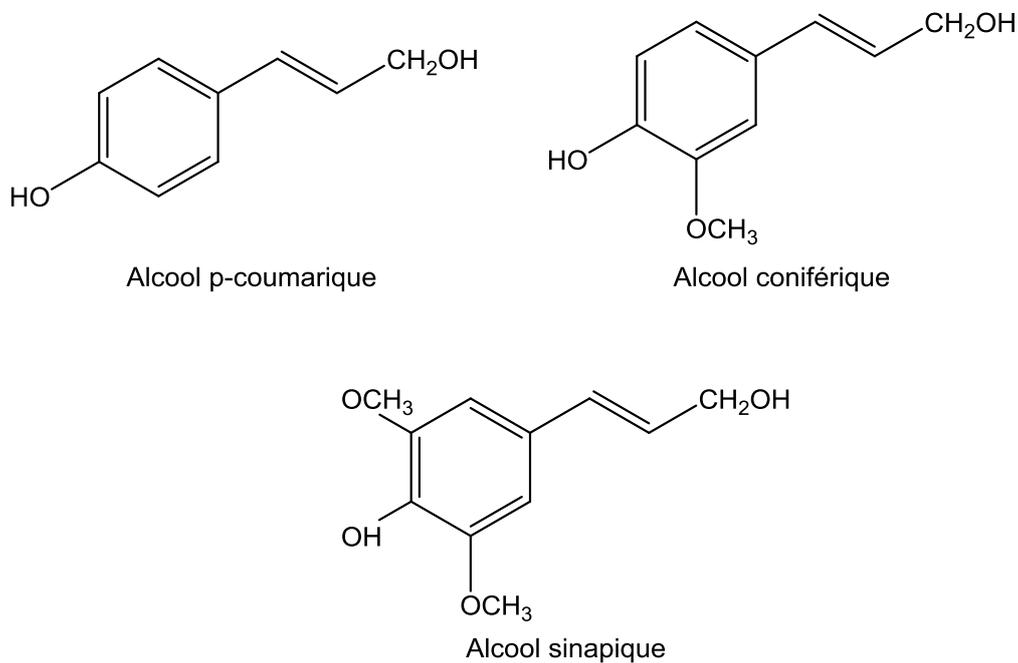


Figure 19 : Structure des dérivés des lignanes.

- Les coumarines

Les coumarines sont des composés obtenues par lactonisation de l'acide orthocoumarique. Ils sont généralement substitués en C7 par un hydroxyle (figure 20). Ces composés possèdent une structure de base : le benzo-2-pyrone.

A présent plus de 1000 composés coumariques sont isolés dont plus de 800 sont isolés à partir des plantes. Les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes [93].

Du point de vue structural, ils sont classés en coumarines simples avec des substituants sur le cycle du benzène, les furanocoumarines, les pyranocoumarines, les coumarines substituées en position 3 et/ou 4 [94].

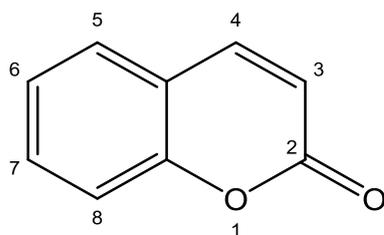


Figure 20 : Structure de la coumarine.

- Les stérols

Ce sont des dérivés des phytostérols. Ces composés sont naturellement présents dans la fraction lipidique des plantes, ils ne peuvent être apportés que par l'alimentation. Plusieurs études ont démontré que les phytostérols réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle. L'exemple le plus courant de stérol est le : cholestérol. Leur structure générale est composée de 4 cycles dont les trois premiers à 6 chaînons et le dernier à 5 [82].

- Les stéroïdes

Les stéroïdes constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbone), majoritairement le squalène (figure 21). Ils se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthréne hydrophobe comme le cortisol (figure 22) partiellement ou totalement hydrogéné. Habituellement, les carbones C10, C13 sont liés à un groupe méthyle (CH₃) et le carbone C17 à un groupe alkyle.

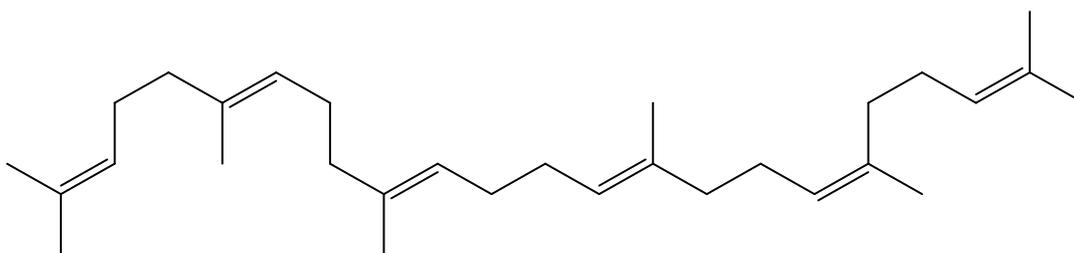


Figure 21 : Structure de la squalène.

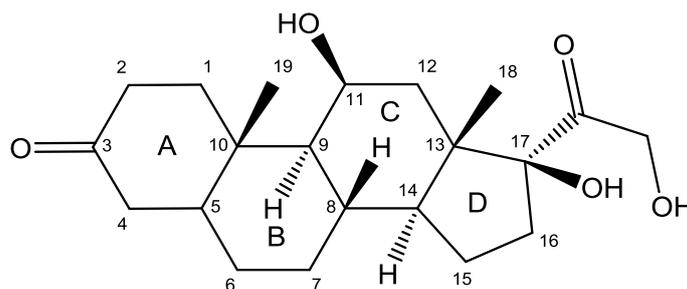


Figure 22 : Structure du cortisol.

Par extension, les stéroïdes incluent également les lipides dont le noyau cyclopentanophénanthrénique a été modifié par scission d'une liaison et l'ajout ou la déletion d'un carbone. En médecine, le terme «stéroïde» fait référence aux hormones stéroïdiennes, habituellement employé pour désigner les stéroïdes anabolisants qui aident à augmenter la synthèse des protéines dans les cellules [82].

II-2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ayont un squelette de base à 15 atomes de carbone. Ce dernier est constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 (figure 23) qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C). Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes (figure 23) : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones et aurones.

Deux types de structures ont été relevés, celui des flavonoïdes au sens strict dont la structure porte le noyau aromatique B en position 2 sur la chaîne C3 et celui des isoflavonoïdes dont le noyau aromatique B est en position 3 sur la chaîne C3 (figure 24).

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire liée à des oses et autres substances [95-97].

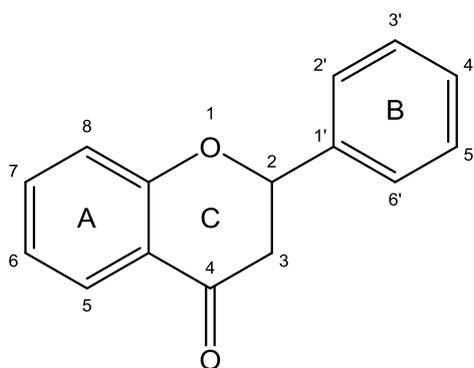


Figure 23 : *Squelette de base des flavonoïdes.*

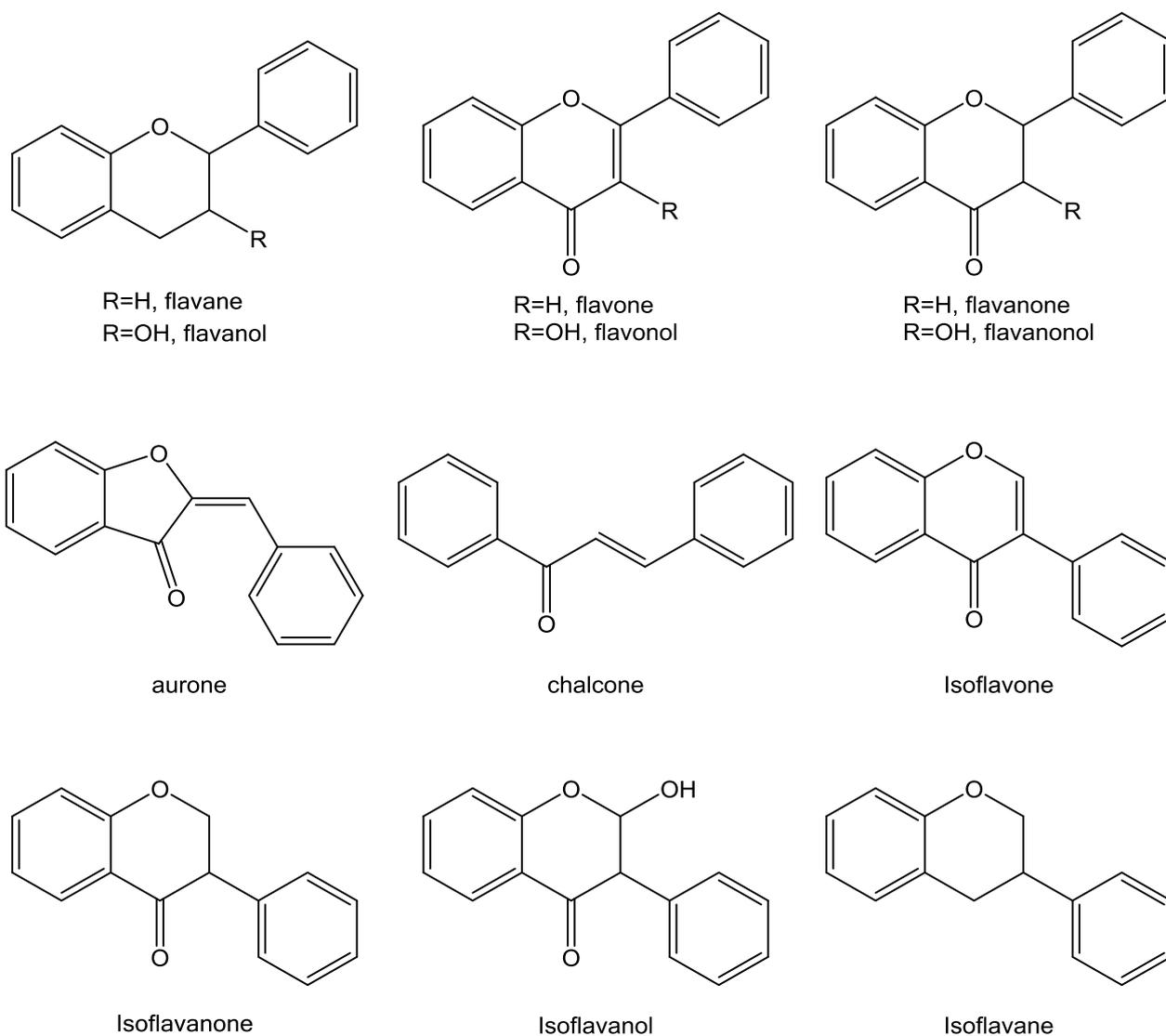


Figure 24 : *Les différents types de flavonoïdes.*

- Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés [96]. Les anthocyanines sont des flavonoïdes porteurs d'une charge sur l'oxygène de l'hétérocycles C. La structure de base des anthocyanines est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C2 (figure 25) [98]. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou l'anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment.

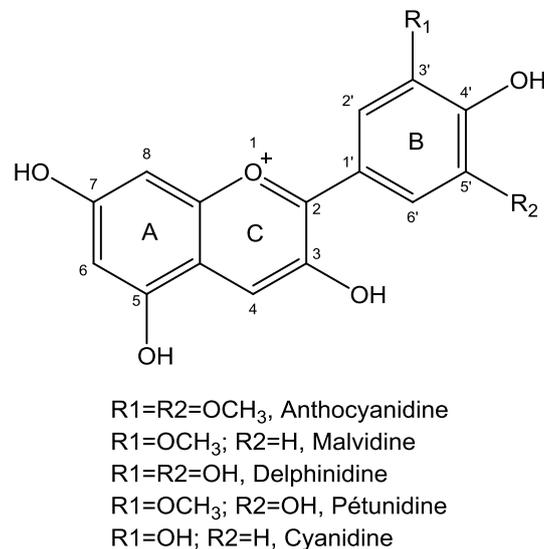


Figure 25 : les différents types des anthocyanes.

Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange [99, 100]. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. À l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau. On les trouve également dans les racines, tiges, feuilles et graines [101].

III. ROLE ET INTERET DES COMPOSÉS PHENOLIQUE

Au niveau des plantes, les composés phénoliques peuvent intervenir dans [87] :

- certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...).
- les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV); soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux.
- les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux comme les fruits, les légumes, les tubercules.

Leur rôle au niveau du corps humain est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes [87]. Spécifiquement, on attribue aux flavonoïdes des propriétés variées : veinotonique, anti-tumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépato-protectrice,....etc.

Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines, par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome.

On regroupe dans le tableau suivant quelques exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques :

Tableau 04 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques [82].

Composés phénoliques	Activités biologiques	Références
Acides phénols	antibactériennes, antiulcéreuses, antiparasitaires, antifongiques, antioxydantes.	[102-104]
Coumarines	protectrices vasculaires, anti-inflammatoires, antiparasitaires, analgésiques.	[105-110]
Flavonoïdes	anti-tumorales, vaso-dilatatoires, antibactériennes, anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétiques, antioxydantes, anti-atherogéniques, anti-thrombotiques, antiallergiques.	[90, 107, 111-118]
Anthocyanes	protectrices capillaro-veineux, antioxydantes	[119]
Proanthocyanidines	effets stabilisants sur le collagène, antioxydantes, anti tumorales, antifongiques, anti-inflammatoires.	[120]
Tannins galliques et catéchiques	antioxydantes	[121,122]
Lignanes	anti-inflammatoires, analgésiques.	[123]
Saponines	anti-tumorales, anti-cancérigènes.	[124]

Chapitre 3

CHAPITRE – 3 –**METHODES D'ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUES****I. ETUDE PAR SPECTROPHOTOMETRIE (UV-VISIBLE)**

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode d'analyse fondée sur la capacité des molécules à absorber les radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. Le domaine UV-visible s'étend environ de 185 à 380 nm, l'ultraviolet et de 380 à 800 nm du visible.

La spectrophotométrie UV-visible présente un large domaine d'application comme la chimie minérale, la chimie organique, la biochimie, les analyses médicales et les analyses quantitatives, vu sa grande sensibilité a des limites de détection atteignent couramment 10^{-4} à 10^{-5} M, une grande précision : les erreurs ne dépassent pas 5%, sa rapidité et sa simplicité d'utilisation [125].

I-1. Principe

Le spectre UV-visible ne permet pas l'identification d'un produit mais celle du groupement chromophore qu'il contient. Le groupement chromophore est défini comme étant l'entité la plus simple qui permet l'absorption d'un photon. En milieu organique, il s'agit principalement des molécules contenant un ou plusieurs noyaux aromatiques, des polyinsaturés conjugués et dans une moindre mesure, des groupements C=O, N=O ou N=N.

La spectrophotométrie par absorption UV-visible est aussi utilisée pour effectuer des mesures quantitatives où l'absorbance des composés est exploitée en analyse quantitative par l'application de la loi de Beer-Lambert. Ainsi, plus un composé est absorbant, plus la transmittance est faible et plus l'absorbance est élevée. L'absorbance, notée A, est donnée par la relation suivante [125, 126] :

$$A = \text{Log} \frac{I_0}{I} = \text{Log} \frac{100}{T} = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

Avec :

- I_0 : l'intensité lumineuse incidente
- I : l'intensité lumineuse transmise par l'échantillon
- Log est un logarithme décimal
- ε : le coefficient d'absorption molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$
- l : la largeur de la cuve en cm
- C : la concentration de la solution en mol/L
- T : la transmittance

I-2. Appareillage et technique

La spectrophotométrie consiste surtout à mesurer l'absorbance dans le domaine UV/Visible. Cette absorption est due au passage d'un électron d'un niveau énergétique à un niveau énergétique supérieur avec une modification des états de vibration et de rotation. Ainsi, l'électron passe d'une orbitale moléculaire à une autre [126].

D'une manière générale, la solution dont on désire étudier l'absorption est placée dans une cuve en quartz à faces transparentes et parallèles, qui est traversée par un faisceau optique perpendiculairement à ces faces. Après avoir fixé une longueur d'onde, la lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse la cuve contenant la solution et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par l'appareil est l'absorbance à cette longueur d'onde [127].

La plupart des spectrophotomètres UV-visible comprennent les mêmes éléments : une source (lampe), un porte-échantillons, un monochromateur, un détecteur, un appareil de lecture (figure 26) [125, 128].



Figure 26 : schéma simple d'un spectrophotomètre UV-VIS.

La fonction du monochromateur est de sélectionner une longueur d'onde parmi le spectre du rayon incident. Les plus simples sont composés de filtres ne laissant passer qu'une seule longueur d'onde ; L'échantillon et le détecteur, placés juste derrière le monochromateur, ne seront donc traversés que par un domaine étroit de longueurs d'onde. Pour changer de

longueur d'onde, il suffit alors de faire pivoter le dispositif de dispersion. En réitérant cette opération, le spectre entier sera balayé.

Depuis quelques années l'apparition de détecteurs multiples a entraîné l'utilisation de polychromateurs dans les spectrophotomètres, caractérisés par leur bonne reproductibilité des mesures et l'obtention immédiate de la totalité du spectre, contrairement au monochromateur qui sont caractérisés par leur emplacement entre l'échantillon et la source (protection des échantillons du rayonnement) [125, 128].

II. ETUDE PAR CHROMATOGRAPHIE

La chromatographie est une méthode physique de séparation des constituants d'un mélange. Cette séparation est basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, une phase stationnaire ou fixe et une phase mobile [125]. Sachant qu'il existe une variété d'équipements instrumentaux et accessoires qui sont disponibles, notamment dans le domaine de la chromatographie liquide à haute performance. Cette dernière a reçu un développement important de techniques couplées qui l'implique : LC-UV, LC-MS, et LC-RMN. Ceux-ci sont indispensables de nos jours pour la détection et l'identification des composés dans des extraits bruts de plantes [129].

Les relations entre les différentes espèces botaniques peuvent être représentées par comparaison chromatographiques de leur composition chimique. Les chromatogrammes, qui sont utilisés comme des empreintes digitales, sont comparés avec des échantillons authentiques et des substances connues pour permettre l'identification des composés [129].

II-1. Principe

La chromatographie consiste à entraîner les différentes molécules contenues dans un mélange pour les séparer en fonction de leurs vitesses d'élutions. Les molécules sont adsorbées sur un support fixe qui est la phase stationnaire, puis ils sont désorbées par l'éluant, où il y a création d'une distribution des composants du mélange plus ou moins rapide entre ces deux phases. Les différents constituants du mélange sont récupérés séparément dans plusieurs fractions [130].

Au cours de notre étude, nous avons utilisé le type de chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), et le type de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

II-2. La chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LCMS)

II-2-1. Définition

C'est une technique de chromatographie liquide à haute performance HPLC couplée avec la spectroscopie de masse SM, ce couplage combine la capacité de séparation de haute résolution de l'HPLC et l'habileté de détection de caractérisation de la SM [131, 132]. La LC-MS est donc la technique clé de la phytochimie afin d'élucider la structure des composés de stabilité thermique et chimique critique et une faible volatilité [129, 133].

II-2-2. Appareillage et technique

Un système LC-MS est un système de pompage HPLC, d'injecteur, de colonne et d'une source d'ionisation [134]. Ce système (figure 27) est couplé à un spectromètre de masse à travers un certain type d'interface d'ionisation par évaporation. Un système d'ordinateur coordonne les composants du système en fournissant ainsi le contrôle de la HPLC pour déterminer le débit, gradient de solvant et de démarrage à distance de l'injection et la course du gradient [135]. Il fournit également le contrôle du spectromètre de balayage de masse, et traite des données à partir de l'amplificateur du détecteur d'ions.

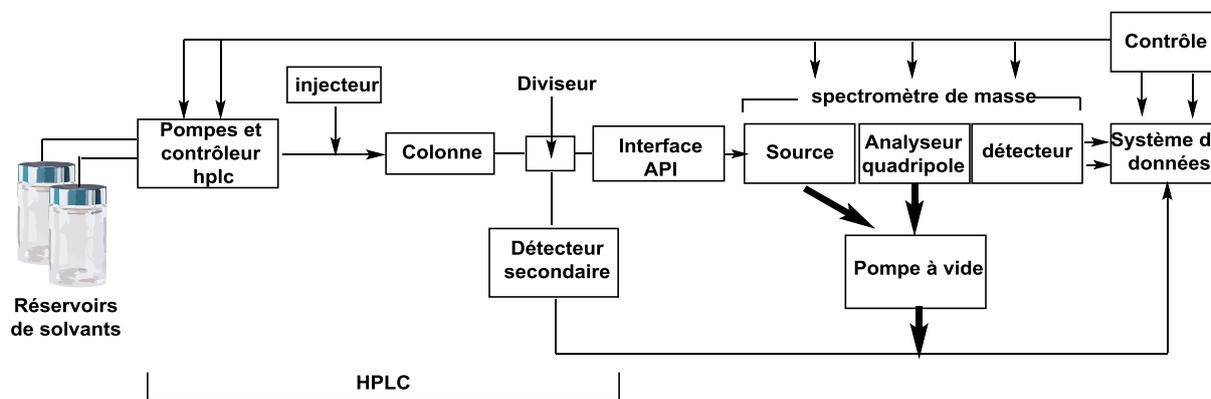


Figure 27 : Modèle de système LCMS [135].

II-2-3. Choix de Solvants

Les solvants choisis pour la chromatographie sur phase inverse, y compris l'eau, l'acétonitrile et le méthanol, sont idéaux pour la LC-MS. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention des composés.

Tous les solvants doivent être dégazés avant l'analyse pour maintenir la stabilité des signaux.

II-3. La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

II-3-1. Définition

La chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (GC / MS) est la technique analytique la plus omniprésente pour l'identification et la quantification de substances organiques dans des matrices complexes, ce qui permet l'identification structural de chaque composé. Cette technique est indispensable dans les domaines de la science de l'environnement, de la médecine légale, de la santé, de la recherche médicale et biologique, de la santé et de la sécurité, de l'industrie des saveurs et des parfums, de la sécurité alimentaire, des emballages et bien d'autres [133, 136].

Pour compléter les analyses et déterminer la composition chimique exacte, la GC est couplée à la spectrométrie de masse SM. Cette technique est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la GC et leur identification par le biais de la SM en comparant les résultats spectraux avec celles de produits de référence appartenant à une banque de données, qui contient des bibliothèques de spectres. La GC-MS est donc une technique de choix pour les composés de faible poids moléculaire, avec une bonne stabilité thermique et une volatilité suffisante [133, 136].

II-3-2. Appareillage et technique

Dans le système GC-MS, les molécules d'analyte, pénètrent dans la colonne GC avec l'éluant en phase gazeuse (phase mobile) qui est habituellement des molécules d'hydrogène ou des atomes d'hélium, sépare les composés du mélange (figure 28).

En mode impact électronique, le bombardement de substances par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70 eV provoque leur ionisation et leur fragmentation.

Après la fragmentation, les fragments sont accélérés hors de la source d'ions avec une énergie constante dans l'analyseur m/z, ces ions formés ont différentes compositions élémentaires et donc des masses différentes de celles de la molécule originale.

Les données résultant d'une analyse GC-MS sont connues sous le nom de "spectre de masse". Les spectres de masse sont acquis l'un après l'autre à un taux constant. Les coordonnées de chaque pic spectral de masse représentent la valeur m/z d'un ion et l'abondance de l'ion avec cette valeur m/z , et le fragment ion représentant la molécule intacte est utilisée pour déterminer la structure du composé analysé [136].

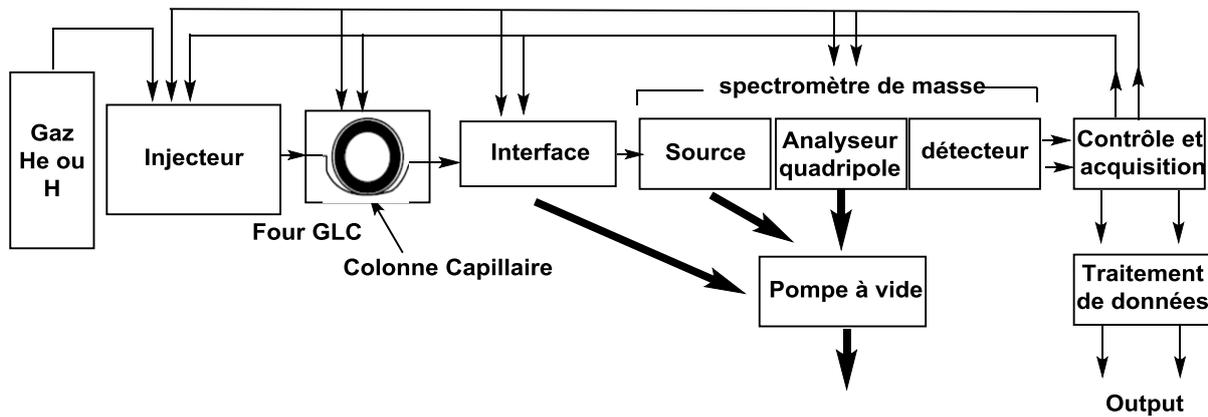


Figure 28 : Modèle de système GC-MS [135].

Chapitre 4

CHAPITRE – 4 –

ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple : ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique.

Ces composés sont largement utilisés en thérapie comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, anti-radicalaires, antibactériens, anti-inflammatoires, anti-cancérigènes, antithrombotiques, anti-athérogéniques, antipyrétiques, analgésiques et beaucoup d'autres propriétés pharmacologiques [82].

I. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies, en utilisant des réactions d'oxydo-réduction, mais il peut être également une source d'agression pour ces organismes lorsqu'il est dévié pour former des radicaux libres ou des espèces dérivées hautement réactifs. Ces entités oxydantes sont physiologiquement maintenues en équilibre par de nombreux systèmes antioxydants, si un déséquilibre apparaît ce qui est un stress oxydant, il peut être la cause de système antioxydant défectueux ou d'une quantité d'entités oxydantes produites trop importante dont les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines [82, 137, 138]. Des activités antioxydantes liées aux saponines, aux triterpènes aux esters gras dérivant tous des plantes ont été reportées. Mais l'activité antioxydante des extraits de plante est essentiellement attribuée aux composés phénoliques en particulier aux flavonoïdes. Ainsi dans la détermination de l'activité antioxydante d'extraits de plantes, la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux est aussi déterminée afin d'établir une corrélation essentielle entre teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante et ou entre teneurs en flavonoïdes et activité antioxydante [139, 140].

I-1. Mécanisme d'action

Les espèces réactives à l'oxygène (ROS) désignent une appellation collective et comprennent les radicaux libres et certaines molécules qui sont des agents d'oxydation et ou facilement convertis en radicaux (figure 29). La génération de ces espèces se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire (ils peuvent être considérés comme des

déchets du métabolisme cellulaire. Les ROS les plus courants sont : les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$), les anions radicalaires superoxydes ($\cdot\text{O}_2^-$), les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2), le dioxygène singulet ($^1\text{O}_2$), les peroxydes alkyles (ROOH), les peroxydes ($\text{ROO}\cdot$) et les alkoxydes ($\text{RO}\cdot$) [141], ces entités endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'évolution de cette oxydation semble être la cause de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques ou neurodégénératives (la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la Maladie de Huntington) comme elle accélère le processus de vieillissement [142, 143].

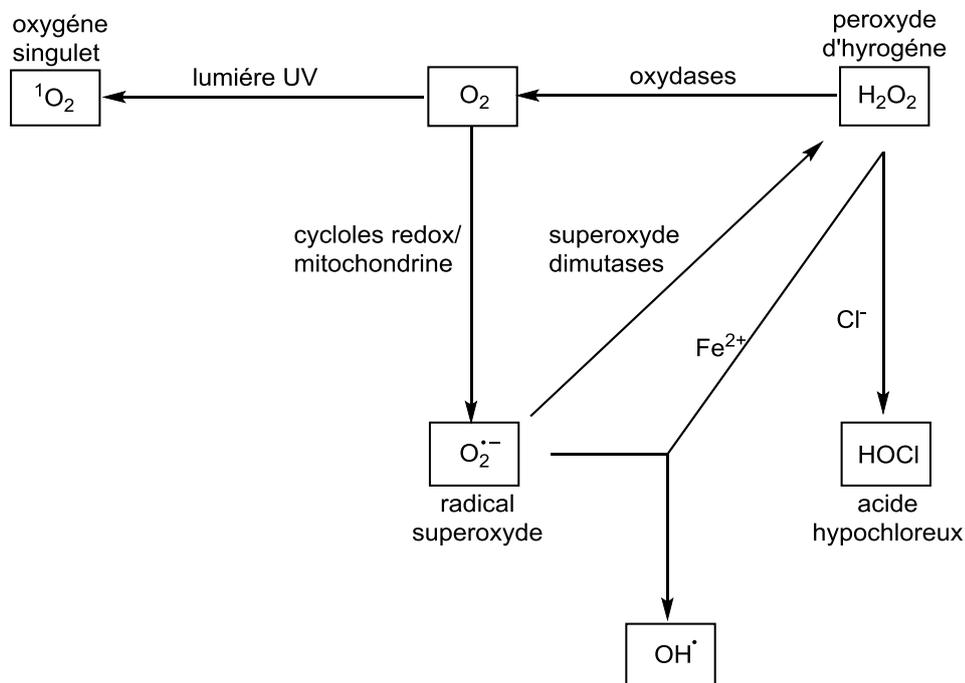


Figure 29 : Mécanisme de production de quelques ROS.

L'organisme sait cependant se défendre contre eux, grâce aux enzymes antioxydantes contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidées dans leur action anti-radicalaire par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium. Si ces systèmes de défense sont insuffisants, les radicaux libres attaquent alors les membranes cellulaires dont les acides gras insaturés sont dénaturés (leur structure est modifiée) ; ils agressent également les protéines, les microfibrilles de collagène, les acides nucléiques des chromosomes et l'ADN lui-même est transformé entraînant l'apparition d'une série d'anomalie dont le risque de cancérisation [82, 144].

Par ailleurs, l'utilisation de plantes renfermant des polyphénols et des flavonoïdes, seule ou en association, est en progression constante en raison d'une demande croissante par les consommateurs de produits d'origine naturelle et en raison de l'intérêt porté aux plantes aussi bien médicinales qu'alimentaires contenant cette classe de composés d'origine naturelle ayant des propriétés justifiant leur emploi dans la prophylaxie des maladies cardiovasculaires, Alzheimer, cancer...etc. [82].

I-2. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules naturellement produites par le corps ou bien apportées par l'alimentation pour combattre les effets des radicaux lors du stress oxydant. Ils jouent un rôle majeur pour prévenir et même aider au traitement des maladies liées au stress oxydant [145].

Il existe deux types d'antioxydants, les antioxydants endogènes et les antioxydants exogènes

I-2-1. Les antioxydants endogènes

- **Les antioxydants enzymatiques**

Le corps humain possède un système antioxydant interne de base contre les radicaux libres. Il est composé de plusieurs enzymes comme : le superoxyde dismutase cytoplasmique, le superoxyde dismutase mitochondriale, la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion oxydase et la glutathion réductase.

La catalase et les glutathions empêchent la production de radicaux libres, tandis que les superoxydes dismutases (SOD) interceptent les radicaux libres produits, arrêtant ainsi la réaction en chaîne [146].

- **Les antioxydants non enzymatiques**

Ces composés sont des réducteurs cellulaires qui participent à la protection de l'organisme contre les espèces activées de l'oxygène. Le glutathion, la bilirubine, les hormones sexuelles (oestrogènes), l'acide urique, le coenzyme Q10, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque représentent les principaux réducteurs endogènes utilisés pour maintenir l'homéostasie redox [146].

I-2-2. Les antioxydants exogènes

- **Les antioxydants synthétiques**

Les antioxydants de synthèse comme les médicaments, les compléments alimentaires ou les additifs alimentaires qui sont, certes, très efficaces mais susceptibles de manifester des effets secondaires et même être toxiques [147]. Il est donc louable de chercher des antioxydants naturels efficaces sans ou présentant moins d'effets secondaires pour remplacer les synthétiques ou pour plus de choix à partir des plantes alimentaires et médicinales [140].

- **Les antioxydants naturels**

Les antioxydants naturels sont des substances qui en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable qui, de manière significative, retardent ou empêchent l'oxydation de ce substrat. Ils peuvent agir en supprimant les ROS ou en empêchant leur formation ou encore en réparant les dommages causés par ceux-ci [148].

Ils appartiennent à plusieurs classes chimiques très différentes. Ils peuvent être aussi bien d'origine animale (surtout les poissons) que végétale. Ainsi, les polyphénols, les acides gras insaturés, les caroténoïdes, certains alcaloïdes, certaines protéines, certaines vitamines en particulier la vitamine C et la vitamine E et certains oligoéléments en particulier le sélénium manifestent un pouvoir anti-radicalaire et antioxydant important. Parmi les antioxydants les plus importants, en ce qui concerne l'activité, on peut citer la vitamine C, la vitamine E et les polyphénols [146].

I-3. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes spectrophotométriques de détermination de l'activité antioxydante. Les tests les plus couramment utilisés à cet effet sont [149-152] :

- Le test du 2,2-diphényl picrylhydrazyl (DPPH).
- Le test de l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS).
- Le test utilisant le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP).

Dans notre travail, on a choisi d'utiliser le test du DPPH et le test d'ABTS comme méthode d'évaluation des activités antioxydante de nos extraits.

a) Le test du DPPH

Les radicaux du 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl sont dissous dans du méthanol généralement à 0,004 % (P/V). L'extrait de plante ou l'antioxydant de référence est mis en contact avec la solution radicalaire de DPPH. Après incubation, l'absorbance est lue à 517 nm. Les réactions qui se déroulent peuvent être de type [152]:

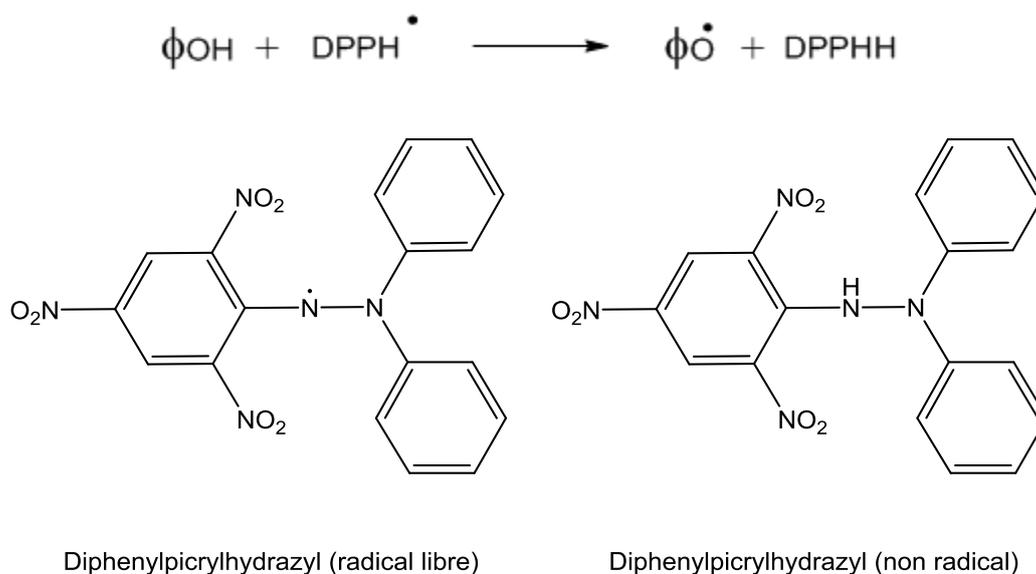


Figure 30 : *Forme libre et réduite du DPPH.*

L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition.

b) Le test ABTS

L'extrait de plante est mis en contact avec les radicaux libres d'ABTS préformés et l'absorbance est lue avec un spectrophotomètre à 734 nm. Les radicaux libres d'ABTS sont fondamentalement créés de deux manières :

- A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, les deux produits en solution aqueuse ont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 heures ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.
- A partir de l'ABTS et du chlorure du 2, 2'-azobis (2-amidino-propane) (AAPH) jouant le rôle d'initiateur de réaction dans le tampon phosphate salin (PBS)

à pH 7,4. Le mélange est chauffé à 68°C. L'absorbance de la solution obtenue (bleu-vert) est ajustée à $0,650 \pm 0,020$ à 734 nm.

Dans les deux cas, on assiste à une oxydation partielle de l'ABTS selon l'équation suivante :

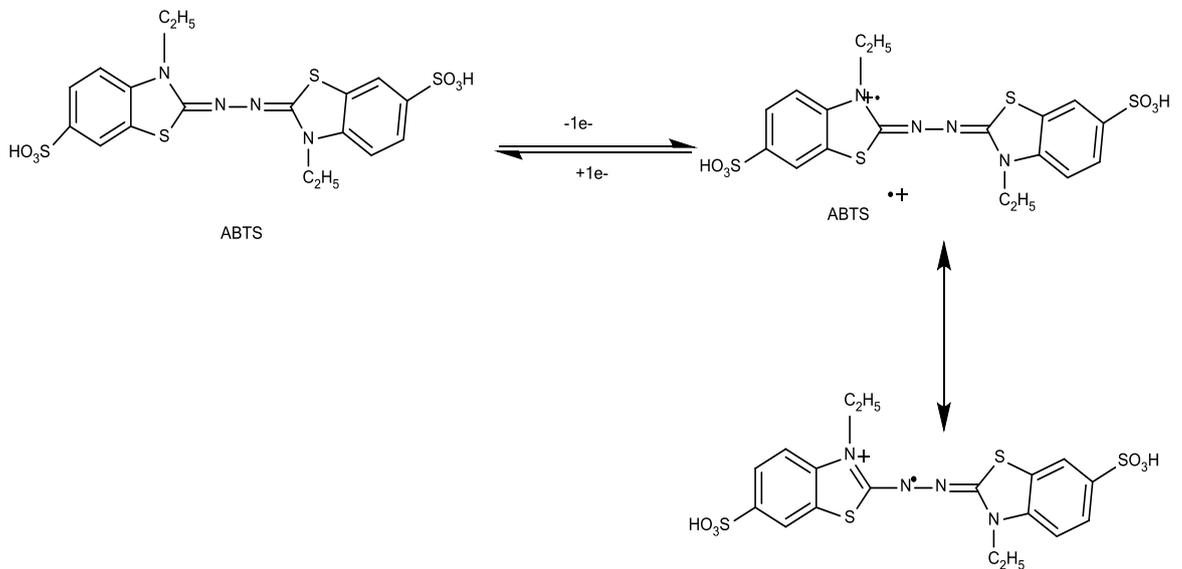


Figure 31 : Oxydation partielle de l'ABTS

L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition. Les réactions qui se déroulent peuvent être de type ABTS/trans-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan (catéchine) ou ABTS/1,3,5-trihydroxybenzène (phloroglucinol) schématisées par les réactions suivantes [153] :

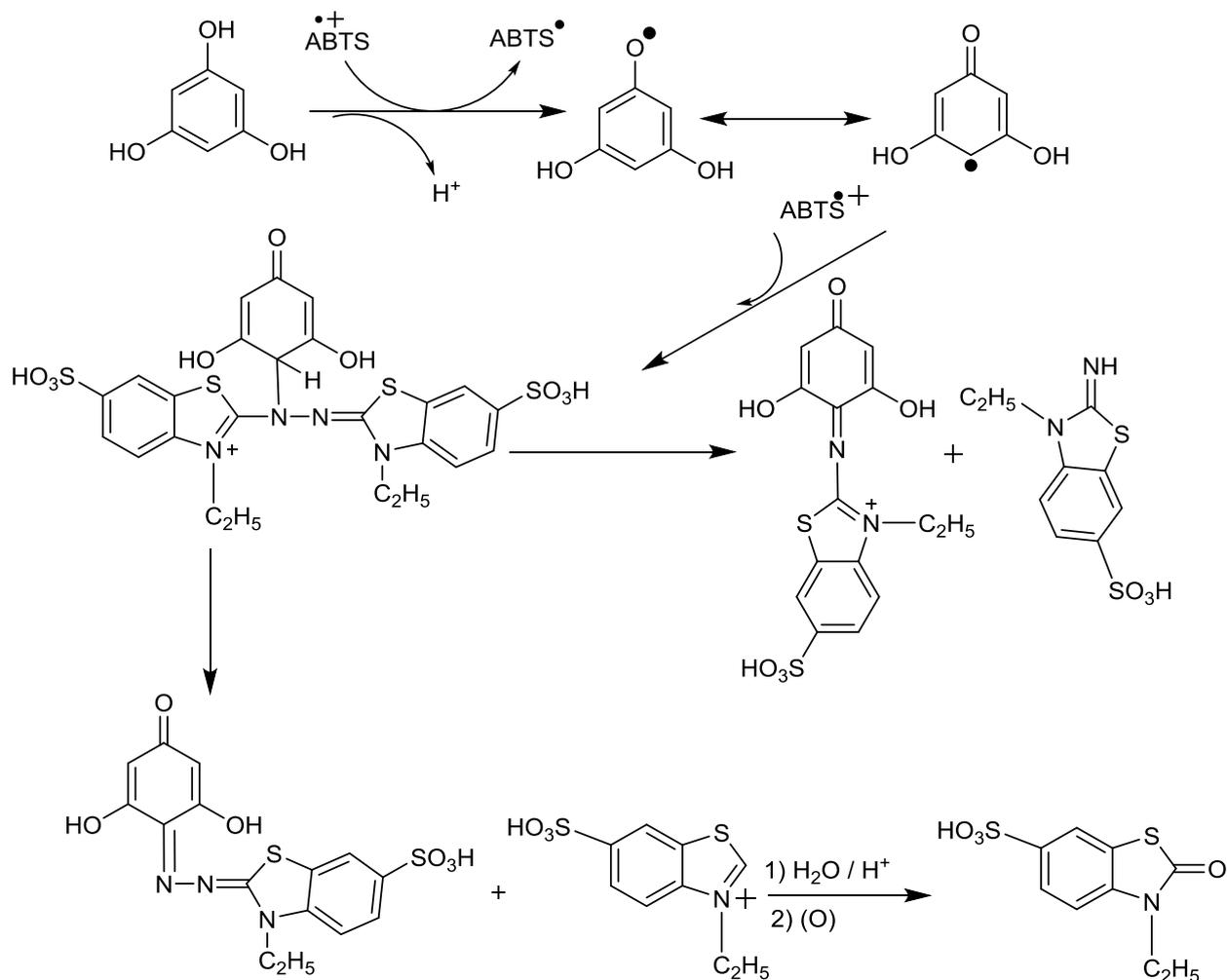


Figure 32 : Formation et piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ par un antioxydant.

c) Le test TPTZ

La réduction des ions ferriques est aussi utilisée pour déterminer le potentiel antioxydant. Le réactif est fraîchement préparé en mélangeant une solution de 10 mmol de 2,4,6-tripyridyl-s triazine (TPTZ) et de 20 mmol de chlorure ferrique dans un tampon acétate (0.25-0,3 M) à pH = 3,6 dans le rapport 1/1/10. L'absorbance du mélange (extrait de plante et réactif) est lue à 593 nm après incubation à la température ambiante. L'activité antioxydante de l'extrait de plante est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition [142,149].

II. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

L'Homme vit dans un entourage qui est plein de petits êtres vivants (micro-organismes ou microbes), se trouvant soit sur son corps soit à l'intérieur de ses cellules comme ils sont présents dans presque tous les habitats existant dans la nature. Vu leur petite taille, ils ne sont donc visibles qu'au microscope avec un diamètre inférieur à $1\mu\text{m}$, ils peuvent être divisés en quatre grands groupes : les bactéries, les virus, les levures et les champignons et les protozoaires [154, 155].

II-1. Définition et caractéristiques des bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires visibles au microscope (de $0,5\mu\text{m}$ à $1\mu\text{m}$ de largeur et de $0,5\mu\text{m}$ à $8\mu\text{m}$ de longueur) et appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal. Elles sont présentes un peu partout ; l'air, l'eau, les sols, la peau. Elles peuvent survivre de façon indépendante, se nourrir et se multiplier comme elles sont dotées d'un grand pouvoir d'adaptation [156], la plupart se nourrissent de déchets organiques en décomposition, ce sont les saprophytes ou les mangeurs de déchets.

La majorité des bactéries présentes naturellement chez l'homme ne causent pas d'effets néfastes à la santé. Certaines sont même essentielles autant à l'organisme humain qu'à l'environnement, comme les bactéries présentes dans les intestins qui aident à digérer. D'autres par contre sont bel et bien de véritables agents pathogènes qui provoquent toujours une maladie. Ces pathogènes sont à la base de beaucoup d'infections bien connues telles que les otites, la plupart des formes de méningite et de pneumonie, des abcès, quelques formes de diarrhée, la tuberculose, le typhus, la dysenterie, le choléra, la diphtérie...etc [156].

Leurs classifications se basent sur [157] :

- Leurs formes morphologiques, où on distingue : les bactéries sphériques (coque), cylindrique ou bâtonnets (bacilles), incurvée (vibrions) et spiralée (spirilles).
- Leur mode nutritionnel et leur comportement vis-à-vis de l'oxygène libre ; on distingue les bactéries aérobiques, anaérobiques, aéro-anaérobiques facultatives et micro-aérophyles.
- Leur affinité à la coloration de gram ; on distingue les bactéries à gram positif et les bactéries à gram négatif.

II-2. Les antibiotiques

Un antibiotique est une substance qui en faible quantité, inhibe la croissance bactérienne ou fongique. Il possède les caractéristiques suivantes :

- Toxicité sélective pour les bactéries ou les mycoses.
- Mécanisme d'action précis avec une cible spécifique dont il bloque la fonction physiologique.
- Actif en milieu organique et capable de diffuser.

II-3. Sources d'antibiotiques

On distingue trois classes d'antibiotiques :

- Les antibiotiques naturels : ce sont des ATB qui se trouvent dans la nature, soit produits par les microorganismes (bactéries ou champignons microscopiques) comme exemple la streptomycine et la tétracycline qui sont produits par le genre *Streptomyces*, ou d'origine végétale comme les extraits des plantes.
- Les antibiotiques hemisynthétiques : il s'agit d'ATB naturels modifiés ou transformés par synthèse chimique, pour obtenir une modification des propriétés pharmacologiques.
- Les antibiotiques synthétiques : ils sont produits par synthèse chimique.

Le coût du traitement des infections par les antibiotiques croît sans cesse, à cause de l'apparition de phénomènes de résistance aux antibiotiques et de la mise au point de nouvelles molécules antibiotiques et donc l'utilisation des plantes ou de leurs extraits pourrait constituer une excellente alternative à ces problèmes.

L'étape d'isolement et l'identification des métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, constitue une plate-forme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle.

Nous regroupons dans le tableau 05 quelques plantes douées d'une activité antimicrobienne :

Tableau 05 : *Quelques plantes à activité antimicrobienne [158].*

Plante	Partie utilisée
<i>Psychotria ipecacuanha</i>	Rhizomes et racines
<i>Chenopodium</i>	Huile
<i>Digenea simplex</i>	L'extrait
<i>Taraktogenos.</i>	Fruits
<i>Hydnocarpus</i>	Fruits
<i>Cinchona</i>	Ecorces

II-4. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne (l'antibiogramme)

L'antibiogramme a pour but de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis des divers antibiotiques. Par définition, la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu après une période d'incubation donnée [159-161]

Deux genres de techniques sont utilisés :

a) Méthode de diffusion

Les disques de papier buvard imprégné d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé (milieu de Müller Hinton) préalablementensemencé avec une suspension de bactéries. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose, sa concentration étant d'autant plus faible que l'on s'éloigne de la source (gradient de concentration). Après incubation du milieu de culture (18 h à 37°C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des microorganismes s'arrête là où il existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. L'aire circulaire qui entoure le disque et qui ne montre aucune culture visible permet de mesurer le diamètre d'inhibition qui indique le degré de sensibilité de la bactérie.

b) Méthode de dilution

C'est la méthode de référence, qui peut être pratiquée en milieu solide et liquide. Il faut d'abord distribuer dans une série de tubes à hémolyse stériles et sous un même volume, des concentrations décroissantes d'antibiotique et faire l'ensemencement avec un inoculum

calibré de la souche étudiée. Après 18 à 24 h d'incubation à 37°C, la plus faible concentration de la gamme produisant l'inhibition de la culture microbienne est qualifiée de CMI.

Le principe de la technique en milieu solide est identique, différentes concentrations d'antibiotiques sont incorporées dans une série de boîtes qui contiennent un milieu nutritif solide par la présence de géloses, l'intérêt de cette technique en milieu solide réside dans la possibilité d'étudier un grand nombre de souches bactériennes.

II-5. Présentation des micro-organismes testés

a) *Escherichia coli*

C'est une bactérie Gram négatif apparentant à la famille des *Entérobactérie*, souvent mobiles. Ces bactéries ont la forme d'un bâtonnet court et droit à bout arrondis, anaérobies facultatifs, non sporulés, oxydase négative assez polymorphe d'une longueur de 2 à 3 µm et d'une largeur de 0,6 µm. Fréquentes dans l'intestin de l'homme et des animaux, caractérisées par la multiplication à 44°C (optimum 40°C et extrême à 45,5°C), capables de fermenter plusieurs sucres, mais leur fermentation du lactose avec production de gaz est caractéristique. Aussi c'est une bactérie qui est impliquée dans de nombreuses infections à point de départ digestif ou urinaire, suppuration localisées, il peut s'agir d'infections communautaires ou nosocomiales [161, 162].

b) *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

C'est une entérobactérie, avec la forme de bacille à Gram négatif, forme de bâtonnet, non mobile et généralement encapsulée, ce qui augmente son aptitude à se multiplier, en agissant comme une barrière physique pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

Les KPC sont habituellement des anaérobies facultatifs, et leur taille varie de 0,3 à 1,0 µm de largeur et de 0,6 à 6,0 µm de longueur, appelées aussi *Enterobacteriaceae résistant au carbapenem*, car la bactérie produit une enzyme qui peut décomposer la classe d'antibiotiques appelée carbapenems.

Cette bactérie est naturellement présente au niveau de certains organes comme le tube digestif ou les poumons, mais son action est généralement bien contrôlée par le corps, d'où l'absence d'infection. Cette bactérie peut toutefois devenir « agressive » dans certaines conditions, quand les défenses immunitaires sont diminuées, chez les personnes alcooliques

ou encore diabétiques. C'est une cause importante de pneumonie et d'abcès pulmonaires d'origine communautaire ou nosocomiale, où les principaux symptômes sont la fièvre, les frissons. Elle peut ainsi être responsable d'angines, d'infections pulmonaires, parfois d'infections urinaires ou d'infections plus généralisées, la septicémie et la méningite [163].

c) *Pseudomonas aeruginosa*

C'est une bactérie Gram négative où les bacilles sont fins droits et très mobiles, ayant une taille de 0,5 à 1,0 μm de diamètre sur 1,5 à 3,0 μm de longueur, aérobies stricts, ce germe est ubiquitaire du sol, de l'air ou de l'eau on le trouve souvent dans l'environnement hospitalier et surtout dans les endroits humides. La plupart des espèces sont psychrotrophe, leur croissance est possible entre 4°C et 37°C.

La *Pseudomonas aeruginosa* peut provoquer des infections parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries. Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques comme elle est responsable d'infections cutanées et d'infection de la sphère ORL (sinusites, otites...) [164].

d) *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus appartient à la famille des Staphylococcaceae, c'est une bactérie sous forme de Cocci à Gram positif, d'un diamètre d'environ de 0,8 μm à 1 μm . Immobile, asporulé habituellement disposé en grappes, et ne présente pas de capsule visible au microscope optique [165]. *Staphylococcus aureus* fait partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau.

Staphylococcus aureus cultive facilement sur des milieux ordinaires, en aérobiose comme en anaérobiose, en formant, sur milieux solides, des colonies lisses, luisantes et bombées, plus ou moins pigmentées en jaune doré d'où l'appellation de staphylocoque "doré". En milieu liquide, il produit, dans le bouillon, un trouble homogène.

C'est un microorganisme pyogène responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses, il surinfecte souvent les plaies négligées. Les principales staphylococcies cutanées focales sont dues à la pénétration de *Staphylococcus aureus* au niveau des annexes de la peau (follicules pilosébacés, glandes sudoripares) ou dans les muqueuses à l'occasion d'une plaie, même minime.

Elles donnent lieu à des folliculites, furoncles, sycosis, antrax, panaris, onyxis, impétigo et abcès à localisations variées plus rares sont les conjonctivites, les angines, les phlegmons de l'amygdale, les otites et les sinusites [165, 166].

e) *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline MRSA

Les bactéries à staphylocoque qui sont résistantes à la méthicilline (antibiotique) sont connues sous le nom de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ou MRSA. Si elles ne sont pas traitées, les infections au MRSA peuvent entraîner de graves complications qui mettent la vie en danger telles qu'une infection du système sanguin, des os ou des poumons.

Le MRSA se propage principalement par un contact de peau à peau ou par contact avec des articles contaminés par les bactéries. Les personnes ayant des systèmes immunitaires affaiblis et souffrant de maladies chroniques sont plus sensibles à l'infection et il s'est avéré que le MRSA se propage facilement dans des établissements de soins de santé. Les personnes ayant un système immunitaire affaibli et souffrant de maladies chroniques sont plus sensibles à l'infection [site 5].

Partie II:
Partie expérimentale

Chapitre 1

CHAPITRE -1-

MATERIEL ET METHODES

Dans ce chapitre, on présente les différentes méthodes utilisées pour la valorisation de nos trois plantes (*Daucus carota ssp. maritima*, *Ammi visnaga* et *Arisarum vulgare*) :

- Screening ou criblage phytochimique (tests préliminaires) ;
- Détermination des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux par des analyses spectrophotométriques (UV-Visible) ;
- Détermination de la composition chimique par des analyses chromatographiques (LC-MS et GC-MS) ;
- Evaluation de deux activités biologiques (activités antioxydante et antibactérienne) des différents extraits.

Notons que les différentes extractions ainsi que les tests de l'activité antioxydante ont été réalisées au Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique (LSBO), Université BADJI Mokhtar –Annaba–, alors que les analyses chromatographiques et les tests de l'activité antibactérienne, sont réalisées respectivement dans le laboratoire de Chimie et de Méthodologie de l'Environnement (LCME), Université de Lorraine, Metz, –France– et le laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine, Université BADJI Mokhtar – Annaba–.

I. ORIGINE ET PERIODES DE RECOLTE

La collecte des plantes a eu lieu auprès du parc national d'El Kala, dans le Nord-est Algérien (figure 33). La récolte de *Daucus carota ssp.maritima* et d'*Ammi visnaga* était entreprise durant le printemps 2011. Pour l'*Arisarum vulgare*, la cueillette des fruits et des bulbes, a été effectuée à la fin de printemps 2011 par contre les feuilles et les fleurs, ils ont été cueillis en hiver 2011.

L'identification des plantes a été réalisée par le Dr. G. Debelair, botaniste du département de biologie, Université Badji Mokhtar – Annaba.

Chaque partie de chaque plante est lavée séparément puis laissée à l'ombre séchée à la température ambiante dans un endroit sec et aéré.

Une fois séchée, la matière végétale est finement broyée et mise en poudre à l'aide d'un moulin puis elle est stockée dans des bocaux fermés afin de la protéger de l'humidité et de la lumière.



Figure 33: Localisation géographique du Parc National d'El Kala [site 6].

II. SCREENING PHYTOCHIMIQUE

Le screening phytochimique ou criblage phytochimique est un ensemble de méthodes et de techniques d'analyse physicochimiques qui permettent de détecter la présence des différentes classes de groupes chimiques actifs contenus dans les plantes. Les groupes phytochimiques majeurs responsables des activités biologiques, et qui ont été testés par la méthode de Harbone [167] sont les suivants :

Les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les cardinolides, les saponines, les anthocyanes, les coumarines, les stérols et les terpènes.

Les différents protocoles pour chaque famille de produits sont décrits ci-dessous :

II-1. Alcaloïdes

Macérer 5 g de la plante sèche dans 50 ml de HCl à 1%, pendant 2h. Après filtration, on ajoute au filtrat quelques gouttes de réactif de Mayer. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes [167].

II-2. Flavonoïdes

Macérer 2 g de la poudre végétale pulvérisées dans 40 ml de HCl dilué à 1% pendant 24h. Prendre 10 ml du filtrat, le rendre basique par l'ajout de NH_4OH . L'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieur du tube indique la présence des flavonoïdes [168].

II-3. Tanins

2 g de la poudre sèche sont recouvertes de 20 ml d'eau très chaude ou bouillante, après 5 à 6 minutes, on remue légèrement et on filtre. Une portion de l'infusé est diluée avec de l'eau distillée dans un rapport de (1/4), puis on ajoute 3 gouttes de FeCl_3 à 10%. Une couleur bleu vert indique la présence des tanins [168].

II-4. Cardinolides

Macérer 2 g de la poudre pulvérisées dans 40 ml d'eau distillée pendant 24 h. Filtrer et prélever 10 ml du filtrat, l'extraire avec un mélange de 10 ml de CHCl_3 et de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Evaporer la phase organique et dissoudre le précipité dans 3 ml de CH_3COOH . Ajouter quelques gouttes de FeCl_3 suivi de 1 ml de H_2SO_4 concentré sur les parois du tube à essai. L'apparition d'une couleur vert bleu dans la phase d'acide indique la présence des cardinolides [168].

II-5. Saponines

(Test de la mousse) On prend 1g de matière végétale dans 10 ml d'eau, on chauffe jusqu'à ébullition puis on filtre le mélange et on laisse refroidir.

Quelques millilitres du filtrat sont mis dans un tube à essais puis on agite fortement.

L'apparition d'une mousse qui persiste quelques minutes indique la présence des saponines [168].

II-6. Anthocyanes

Mettre 1g de poudre végétale dans 10ml d'eau chaude pendant 5 min. On ajoute à 1 ml de l'infusion quelques gouttes d'HCl pur, une coloration rose-rouge apparaît. On rajoute quelques gouttes de NH₄OH, le changement de la couleur une deuxième fois (bleu violacé) indique la présence des anthocyanes [169].

II-7. Stérols et terpènes

Prendre 2g de poudre pulvérisée de la matière végétale, la macérer dans 30 ml d'éther de pétrole ou dans le toluène, pendant une heure.

Filtrer et évaporer le résidu obtenu et le dissoudre dans 0,5 ml d'acide acétique et 0,5 ml de CHCl₃.

Les 2 phases sont transférées dans un tube à essai puis ajouter 1 ml de H₂SO₄ concentré. Dans la zone de contact entre les 2 liquides un cercle violet ou marron est formé puis il devient gris, ce qui indique la présence des stérols et terpènes [170].

II-8. Coumarines

Prendre 1g de matière végétale, la macérer pendant 24 heures dans 10 ml d'éther de pétrole. Après filtration, 5 ml du filtrat est évaporé, le résidu obtenu est repris par 2 ml d'eau chaude puis divisé entre deux tubes à essai. Dans l'un des tubes nous avons introduit 0,5 ml de NH₄OH à 25%. En comparant les deux tubes, une fluorescence intense sous UV 366 nm dans le tube où il a été ajouté le NH₄OH indique la présence de coumarines [171].

III. DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES

Le dosage des composés phénoliques totaux (PPT) et des flavonoïdes totaux (FVT) contenus dans les différents extraits des plantes a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type biochrom WPA. La quantification de ces composés a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire $y = ax + b$ réalisé par des étalons standard, l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux et la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux (figure 34) à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique ou de catéchine par 100 g du poids sec de la plante en poudre.

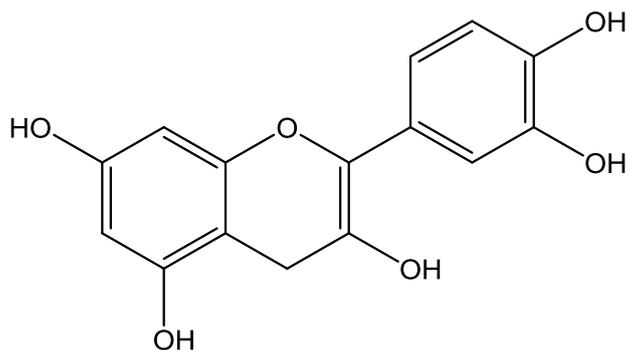


Figure 34 : Structure de la (+)-catéchine.

III-1. Préparation des extraits

1 gramme de poudre de matière végétale des différentes parties des plantes (fleurs, feuilles, racines et graines) est macérée avec 10 ml de solvant (méthanol/eau 7/3 et méthanol absolu) avec agitation pendant 24 heures dans l'obscurité. Le filtrat obtenu est fraîchement utilisé pour l'analyse.

III-2. Dosage des polyphénols totaux

III-2-1. Principe

L'estimation des polyphénols se fait généralement par des méthodes colorimétriques. Ces méthodes sont fréquemment utilisées, pour leur simplicité et leur sensibilité élevée.

La quantité en polyphénols totaux est déterminée en utilisant la méthode de Folin Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune 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 de tungstène et de molybdène de couleur bleue.

La coloration produite, dont l'absorption maximale est à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [172].

III-2-2. Mode opératoire

1 ml d'extrait de plante ou de la solution d'acide gallique (10, 25, 50, 100,150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mg/l) convenablement dilué est introduit dans une fiole jaugée

de 25 ml contenant initialement, 9 ml d'eau distillée. On ajoute ensuite 1 ml du réactif de Folin et on agite.

Après 5 minutes, une solution de Na_2CO_3 à 7 % (10 ml) est ajoutée tout en agitant. La solution est immédiatement diluée et ajustée au trait de jauge avec de l'eau distillée et le mélange est agité vigoureusement.

Après une incubation de 90 minutes dans l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance est mesurée à 760 nm en utilisant le méthanol comme blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (biochrom WPA lightwave II UV/visible). Tous les essais sont reproduits au moins trois fois [173].

III-3. Dosage des flavonoïdes totaux

III-3-1. Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) comme réactif. Ce dernier, avec les flavonoïdes et en présence de la soude, forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm [174]. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode est la catéchine.

III-3-2. Mode opératoire

L'extrait convenablement dilué (1 ml) ou la solution de la catéchine (10, 25, 50, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mg/l) est introduit dans une fiole jaugée de 10 ml contenant au préalable 4 ml d'eau distillée. A l'instant $t=0$, on y introduit 0,3 ml de NaNO_2 à 5% (P/V). A $t = 5$ min, on y ajoute 0,3 ml de AlCl_3 à 10%, 6 minutes après, on y ajoute 2 ml de NaOH à 1M. Immédiatement le mélange réactionnel est dilué avec 2,4 ml d'eau distillée et est agité vigoureusement.

L'absorbance de la solution rose est déterminée à 510 nm contre un blanc (contenant du méthanol) à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-visible de type biochrom WPA). La teneur en flavonoïdes totaux des différentes parties de plante est exprimée en équivalents de mg de catéchine (mg EC) par 100 g de matière sèche [174, 175]. Tous les essais sont reproduits au moins trois fois. Sachant qu'une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyser avec la catéchine dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

IV. CARACTERISATION DE QUELQUES COMPOSES PHENOLIQUES

IV-1. Préparation des extraits

Nos extraits ont été préparés suivant deux protocoles :

1- Le premier protocole consiste à macérer 1 gr de la poudre végétale des différentes parties des plantes dans 10 ml de solvant : méthanol/eau (7/3) et méthanol pur pendant 24 heures avec agitation.

Les extraits obtenus sont utilisés fraîchement pour l'analyse.

2- Le deuxième protocole, consacré pour les graines de l'*Arisarum vulgare*, consiste à faire une extraction classique des flavonoïdes [176] :

D'abord 150 gr de graines bien séchées et broyées, sont délipidées avec 400 ml d'hexane trois fois pendant 24 heures avec agitation (extraction solide-liquide).

Après filtration, une deuxième extraction solide-liquide est réalisée par macération du marc dans 400 ml de méthanol / eau (7/3) pendant 24 heures avec agitation. Ensuite, le mélange est filtré puis évaporé. Enfin le résidu est dilué par de l'eau distillée.

Ensuite, on procède à une série d'extraction liquide-liquide en utilisant consécutivement les solvants suivants : l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le butanol.

Les extraits sont concentrés sous vide à 35°C à l'aide d'un Rotavapor et les résidus obtenus sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

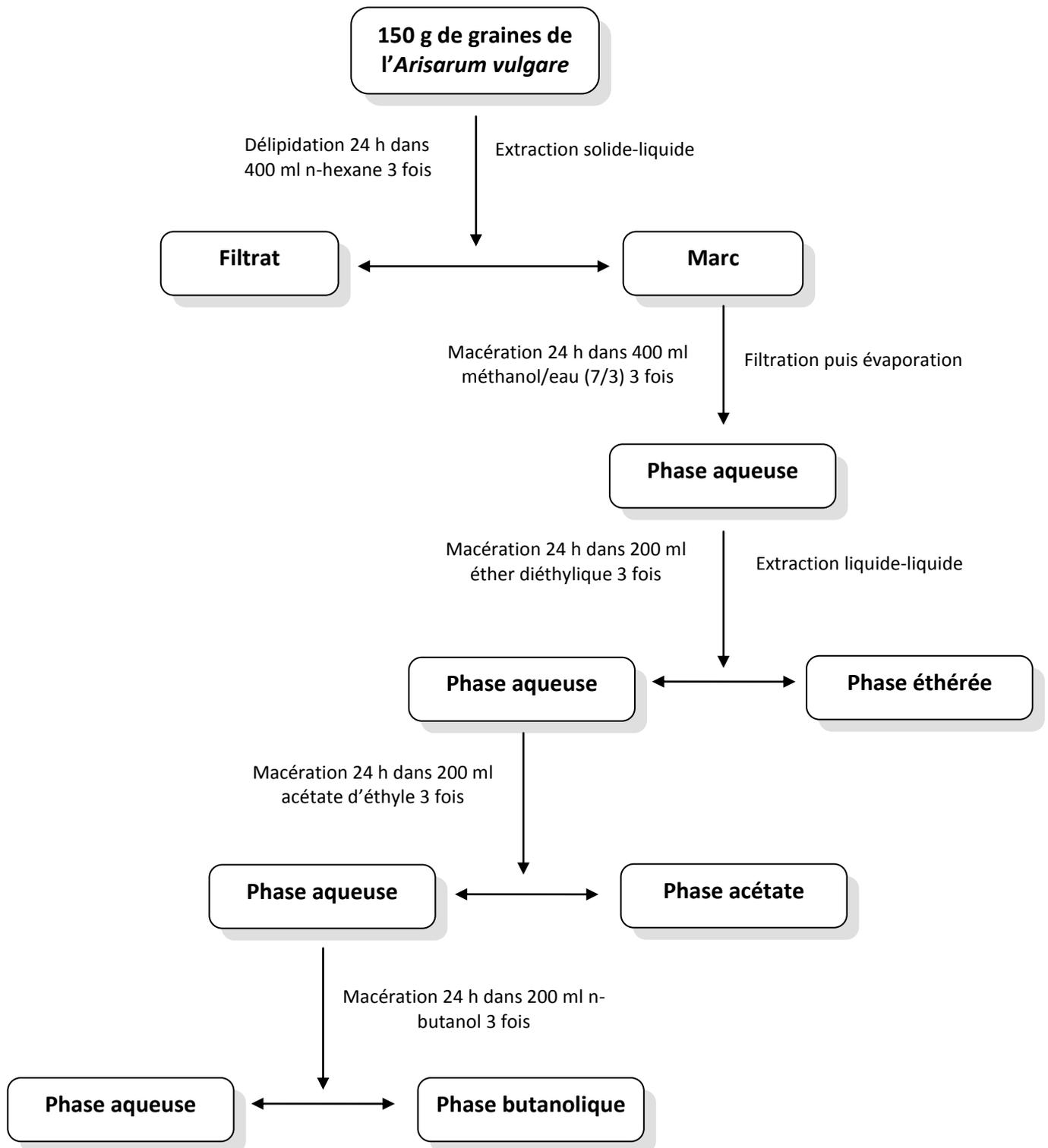


Figure 35 : *Protocole d'extraction des flavonoïdes.*

IV-2. Préparation des standards

Nous regroupons dans le tableau 06 les différents standards utilisés pour l'analyse chromatographique (LC-MS).

Tableau 06 : Etalons standards utilisés (LC-MS).

Composé	M	molarité
acide p-coumarique	164	10^{-4}
acide caféique	180	10^{-5}
acide férulique	194	10^{-4}
acide trans-férulique	194	/
acide syringique	198	$2,53^{-3}$
acide chlorogénique	354	10^{-5}
acide rosmarinique	360	10^{-4}
acide ellagique	302	$3,31^{-04}$
acide 1,5/3,5 dicaféylquinique	516	10^{-5}
Catéchine	290	10^{-4}
Epicatéchine	290	10^{-4}
Epigallocatechine	306	$9,80^{-5}$
apigénine-7-glucoside	432	10^{-4}
Quercitrine	448	10^{-4}
kaempférol-glucoside	448	$1,12^{-4}$
lutéoline-7-glucoside	448	10^{-4}
Isoquercétine	464	10^{-5}
Hypéroside	464	10^{-5}
kaempférol-rutinoside	594	10^{-4}
Rutine	610	10^{-4}
Xanthohumol	354	10^{-4}
Isoxanthohumol	354	10^{-4}
α -hédérine	750	10^{-3}
hédéracoside C	1221	10^{-3}
Quercétine	302	/

IV-3. Appareil et conditions d'analyse

L'analyse des différents extraits a été réalisée à l'aide d'un appareil modèle Shimadzu LCMS-2020 en utilisant une colonne Gemini C18 de particules 3 μm , diamètre interne 4.6 mm et d'une longueur de 150 mm.

IV-3-1. Paramètres de séparation

- Volume d'injection : 20 μL
- Débit : 0,6 mL/min
- Colonne thermostatée à 30°C
- Phase mobile à deux voies (A) eau acidifiée à 0,5% avec de l'acide formique et (B) acétonitrile.

IV-3-2. Gradient d'élution

Le gradient d'élution d'une durée de 35 min est le suivant :

- 0-22,5 min : gradient linéaire 90:10 à 50:50
- 22,5-23 min : gradient linéaire 50:50 à 10:90
- 23-29 min : élution maintenue à 10:90
- 29-29,5 min : gradient linéaire 10:90 à 90:10
- 29,5-35 min : élution maintenue à 90:10

Ce gradient permet d'obtenir une bonne séparation des composés étudiés. Il comprend en outre une phase de rinçage (10:90) puis une phase de rééquilibrage de la colonne (90:10). Les composés sont élués par degré de polarité décroissante.

IV-3-3. Paramètre d'ionisation et de détection

- température de source : 300°C
- température de la ligne de désolvatation : 250°C

- tension de spray : -4 kV
- gaz de nébulisation : 1,5 L/min
- gaz de séchage : 15 L/min

La détection est réalisée en mode négatif en full scan de 0 à 1000 Da. Les composés sont identifiés en fonction de leur rapport m/z et de leur temps de rétention comparés avec leur étalon respectif.

V. CARACTERISATION DES TERPENES

V-1. Préparation des extraits

1 gr de la poudre végétale des différentes parties des plantes est macéré dans 10 ml de dichlorométhane pendant 24 heures avec agitation.

Les extraits obtenus sont utilisés fraîchement pour l'analyse.

V-2. Appareil et conditions d'analyse

Pour réaliser l'identification des terpènes nous avons utilisé une GC-MS Modèle Shimadzu GC-2010 Plus, la colonne ZB-5MS : 30 mètres de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25 mm d'épaisseur de film.

V-3. Paramètres de séparation

- débit du gaz vecteur (hélium) : 1 ml/min
- volume injecté : 2 μ L
- injection en mode split
- température de l'injecteur : 300°C
- gradient de température : 60°C pendant 3 min ; rampe de 10°C/min jusqu'à 300°C maintenue pendant 3 min (30 min au total).
- ionisation par impact électronique (IE) à 70 eV

- température de source : 200°C

VI. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

On s'est intéressé à évaluer l'activité antioxydante des extraits hydro-méthanolique (7/3) et méthanolique des trois plantes.

VI-1. Préparation des extraits

1 gramme de matière végétale broyée est macérée dans 10 ml de solvant pendant 24 heures sous agitation. Après filtration, le filtrat obtenu est fraîchement utilisé pour l'analyse.

VI-2. Méthodes utilisées

L'évaluation de l'activité antioxydante d'un produit peut se réaliser selon plusieurs méthodes. Au cours de cette étude nous avons choisi d'évaluer l'activité antioxydante par deux tests : test DPPH et test ABTS.

IV-2-1. Test DPPH

- **Principe**

Le test DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle) consiste en la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire DPPH[•] en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire DPPH-H (Figure 36). En effet, la présence des radicaux DPPH[•] donne une coloration pourpre foncée à la solution et qui absorbe fortement à 517 nm. Au cours de la réaction, la colorimétrie de la solution change sous l'effet d'un agent antioxydant qui entraîne la décoloration de la solution [137, 155, 177].

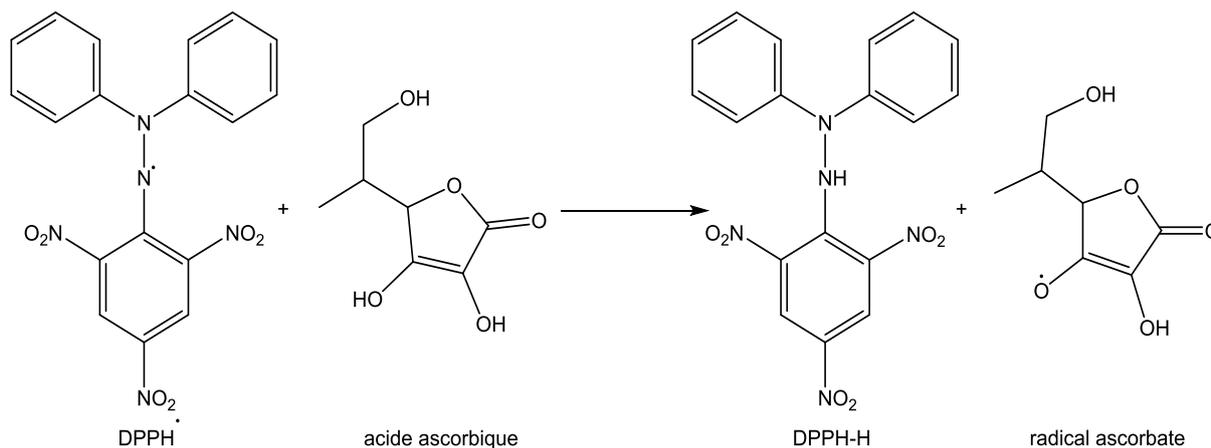


Figure 36 : Réaction de test DPPH.

- **Mode opératoire**

L'extrait de la plante (0,1 ml) est ajouté à 2,9 ml de DPPH à 100 μ mol dans le méthanol. Le mélange réactionnel formé est ensuite mis à l'obscurité pendant 30 minutes à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 517 nm en utilisant un blanc de 2.9 ml de DPPH et 0.1 ml de méthanol qui accompagne la lecture de chaque série.

Une courbe d'étalonnage est réalisée avec des solutions d'acide ascorbique (vitamine C) préparées à des concentrations différentes (10, 25, 50, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mg/L). Sachant que tous les essais sont reproduits au moins trois fois [137, 155, 177].

L'activité antioxydante mesurée est exprimée en mg équivalent vitamine C par 100 grammes de matière sèche (mg EVC/g).

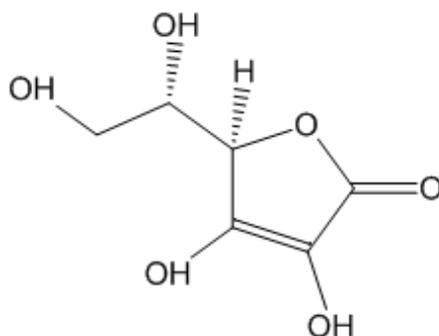


Figure 37: Acide ascorbique (vitamine C).

IV-2-2. Test ABTS

- **Principe**

Le principe de ce test est fondé sur la détermination de produits résultant de l'oxydation ou au contraire mesure l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux, souvent en donnant une forme H^{\bullet} . Il est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (figure 37). Au cours de ce test un radical cation $ABTS^{\bullet+}$ (absorbant à 734 nm) est formé par arrachement d'un électron (e^{-}) à un atome d'azote de l'ABTS. Ainsi, par la présence de l'extrait (ou d'antioxydant donneur de H^{+}), l'atome d'azote concerné piège un H^{+} , ce qui conduit à l'oxydation de l'ABTS entraînant la formation du radical $ABTS^{\bullet+}$ qui emmène à la décoloration de la solution [140, 178].



- **Mode opératoire**

Une solution d'ABTS à 7 mmol/l réagit avec 2,45 mmol de $(NH_4)_2S_2O_8$ conservée de 12 à 16 h dans l'obscurité pour avoir une couleur sombre contenant les radicaux ABTS.

L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde maximale de 734 nm. Cette solution mère est diluée avec le méthanol pour avoir une absorbance finale de $0,70 \pm 0,02$. L'extrait de plante (0,1 ml) est ajouté à 4,9 ml de la solution radicalaire d'ABTS. Le mélange est incubé dans un bain-marie à l'abri de la lumière pendant 20 min à 37°C. Un contrôle constitué de 0,1 ml méthanol et de 4,9 ml de la solution d'ABTS est lu avec chaque série d'extraits à 734 nm. La capacité antioxydante totale des extraits de plantes ainsi déterminée est exprimée en mg de vitamine C équivalent (mg EVC) par 100 g de matière sèche. La solution radicalaire d'ABTS est préparée fraîchement. Tous les tests sont reproduits au moins trois fois [140, 178].

VII. ETUDE DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES

On s'est intéressé à évaluer l'activité antibactérienne des extraits hydro-méthanolique (7/3) et méthanolique des parties aériennes des trois plantes : *Daucus carota ssp. maritima*, *Ammi visnaga* et *Arisarum vulgare*.

VII-1. Préparation des extraits

Une extraction a été réalisée en macérant 10 grammes de matière végétale broyée dans 100 ml de solvant pendant 24 heures sous agitation, l'opération est réalisée 03 fois. Après filtration du mélange, le solvant est chassé sous vide, la masse obtenue est stockée à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'au moment de son utilisation.

VII-2. Micro-organismes testés

Nous nous sommes intéressé à étudier les activités antibactériennes des extraits des parties aériennes des trois plantes sur quelques germes pathogènes fournis par le laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine d'Annaba à savoir :

- *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible aux antibiotiques)
- *Klebsiella pneumoniae* Carbapénèmase positive
- *Klebsiella pneumoniae* Carbapénèmase négative
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (sensible aux antibiotiques)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible aux antibiotiques)
- *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline MRSA.

VII-3. Méthode utilisée

L'étude de l'activité antimicrobienne est effectuée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé qui est largement répandue du fait de sa simplicité et de son faible coût. Elle permet de déterminer la sensibilité des bactéries vis-à-vis des agents antibactériens [146-148].

VII-4. Principe

Le principe de cette technique consiste à diffuser une substance antibactérienne dans un milieu de gélose en réalisant un gradient de concentration à partir d'une source de support : disque de papier préimprégné.

L'apparition d'une zone claire autour des disques, indique l'action antibactérienne de l'extrait de la plante vis-à-vis de la souche bactérienne testée.

VII-5. Mode opératoire

- **Préparation des pré-cultures**

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches bactériennes est effectuée par repiquages à la surface de la gélose nutritive pré coulée en boîte de Pétri, et ensuite incubée à 37C° pendant 18 à 24 h.

- **Préparation de l'*inoculum***

A partir du milieu de conservation, les bactéries sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% NaCl sont ajoutés, puis le mélange est bien agité afin d'obtenir une suspension homogène jusqu'à obtenir une opacité équivalente à 0,5 Mc. Farland (10^6 - 10^8 UFC/ml) qui servira à ensemençer les boîtes de pétri.

L'*inoculum* peut être ajusté en ajoutant, de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique s'il est trop fort. Sachant que l'*inoculum* bactérien doit être ensemençé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

- **Ensemencement**

L'ensemencement est réalisé sur la boîte de pétri contenant de la gélose pré séchée (4 mm d'épaisseur), milieu Mueller-Hinton pour les bactéries.

La surface entière de la gélose est inondée avec l'*inoculum*, où un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, puis essorer en pressant fermement (en le tournant) sur la paroi du tube, afin de le décharger au maximum, enfin cet écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas en stries serrées.

Cette opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de pétri de 60° et en rechargeant l'écouvillon à chaque fois. On termine l'ensemencement par le passage de l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- **Préparation des disques**

Des disques utilisés sont de 6 mm de diamètre et 0,16 mm d'épaisseur, stériles et trempés dans des solutions de concentrations croissantes des principes actifs extraits hydrométhanolique (7/3) et méthanolique.

- **Dépôt de disque et incubation**

A l'aide d'une pince stérile, les disques imprégnés de chaque extrait à différentes concentrations sont placés sur les géloses puis pressés afin de s'assurer de leur application. Notant que 6 disques sont déposés par boîte de pétri (de 90 mm) de manière circulaire régulièrement espacée à une distance de 15 mm du bord de la boîte. Ils doivent être aussi espacés de 24 mm centre à centre et laissés sécher pendant 15 à 30 minutes avant l'incubation. Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve pendant 24 heures à 37°C.

- **Lecture**

Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse à l'extérieur de la boîte fermée. Les manipulations sont faites trois fois pour s'assurer du bon déroulement de la méthode. Les bactéries seront classées dans l'une des catégories : résistante, sensible, très sensible, extrêmement sensible, selon le diamètre d'inhibition (tableau 07).

Tableau 07 : *Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition [147].*

Diamètre d'inhibition (mm)	Inferieur à 8	De 8 à 14	De 14 à 20	Supérieur ou égal à 20
Sensibilité du germe	Non sensible ou résistant	sensible	Très sensible	Extrêmement sensible
Degré d'activité	(-)	(+)	(++)	(+++)

Chapitre 2

CHAPITRE -2-

RESULTATS ET DISCUSSION

I. SCREENING PHYTOCHIMIQUE

Les tests préliminaires de caractérisation, réalisés sur différents organes des trois plantes analysées, nous ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs groupes de métabolites secondaires ou groupes phytochimiques. Tous les résultats sont repris dans le tableau 08.

Au regard de ce tableau, on s'aperçoit que les flavonoïdes constituent le groupe le plus fréquent. Ils sont présents dans tous les organes des trois plantes, sauf dans les racines de *Daucus carota*. Cette dernière contient également dans leurs feuilles et racines des saponines à l'inverse d'*Arisarum vulgare* qui est dépourvue de ces métabolites.

Nous y avons décelé aussi la présence des tanins avec une très forte présence (test fortement positif) chez les feuilles d'*Arisarum vulgare*. De plus, on constate que les feuilles d'*Ammi visnaga* ne renferment que de flavonoïdes, alcaloïdes et tanins.

En outre, et d'après le criblage phytochimique réalisé, il a été mis en évidence la présence des stérols et terpènes dans différents parties de plantes. Le même résultat a été confirmé pour les cardinolides chez les feuilles et les graines d'*Arisarum vulgare* et chez les fleurs d'*Ammi visnaga*. Notons aussi que l'*Ammi visnaga* est la plante qui contient le plus de coumarines. Quant aux anthocyanes, ils sont absents dans tous les organes des plantes étudiées.

D'une manière globale, *Arisarum vulgare* est avéré la plante la plus riche en phytoconstitués. Par contre *Daucus carota* semble être la plante la plus pauvre (absence des alcaloïdes et des cardinolides ; les coumarines ne sont présentes que dans les fleurs).

Tableau 08 : Résultats du criblage phytochimique des différents organes des plantes étudiées.

	<i>Daucus carota ssp. maritima</i>			<i>Ammi visnaga</i>			<i>Arisarum vulgare</i>			
	Fleurs	Feuilles	Racines	Fleurs	Feuilles	Racines	Graines	Fleurs	Feuilles	Bulbes
Alcaloïdes	-	-	-	++	+	-	-	++	+	++
Flavonoïdes	++	++	-	++	++	+	++	++	++	+
Anthocyanes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tanins	+	+	-	+	+	-	+	+	+++	-
Coumarines	+	-	-	+	++	-	-	+	-	-
Stérols/ Terpènes	-	+	+	++	-	+	++	+	-	-
Cardinolides	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Saponines	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-

Légende :

-- : Test négatif

+ : Test légèren positif

+++ : Test positif

+++ : Test fortement positif

II. DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES

En traçant les courbes d'étalonnage à partir des solutions standards d'acide gallique (figure 38) et de catéchine (figure39), et à partir des valeurs d'absorbance des solutions des extraits hydro-méthanolique et méthanolique des différentes organes des trois plantes, on a déterminé les teneurs de polyphénols totaux et de flavonoïdes totaux selon la relation suivante :

$$T = C \cdot V \cdot 100 / m$$

C : concentration en mg/l

V : Volume utilisé en litre

m : masse de la poudre de plante en mg

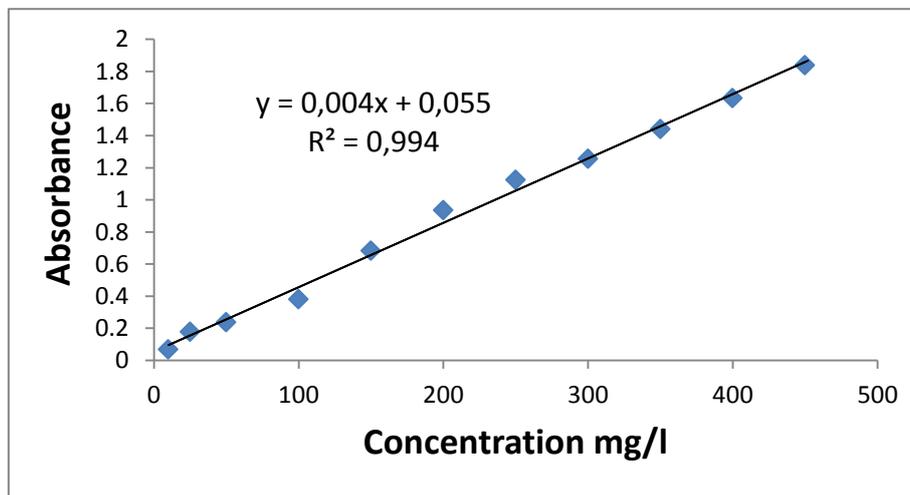


Figure 38 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

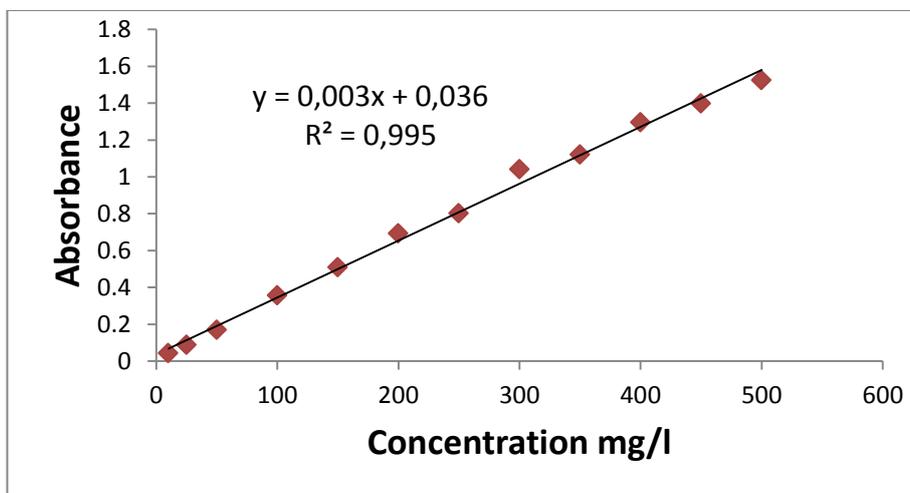


Figure 39 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

II-1. Dosage des polyphénols totaux

Après les calculs effectués à partir de la courbe d'étalonnage, les résultats de l'analyse spectrophotométrique de la teneur en polyphénols totaux sont indiqués dans le tableau 09, ils sont aussi représentés par la figure 40.

Ces résultats sont exprimés en milligrammes équivalents à l'acide gallique (mg EGA) par 100 gramme de matière sèche et les valeurs représentent les moyennes de trois mesures \pm l'écart-type.

Tableau 09 : Teneurs en polyphénols totaux.

Plante	Organe	Extrait MeOH/eau (7/3)	Extrait MeOH
<i>Daucus carota maritima</i>	Fleurs	7770,90 \pm 44,61	1331,75 \pm 16,16
	Feuilles	2339,63 \pm 25,38	810,55 \pm 17,86
	Racines	41,45 \pm 9,01	188,45 \pm 9,02
<i>Ammi visnaga</i>	Fleurs	1135,3 \pm 14,48	1227,32 \pm 9,86
	Feuilles	1006,03 \pm 8,68	1030,3 \pm 11,27
	Racines	107,75 \pm 12,06	371,04 \pm 13,74
<i>Arisarum vulgare</i>	Graines	1830,54 \pm 16,92	3500,5 \pm 19,45
	Fleurs	1950,54 \pm 11,28	926,86 \pm 16,64
	Feuilles	1336 \pm 20,25	449,53 \pm 9,2
	Bulbes	88,72 \pm 13,25	126,86 \pm 8,62

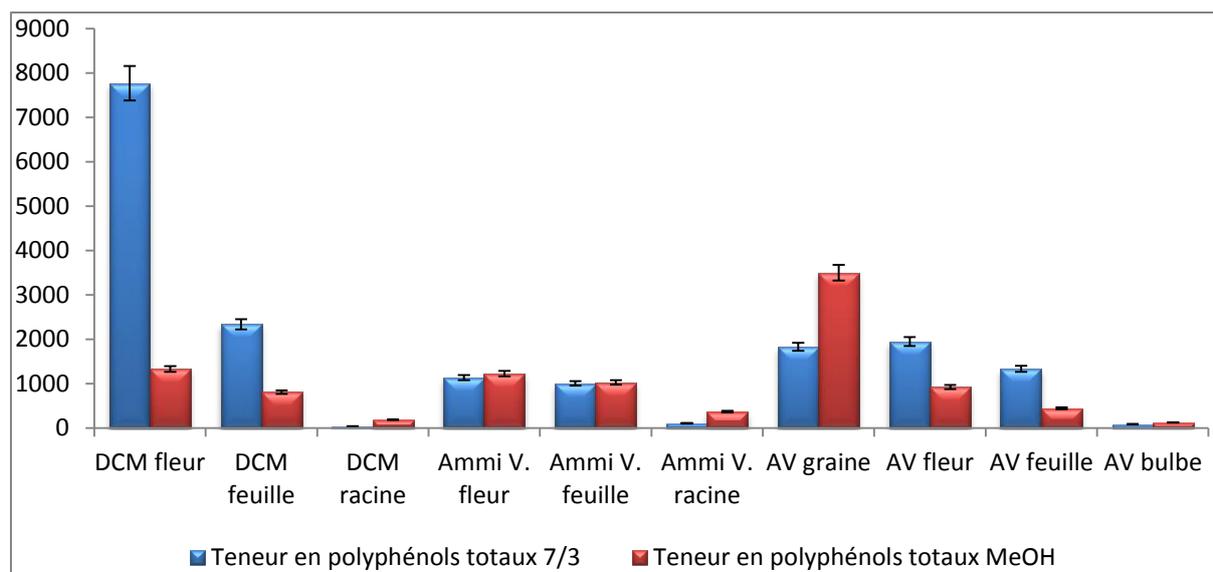


Figure 40 : Teneurs en polyphénols totaux des différents parties des plantes exprimés en mg EGA/100g MS.

Le dosage des composés phénoliques totaux contenus dans les 20 extraits méthanolique et hydro-méthanolique des trois plantes étudiées a donné des teneurs en composés phénoliques qui varient de la plus petite valeur : 41,45 mg EGA/100g MS (extrait MeOH/eau (7/3) des racines de *Daucus carota*) à la plus grande valeur : 7770,90 mg EGA/100g MS (extrait MeOH/eau (7/3) des feuilles de *Daucus carota*).

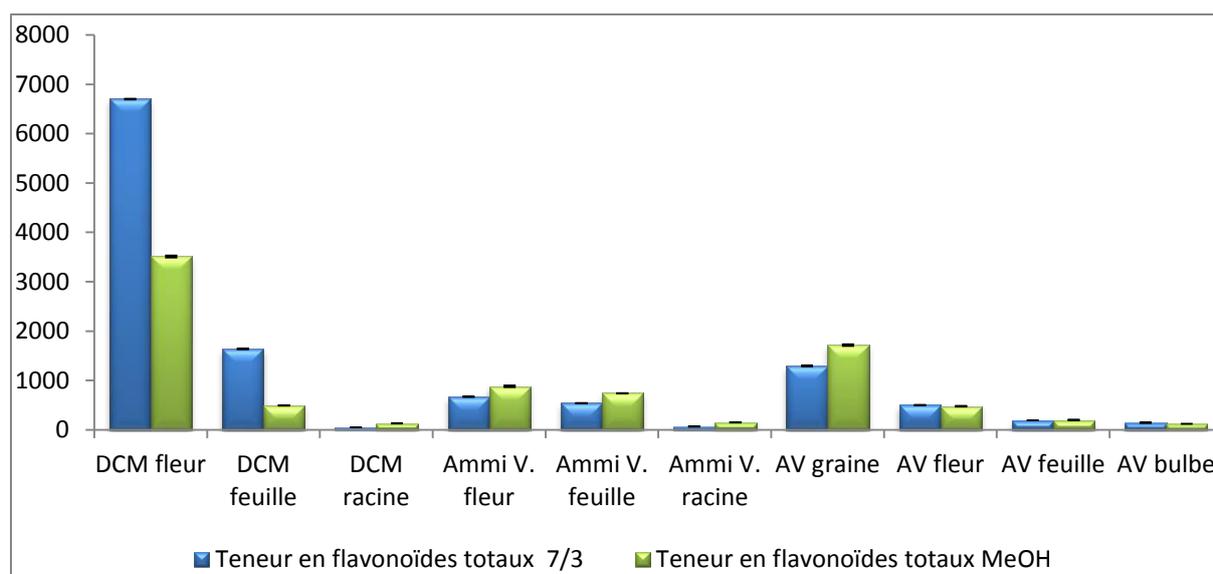
En examinant ces résultats, on s'aperçoit que les parties aériennes possèdent toujours les teneurs en polyphénols totaux les plus élevés par rapport aux racines et aux bulbes. Il ressort aussi que les extraits hydro-méthanoliques donnent des valeurs plus importantes que celles des extraits méthanoliques, sauf dans le cas des racines de *Daucus carota* et de l'*Ammi visnaga* et les graines de l'*Arisarum vulgare*.

II-2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les résultats de l'analyse spectrophotométrique des flavonoïdes totaux sont obtenus en se basant sur les valeurs d'absorbance des solutions d'extraits, ayant réagi, et comparées à celles de la solution étalon de catéchine. Ces résultats sont résumés dans le tableau 10 et sont aussi représentés par la figure 41 où la teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalents à la catéchine. Ils se rapportent à 100 gramme de matière sèche et les valeurs représentent les moyennes de trois répétitions \pm l'écart-type.

Tableau 10 : Teneur en flavonoïdes totaux.

Plante	Organe	Extrait MeOH/eau (7/3)	Extrait MeOH
<i>Daucus carota maritima</i>	Fleurs	6700,24 ± 35,67	3510,96 ± 19,67
	Feuilles	1639,80 ± 22,7	493,32 ± 13,54
	Racines	52,57 ± 10,27	131,22 ± 10,96
<i>Ammi visnaga</i>	Fleurs	671,64 ± 16,48	882,03 ± 22,06
	Feuilles	541,79 ± 12,7	741,70 ± 12,25
	Racines	66,90 ± 11,29	150,04 ± 11,29
<i>Arisarum vulgare</i>	Graines	1295,82 ± 17,02	1715,09 ± 18,16
	Fleurs	499,75 ± 13,78	474,77 ± 16,45
	Feuilles	197,35 ± 13,54	195,08 ± 15,48
	Bulbes	144,03 ± 14,81	123,9 ± 10,64

**Figure 41** : Teneurs en flavonoïdes totaux des différentes parties des plantes exprimés en mg EC/100g MS

A partir de ces résultats, on s'aperçoit que la quantité des flavonoïdes totaux variée à travers les différentes parties des trois espèces étudiées. Les teneurs sont beaucoup plus importantes dans les parties aériennes que dans les racines et les bulbes.

De plus, comme on peut le voir, la plus petite valeur (52,57 mg EC/100g MS) est enregistrée avec l'extrait MeOH/eau des racines de *Daucus carota* et pour la même plante, mais avec l'extrait MeOH/eau des fleurs, elle correspond la plus grande valeur (6700,24 mg EC/100g MS).

On remarque aussi que les extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* sont plus riches en flavonoïdes que ceux des extraits hydro-méthanoliques. L'inverse est remarqué pour les feuilles et les fleurs des deux autres plantes.

En outre, il ressort que les teneurs en flavonoïdes des extraits hydro-méthanoliques des racines de *Daucus carota* et des bulbes d'*Ammi visnaga* et de l'extrait méthanolique des fleurs de *Daucus carota* sont plus élevées que celles des polyphénols. Cela peut être expliqué par le fait que ces extraits renferment des composés ayant des structures chimiques similaires ou semblables aux flavonoïdes, ce qui augmente l'absorbance de l'extrait à 510 nm.

III. IDENTIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES PAR LC-MS

Les composés contenus dans les extraits des diverses parties des plantes testées sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention et des masses moléculaires des pics avec ceux des standards obtenus dans les mêmes conditions. Notons que par manque d'étalons adéquats, on n'a pas pu identifier tous les composés contenus dans nos extraits.

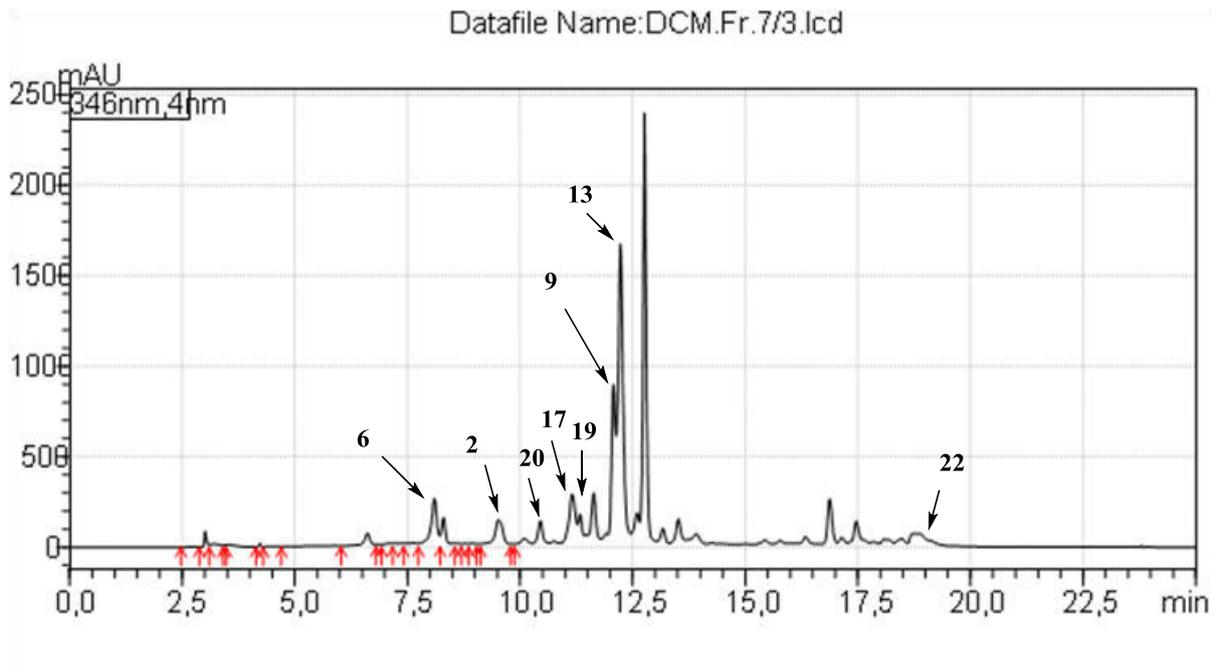
Le mélange des standards est composé d'une solution méthanol-eau 50:50 (v/v) qui contient 25 étalons à des concentrations différentes. Les valeurs du temps de rétention de ces derniers sont regroupées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Temps de rétention des standards.

N°	Étalons	M	TR (min)
1	acide paracoumarique	164	11,51
2	acide caféique	180	9,35
3	acide férulique	194	14,26
4	acide trans-férulique	194	14,26
5	acide syringique	198	9,46
6	acide chlorogénique	354	7,92
7	acide rosmarinique	360	13,26
8	acide ellagique	302	11,21
9	acide 1,5/3,5 acide dicaféylquinique	516	12,29
10	catéchine	290	8,10
11	épicatéchine	290	9,03
12	épigallocatechine	306	7,05
13	apigénine-7-glucoside	432	12,33
14	quercitrine	448	12,22
15	kaempférol-glucoside	448	12,09
16	lutéoline-7-glucoside	448	11,09
17	isoquercétine	464	11,25
18	hypéroside	464	11,04
19	kaempférol-rutinoside	594	11,38
20	rutine	609	10,49
21	xanthohumol	354	20,58
22	isoxanthohumol	354	19,08
23	α -hédérine	750	19,60
24	hédéracoside C	1221	14,30
25	Quercétine	302	16,17

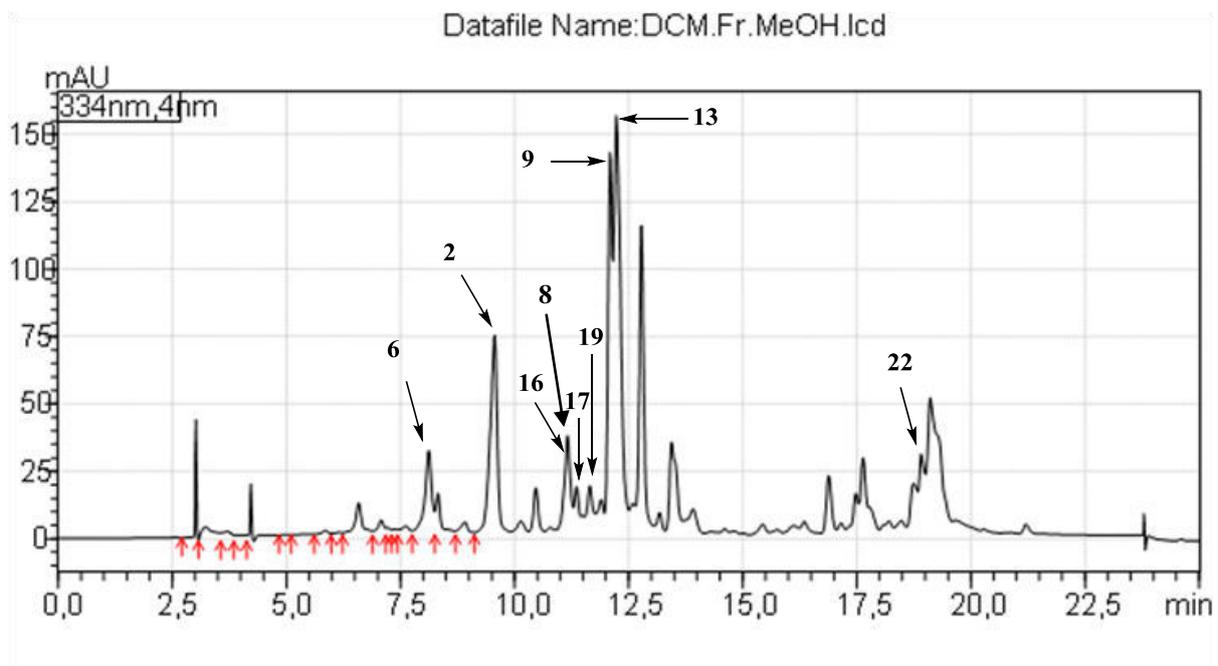
III-1. Analyse des extraits de *Daucus carota ssp. maritima*

Les chromatogrammes correspondant aux analyses chromatographiques des extraits des fleurs et des feuilles de *Daucus carota ssp.maritima* sont reportés dans les figures 42 à 45.



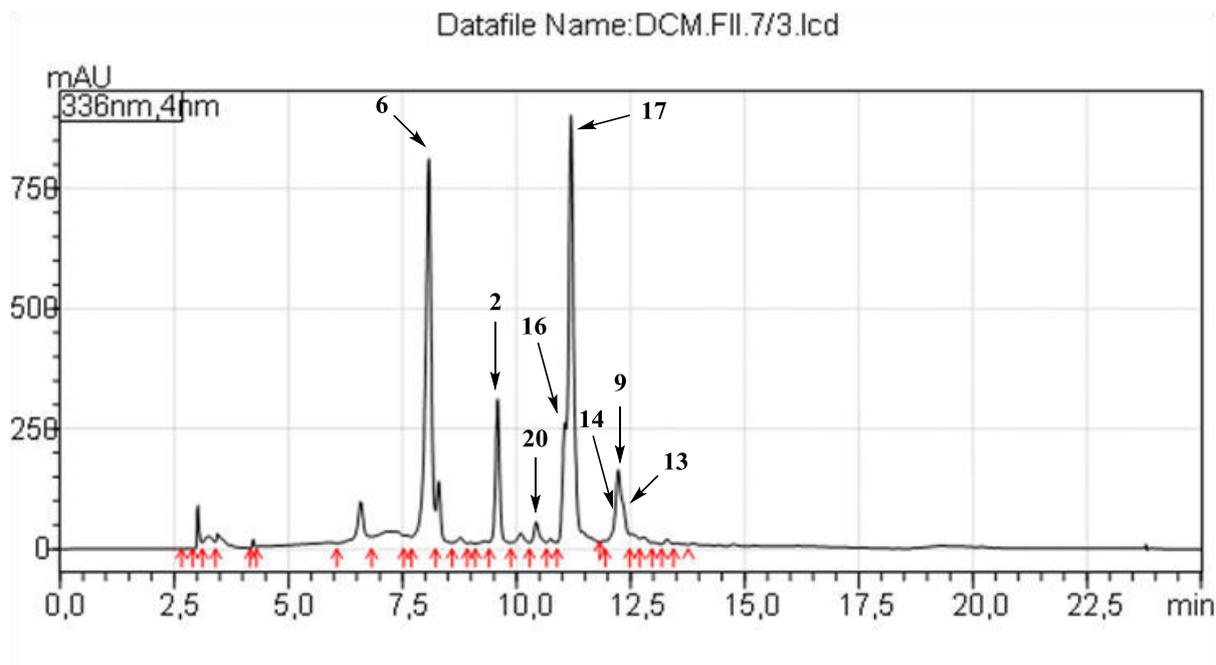
2 : acide caféique ; 6 : acide chlorogénique ; 9 : acide 1,5/3,5 dicaféylquinique ; 13 : apigénine-7-glucoside ; 14 : quercitrine ; 17 : isoquercétine ; 19 : kaempférol-rutinoside ; 20 : rutine ; 22 : isoxanthohumol.

Figure 42 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait hydro-méthanolique des fleurs de *Daucus carota*.



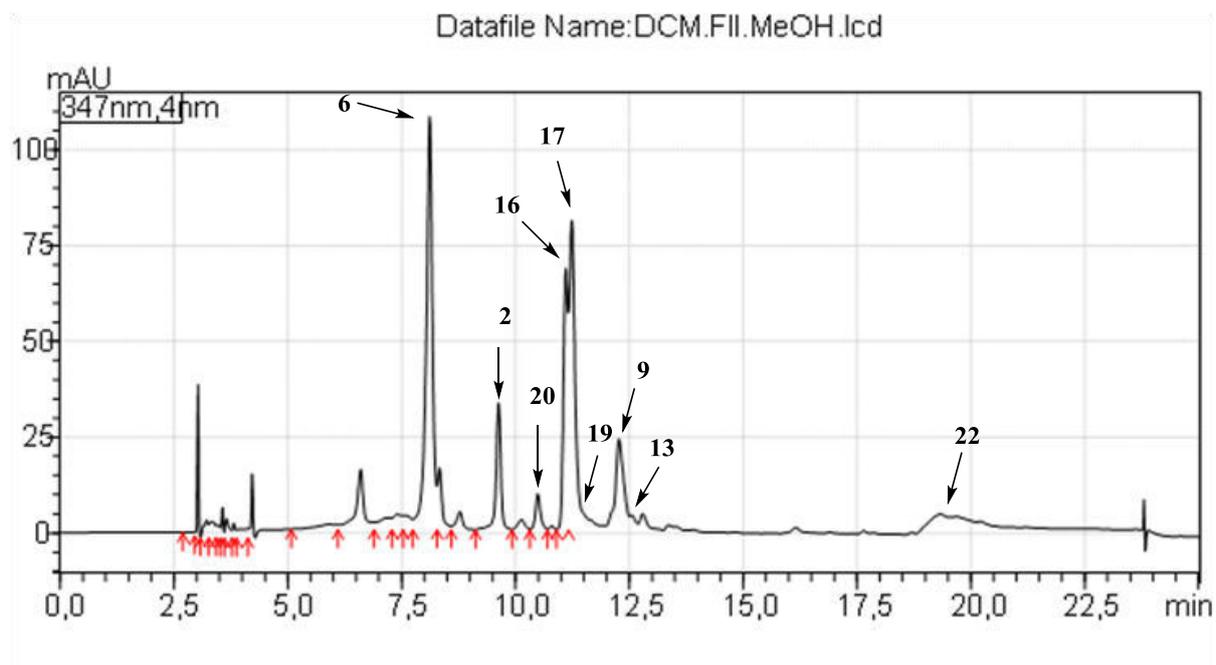
2 : acide caféique ; 6 : acide chlorogénique ; 8 : acide ellagique ; 9 : acide 1,5/3,5 dicaféylquinique ; 13 : apigénine-7-glucoside ; 16 : lutéoline-7-glucoside ; 17 : isoquercétine ; 19 : kaempférol-rutinoside ; 22 : isoxanthohumol

Figure 43 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait méthanolique des fleurs de *Daucus carota*



2 : acide caféique, 6 : acide chlorogénique, 9 : acide 1,5/3,5 dicaféylquinique, 13 : apigénine-7-glucoside, 14 : quercitrine, 16 : lutéoline-7-glucoside, 17 : isoquercétine, 20 : rutine

Figure 44 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de *Daucus carota*.



2 : acide caféique, 6 : acide chlorogénique, 9 : acide 1,5/3,5 dicaféylquinique, 13 : apigénine-7-glucoside, 16 : lutéoline-7-glucoside, 17 : isoquercétine, 19 : kaempférol-rutinoside, 20 : rutine, 22 : isoxanthohumol

Figure 45 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait méthanolique des feuilles de *Daucus carota*.

Nous regroupons dans le tableau 12 les résultats de l'analyse chromatographique des extraits de *Daucus carota ssp. maritima*.

Tableau 12 : Résultats de l'analyse chromatographique de *Daucus carota*

Standard	Extrait fleurs 7/3	Extrait fleurs MeOH	Extrait feuilles 7/3	Extrait feuilles MeOH
<i>acide caféique</i>	+	+	+	+
<i>acide chlorogénique</i>	+	+	+	+
<i>acide ellagique</i>	-	+	-	-
<i>acide 1,5/3,5 dicaféylquinique</i>	+	+	+	+
<i>apigénine-7-glucoside</i>	+	+	+	+
<i>quercitrine</i>	+	-	+	-
<i>lutéoline-7-glucoside</i>	-	+	-	+
<i>isoquercétine</i>	+	+	+	+
<i>kaempférol-rutinoside</i>	+	+	-	+
<i>rutine</i>	+	-	+	+
<i>isoxanthohumol</i>	+	+	-	+

Au vu de ces résultats, on s'aperçoit que l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide 1,5/3,5 dicaféylquinique, l'apigénine-7-glucoside et l'isoquercétine sont les composés les plus représentatifs. Concernant l'acide ellagique, on n'a pas pu l'identifier que dans l'extrait au méthanol des fleurs.

L'extrait hydro-méthanolique des feuilles est constitué essentiellement de deux composés, il s'agit de l'acide chlorogénique et de l'isoquercétine. De plus, cet extrait est l'extrait le plus pauvre en composés phénoliques par rapport aux autres extraits : il est dépourvu d'acide ellagique, de lutéoline-7-glucoside, de kaempférol-rutinoside et d'isoxanthohumol.

III-2. Analyse des extraits d'*Ammi visnaga*

Les résultats obtenus à partir de l'étude qualitative des différents extraits d'*Ammi visnaga* sont regroupés dans le tableau 13. Les chromatogrammes correspondants sont reportés dans l'annexe.

Tableau 13 : *Analyse qualitative des extraits des différentes parties d'Ammi visnaga.*

Standard	Extrait fleurs 7/3	Extrait fleurs MeOH	Extrait feuilles 7/3	Extrait feuilles MeOH
<i>acide caféique</i>	+	+	+	+
<i>acide férulique</i>	+	-	+	-
<i>acide chlorogénique</i>	+	+	+	+
<i>1,5/3,5 dicaféylquinique</i>	+	+	+	+
<i>quercitrine</i>	+	+	-	+
<i>kaempférol-glucoside</i>	+	+	+	-
<i>isoquercétine</i>	+	+	+	+
<i>kaempférol-rutinoside</i>	+	+	+	+
<i>rutine</i>	+	+	+	+
<i>isoxanthohumol</i>	-	+	-	+

Les composés les plus représentatifs sont l'acide caféique, l'acide chlorogénique, le 1,5/3,5 dicaféylquinique, l'isoquercétine, le kaempférol-rutinoside et la rutine. Quant à l'acide férulique, on ne le retrouve que dans les extraits au hydro-méthanolique. À l'inverse l'isoxanthohumol ne se présente que dans les extraits au méthanol.

La quercitrine est présente dans tous les extraits de la plante sauf dans l'extrait hydro-méthanolique des feuilles. D'autre part, le kaempférol-glucoside est présent dans tous les extraits testés sauf dans l'extrait au méthanol des feuilles.

Il est à signaler que selon notre étude, on n'a pas pu identifier la quercétine à l'inverse à ce qui a été mentionné dans la littérature [41].

Sur l'ensemble de ces résultats, il apparaît que les extraits des fleurs sont plus riches en composés phénoliques que les extraits des feuilles.

Notons enfin que les extraits d'*Ammi visnaga* contiennent beaucoup de produits majoritaires qu'on n'a pas pu les identifier par manque d'étalons adéquats.

III-3. Analyse des extraits d'*Arisarum vulgare*

Les résultats d'analyses chromatographiques des extraits d'*Arisarum vulgare* sont consignés dans le tableau 14. Nous reporterons en annexe les chromatogrammes correspondants.

Tableau 14 : Analyse qualitative des extraits des différentes parties d'*Arisarum vulgare*.

Standard	Extrait fleurs 7/3	Extrait fleurs MeOH	Extrait feuilles 7/3	Extrait feuilles MeOH	Extrait graines 7/3	Extrait graines MeOH
<i>épicatéchine</i>	+	+	-	-	-	-
<i>quercitrine</i>	+	+	-	-	-	-
<i>lutéoline-7-glucoside</i>	-	-	+	+	+	+
<i>rutine</i>	-	-	+	+	+	+
<i>xanthohumol</i>	-	-	-	-	+	-
<i>isoxanthohumol</i>	-	-	-	-	+	-
<i>quercétine</i>	-	-	+	-	+	+

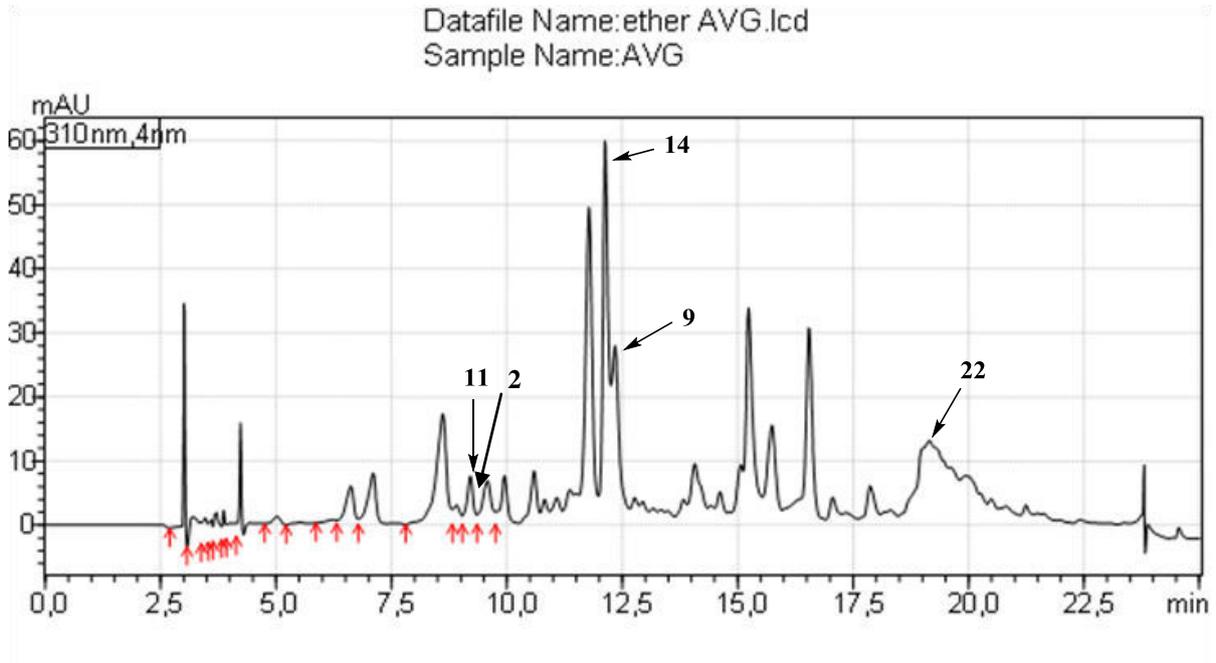
Comme on peut le voir d'après ces résultats, la lutéoline-7-glucoside et la rutine sont les composés les plus représentatifs, elles se trouvent pratiquement dans tous les extraits sauf dans les extraits des graines. Ces derniers (extrait méthanolique et extrait hydro-méthanolique) contiennent la même composition, ils présentent des traces de quercétine, d'épicatéchine et de quercitrine. Ces deux substances ne sont présentes que dans les extraits des graines. Notons aussi, qu'un produit majoritaire inconnu (à cause d'absence d'étalon correspondant) de masse moléculaire égale à 594 g/mol est également observé. Sachant aussi que dans les extraits des fleurs, deux produits majoritaires inconnus de masses moléculaires de 594 et 610 g/mole ont été également enregistrés.

Quant aux extraits des feuilles, on remarque la présence de produits majoritaires non identifiés de masses moléculaires : 448, 580, 594 et 610 g/mole. On constate aussi que l'extrait hydro-méthanolique des feuilles est l'extrait le plus riche en composés phénoliques (identifiés) que les autres extraits. De plus, c'est le seul extrait de cette plante qui contient le xanthohumol et l'isoxanthohumol.

III-4. Analyse des extraits issus de l'extraction classique des flavonoïdes

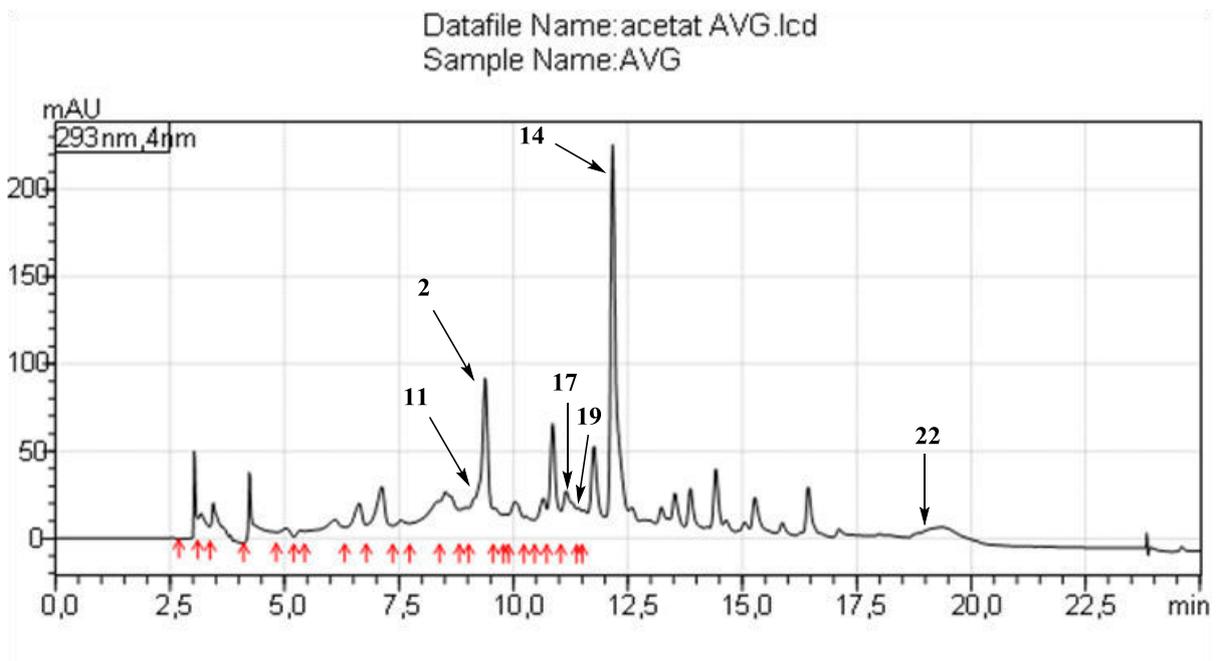
L'extraction classique des flavonoïdes a été réservée aux graines d'*Arisarum vulgare*. Elle a été réalisée selon le protocole schématisé dans la figure 35 (voir partie 2 chapitre 1) et qui nous a donné trois phases : une phase d'éther diéthylique, une phase d'acétate d'éthyle et une phase butanolique avec des rendements de 0,35, 0,21 et 0,93% respectivement. Une phase aqueuse est obtenue également à la fin de l'extraction.

L'analyse chromatographique de ces différentes phases par LCMS nous a permis d'obtenir les chromatogrammes suivants :



2 : acide caféïque, 9 : acide 1,5/3,5 dicaféylquinique, 11 : épicatechine, 14 : quercitrine, 22 : isoxanthohumol

Figure 46 : Profil chromatographique (LCMS) de la phase d'éther diéthylique des graines de l'*Arisarum vulgare*.



2 : acide caféïque, 11 : épicatechine, 14 : quercitrine, 17 : isoquercétine, 19 : kaempférol-rutinoside, 22 : isoxanthohumol

Figure 47 : Profil chromatographique (LCMS) de la phase d'acétate d'éthyle des graines de l'*Arisarum vulgare*.

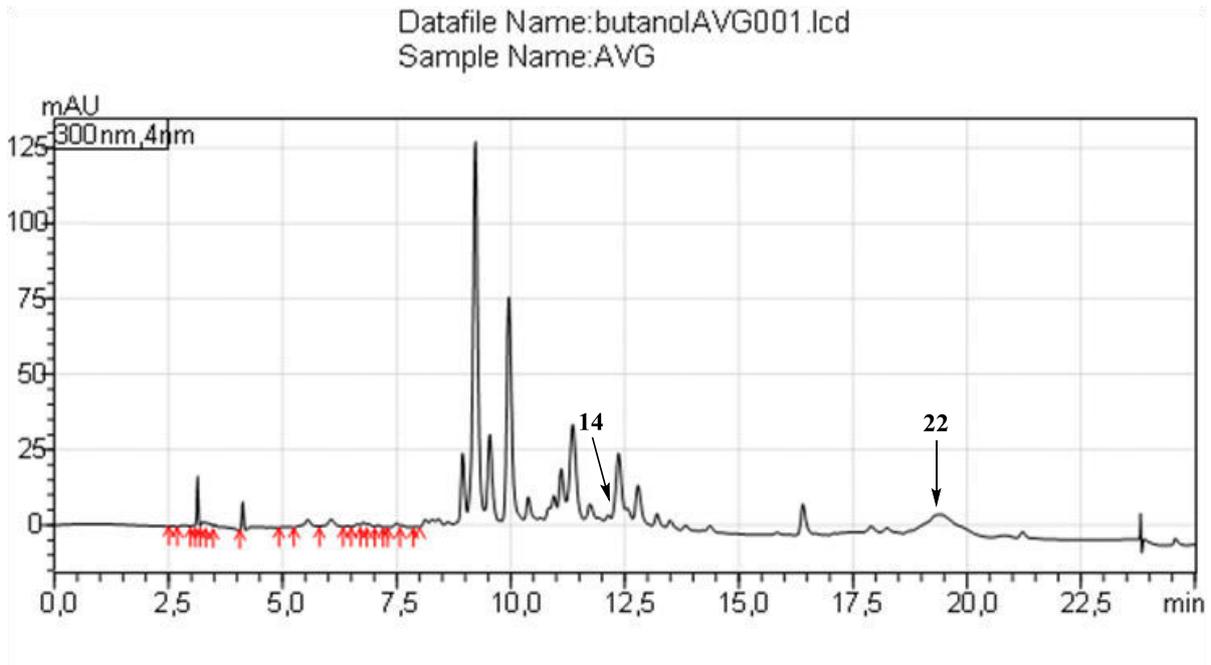


Figure 48 : Profil chromatographique (LCMS) de la phase n- Butanol de l'Arisarum vulgare.

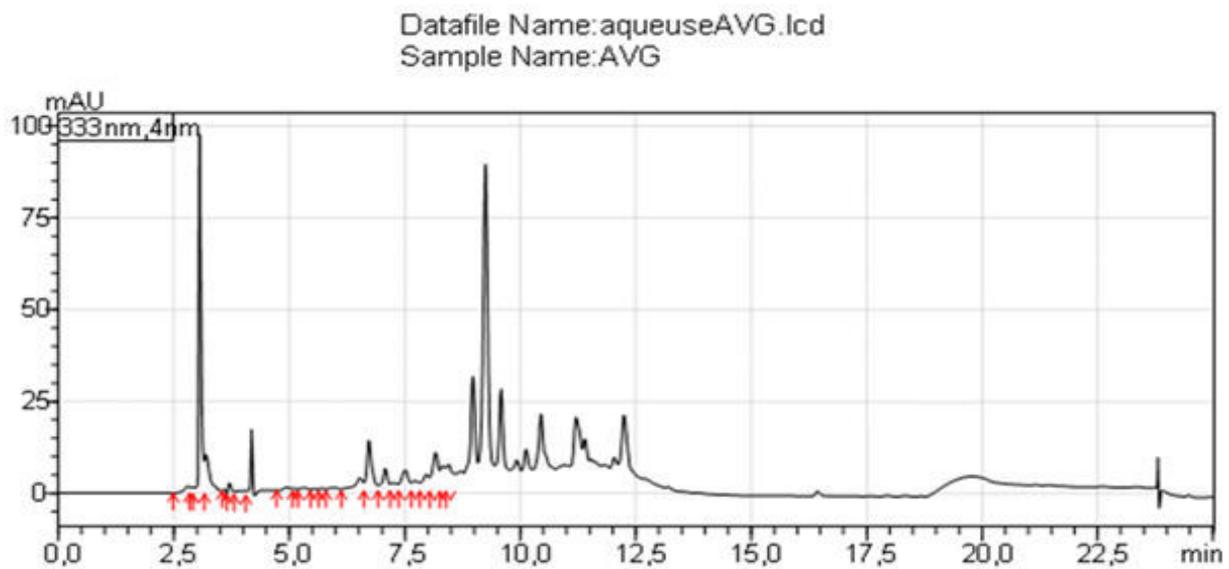


Figure 49 : Profil chromatographique (LCMS) de la phase aqueuse de l'Arisarum vulgare

Au cours de cette étude, on n'a pas pu identifier certains composés phénoliques présents par manque des étalons adéquats.

Les données d'analyses chromatographiques correspondant à l'identification des composés identifiés des différents extraits des graines de l'*Arisarum vulgare* sont reprises dans le tableau 15.

Tableau 15 : *Analyse qualitative des extraits d'Arisarum vulgare*

Standard	Phase éther	Phase AcOEt	Phase BuOH	Phase aqueuse
<i>acide caféique</i>	+	+	-	-
<i>acide 1,5/3,5 dicaféylquinique</i>	+	-	-	-
<i>épicatéchine</i>	+	+	-	-
<i>quercitrine</i>	+	+	+	-
<i>isoquercétine</i>	-	+	-	-
<i>kaempférol-rutinoside</i>	-	+	-	-
<i>isoxanthohumol</i>	+	+	+	-

Au vue de ces résultats, on remarque que l'extrait acétate d'éthyle est l'extrait le plus riche en composés phénoliques. En outre, l'extrait aqueux ne contient aucune substance correspondant aux étalons injectés qui seraient lié, peut-être, au fait de l'épuisement de la poudre végétale par les différents solvants (éther diéthylique, acétate d'éthyle et n-butanol).

La quercitrine et l'isoxanthohumol sont les composés les plus représentatifs, ils se trouvent pratiquement dans toutes les phases à l'exception de la phase aqueuse.

Il est à noter aussi que l'isoquercétine et le kaempférol-rutinoside ne sont présents que dans la phase acétate. À l'inverse, l'acide 1,5/3,5 dicaféylquinique ne se présente que dans la phase d'éther diéthylique.

Un autre fait à remarquer sur ces chromatogrammes, c'est la présence d'autres pics correspondant à des produits non identifiés.

IV. IDENTIFICATION DES TERPENES PAR CG-MS

Afin d'identifier les terpènes existant dans les plantes testées, des extraits de dichlorométhane (CH₂Cl₂) des différents organes (fleurs, feuilles, racines et bulbes) ont été chromatographiés par GCMS.

Les meilleurs chromatogrammes obtenus sont illustrés dans les figures suivantes :

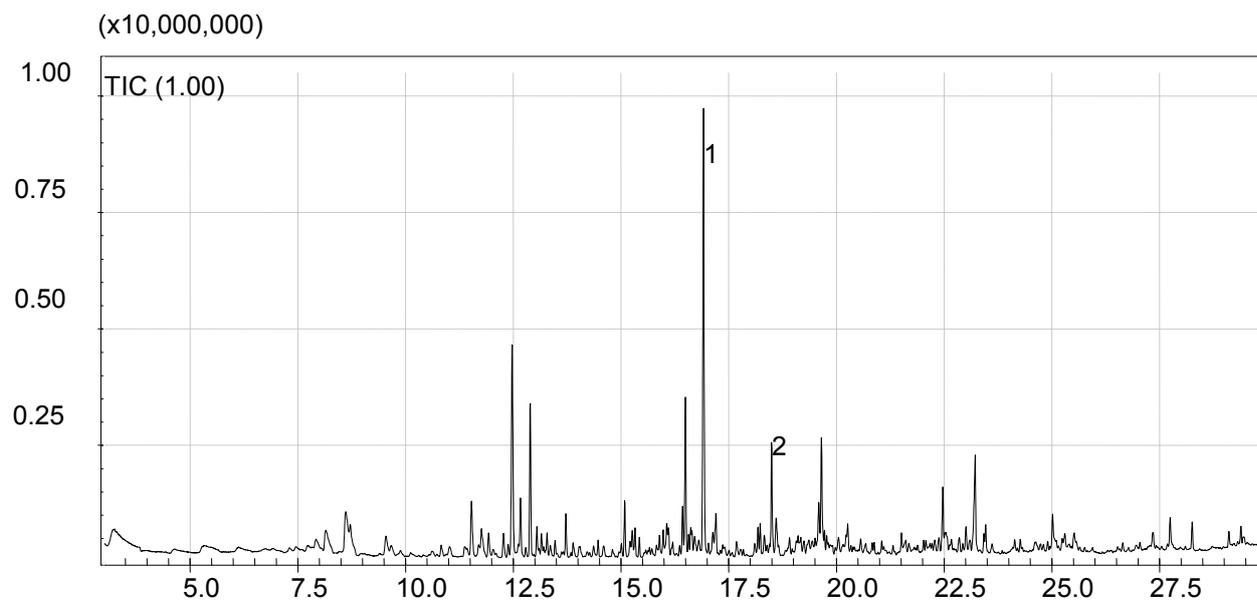


Figure 50 : Profil chromatographique (GCMS) des fleurs de *Daucus carota*.

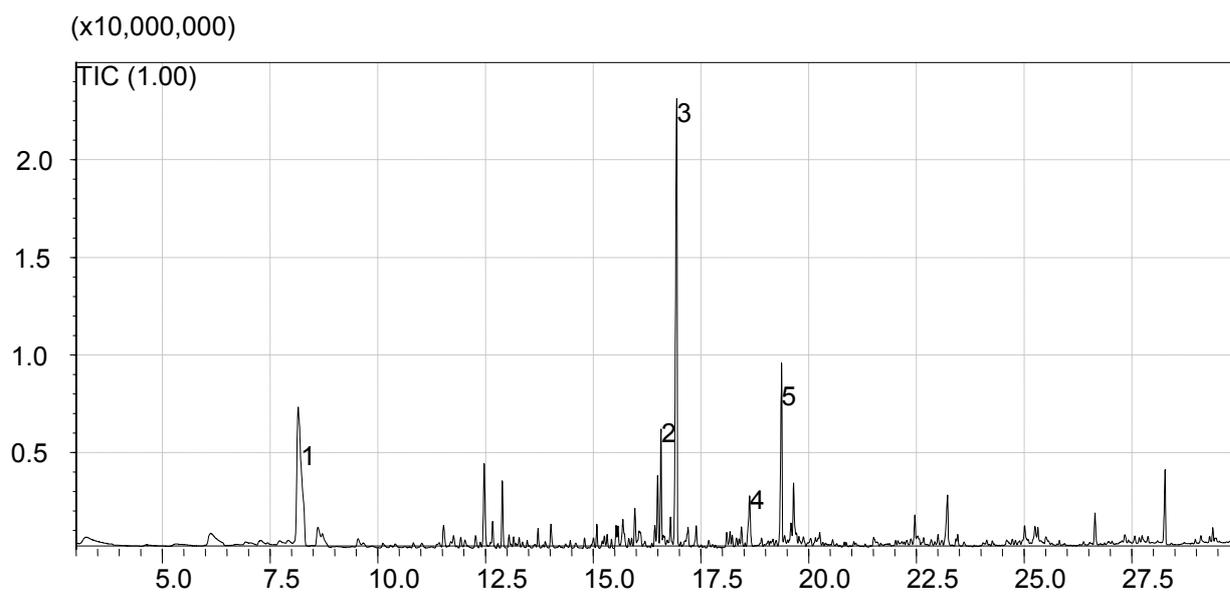


Figure 51 : Profil chromatographique (GCMS) des fleurs d'*Ammi visnaga*.

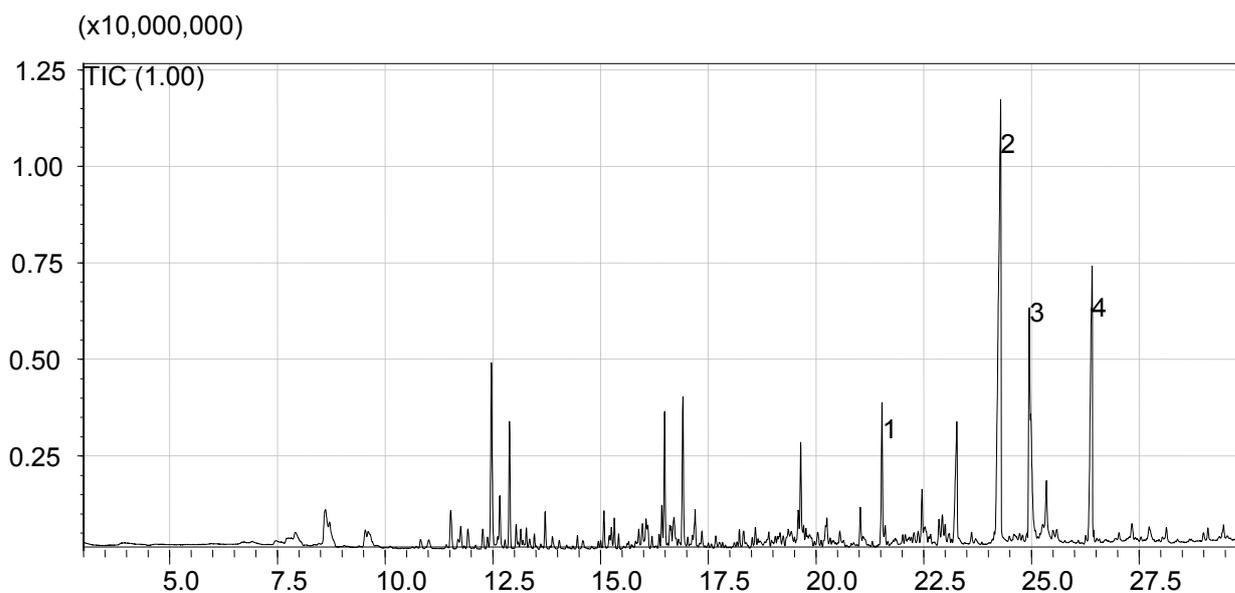


Figure 52 : Profil chromatographique (GCMS) des feuilles d'*Ammi visnaga*.

Les résultats de ces analyses sont confiés dans le tableau 16 :

Tableau 16 : Analyse qualitative des terpènes.

Plante	TR (min)	Composé
Fleurs de <i>Daucus carota</i>	16,961	β -Bisabolène
	18,496	Corotol
Fleurs d' <i>Ammi visnaga</i>	8,156	D-Limonène
	16,575	β -Copaéne
	16,941	β -Bisabolène
	18,630	Cédrol
	19,371	β -Asarone
Feuilles d' <i>Ammi visnaga</i>	21,530	Phytolacétate
	24,287	Visnagine
	24,951	Phytol
	26,400	Khelline

Comme on peut le voir, le plus grand nombre de composés terpéniques se trouvent dans les fleurs d'*Ammi visnaga*. Cette partie de la plante contient :

- la D-limonène qui est un terpène relativement stable connu comme un agent anti cancéreux.
- la β -copaène qui est un sesquiterpène tricyclique trouvé dans les huiles essentielles des plantes.
- la β -bisabolène, un sesquiterpène monocyclique utilisé comme additif alimentaire.
- le cédrol, alcool sesquiterpène connu comme un terpénoïde parfumé ayant la propriété de repousser certains insectes.
- la β -asarone, éther ayant la propriété comme un agent sédatif à faible dose et utilisé aussi comme antifongique et antimicrobien pour les plantes.

Quant aux feuilles, elles renferment d'autres composés non détectés dans l'organe précédent (fleurs) :

- La phytolacétate, composé connu comme un agent de parfum utilisés dans l'industrie.
- La visnagine qui est un dérivé de chromone-1,4-benzopyrène et le furane, ce composé est connu dans la médecine traditionnelle (voir partie 1 chapitre 1), il possède plusieurs activités biologiques et empêche la formation des calculs rénaux [179].
- Le phytol, un alcool diterpène connu par ces propriétés contre les insectes.
- La khelline qui est un principe actif très connu par sa présence dans les extraits d'*Ammi visnaga*, utilisé dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies comme les angines de poitrine et l'asthme (voir partie 1 chapitre 1) [36, 37, 42].

Concernant les fleurs de *Daucus carota ssp. maritima*, les analyses ont montré la présence de deux composés, l'un a été déjà détecté dans les fleurs d'*Ammi visnaga*, il s'agit de

la β -bisabolène, l'autre composé est le carotol qui est un alcool sesquiterpène connu par ces propriétés antioxydante et antifongique présent dans l'huile essentielle des graine de *Daucus carota ssp. maritima* [23, 180].

V. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Pour l'évaluation de la l'efficacité antioxydante, il existe plusieurs méthodes qui diffèrent sur le plan de leurs principes d'analyse et les conditions expérimentales [181]. C'est pour cela, il est préférable d'utiliser plusieurs tests antioxydants afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits [182].

Dans la présente étude, deux méthodes ont été exploités pour estimer la capacité antioxydante *in vitro* des extraits méthanolique et hydro-méthanolique des différents organes des plantes, il s'agit du pouvoir piégeur du radical DPPH \cdot ou test DPPH et pouvoir piégeur du radical cationique ABTS $^{+\cdot}$ ou test ABTS. Ces tests ont été choisis, parmi les tests les plus cités dans la littérature, pour leur facilité de mise en œuvre.

Nous présentons dans les figures suivantes les courbes de la vitamine C réalisées pour ces deux tests :

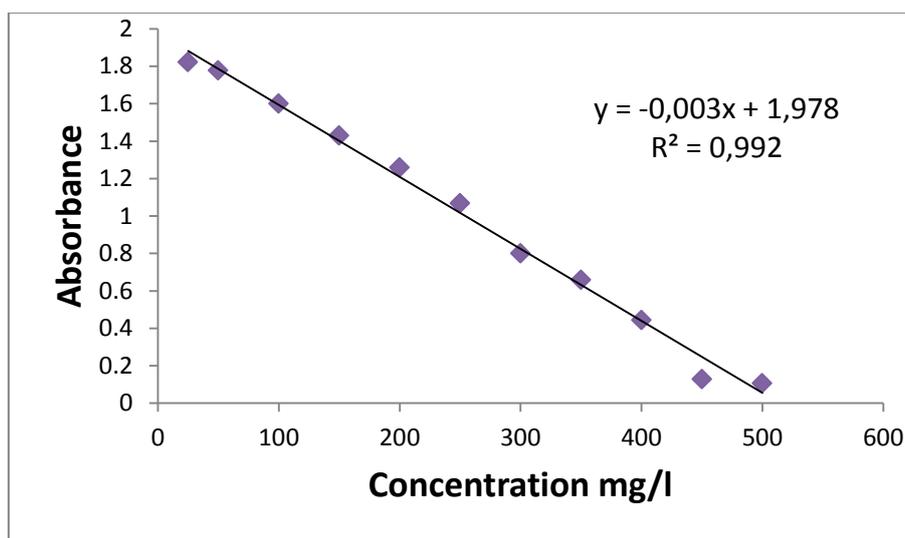


Figure 53 : Courbe de la vitamine C en utilisant le test DPPH.

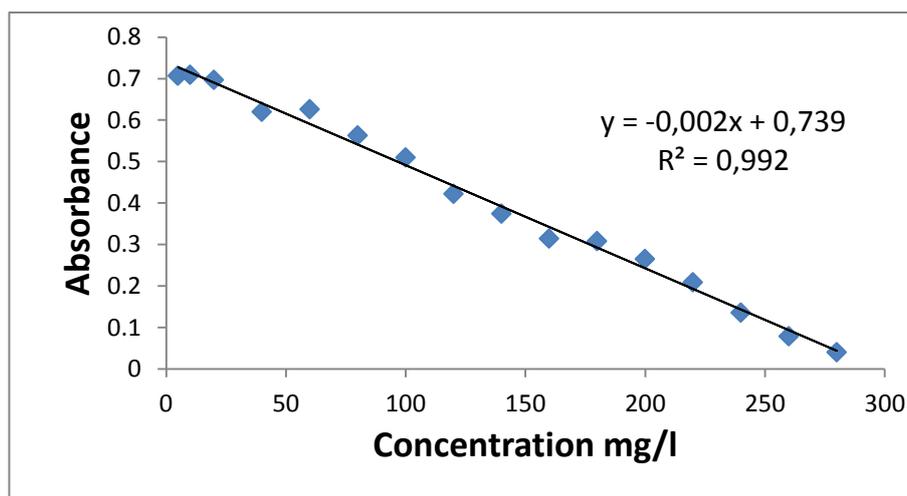


Figure 54 : Courbe de la vitamine C en utilisant le test ABTS

Les résultats des activités antioxydantes consignés dans les tableaux 17 et 18 sont déterminés en se basant sur les valeurs d'absorbance des deux solutions d'extraits (extrait méthanolique et extrait hydro-méthanolique) ayant réagi, et comparés à celles de la solution étalon de vitamine C.

Ces résultats sont également illustrés sur les figures 55 et 56 où l'activité antioxydante est exprimée en milligramme équivalents à la vitamine C (mg EVC). Ils se rapportent à 100 gramme de matière sèche et les valeurs représentent les moyennes de trois mesures \pm l'écart type.

Tableau 17 : Capacité antioxydante exprimée en mg EVC/100g MS déterminée par le test DPPH.

Plante	Organe	Extrait MeOH/eau (7/3)	Extrait MeOH
<i>Daucus carota maritima</i>	Fleurs	12077,63 \pm 23,26	5853,94 \pm 11,15
	Feuilles	2293,15 \pm 12,84	2281,30 \pm 10,42
	Racines	666,84 \pm 11,84	488,42 \pm 7,63
<i>Ammi visnaga</i>	Fleurs	2397,10 \pm 9,26	2220,78 \pm 14,10
	Feuilles	2361,57 \pm 15,52	1870,78 \pm 19,63
	Racines	764,21 \pm 14,21	535,26 \pm 92,63

<i>Arisarum vulgare</i>	Graines	3084,21 ± 16,10	2397,10 ± 12,68
	Fleurs	2333,94 ± 10,52	2294,73 ± 13,10
	Feuilles	1033,94 ± 18,89	552,36 ± 10,66
	Bulbes	541,84 ± 9,13	383,94 ± 7,63

Tableau 18 : Capacité antioxydante exprimée en mg EVC/100g MS déterminée par le test ABTS

Plante	Organe	Extrait MeOH/eau (7/3)	Extrait MeOH
<i>Daucus carota maritima</i>	Fleurs	16146,85 ± 28,92	6277,56 ± 12,89
	Feuilles	4739,86 ± 14,53	3963,48 ± 14,36
	Racines	711,88 ± 10,15	669,20 ± 9,67
<i>Ammi visnaga</i>	Fleurs	4683,91 ± 16,53	4237,25 ± 15,46
	Feuilles	2732,86 ± 18,46	2323,78 ± 10,22
	Racines	1117,48 ± 13,30	989,94 ± 10,90
<i>Arisarum vulgare</i>	Graines	4334,26 ± 150,76	3255,10 ± 12,76
	Fleurs	3858,74 ± 13,07	3576,94 ± 18,45
	Feuilles	2453,14 ± 17,25	1988,45 ± 16,12
	Bulbes	687,14 ± 11,69	490,55 ± 13,02

Au vu de ces résultats, on s'aperçoit que les plantes investiguées possèdent des activités antioxydantes qui varient considérablement d'une espèce à une autre, d'un organe à un autre et d'un extrait à un autre.

Il ressort que les parties aériennes (fleurs, feuilles et graines) exhibent les plus grandes valeurs du potentiel antioxydant estimé par les deux méthodes et que les extraits hydro-méthanoliques sont toujours plus actifs que les extraits méthanoliques comme le montre clairement les figures 55 et 56.

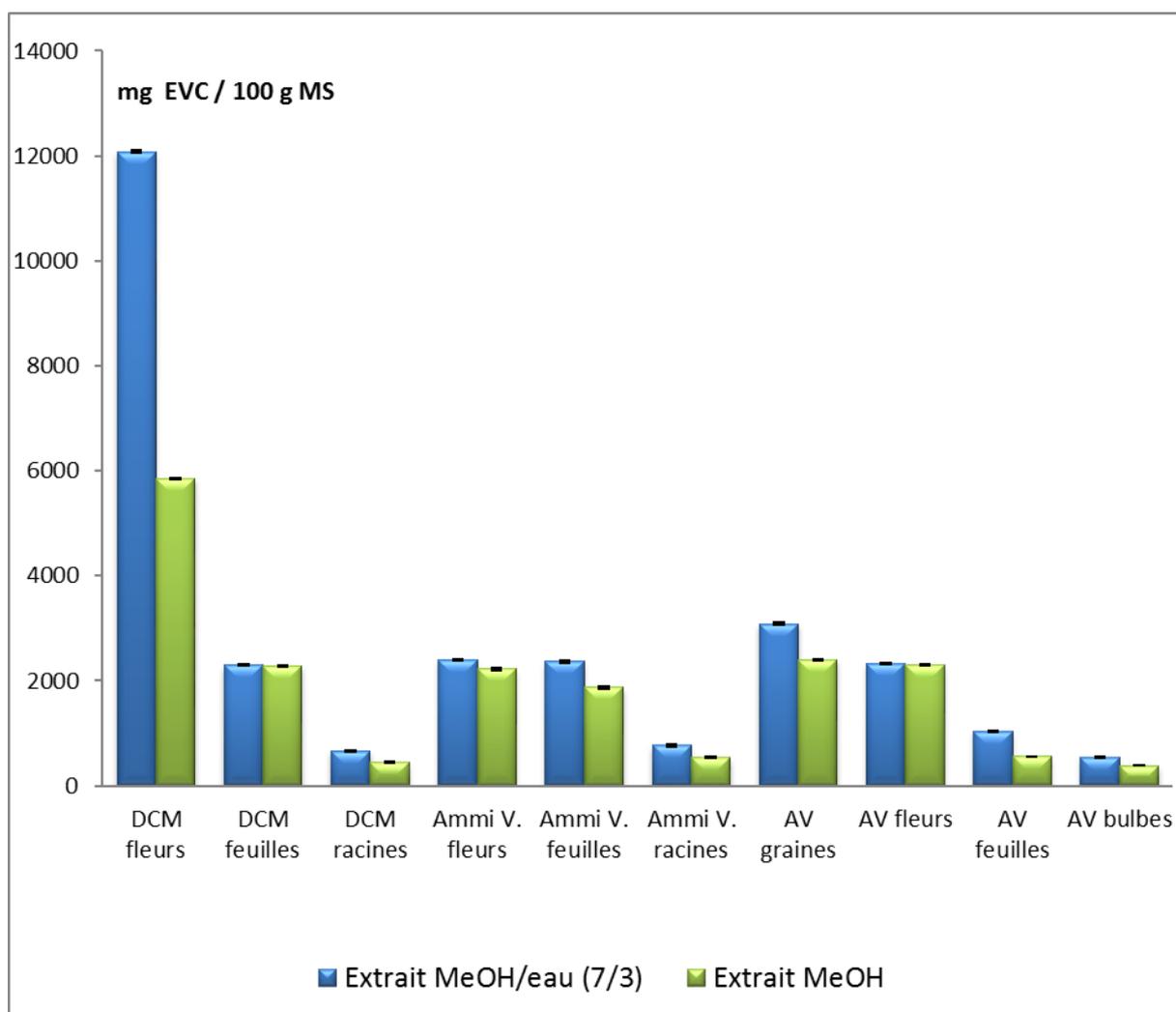


Figure 55 : Histogramme de la capacité antioxydante exprimée en mg EVC/100g MS déterminée par le test DPPH.

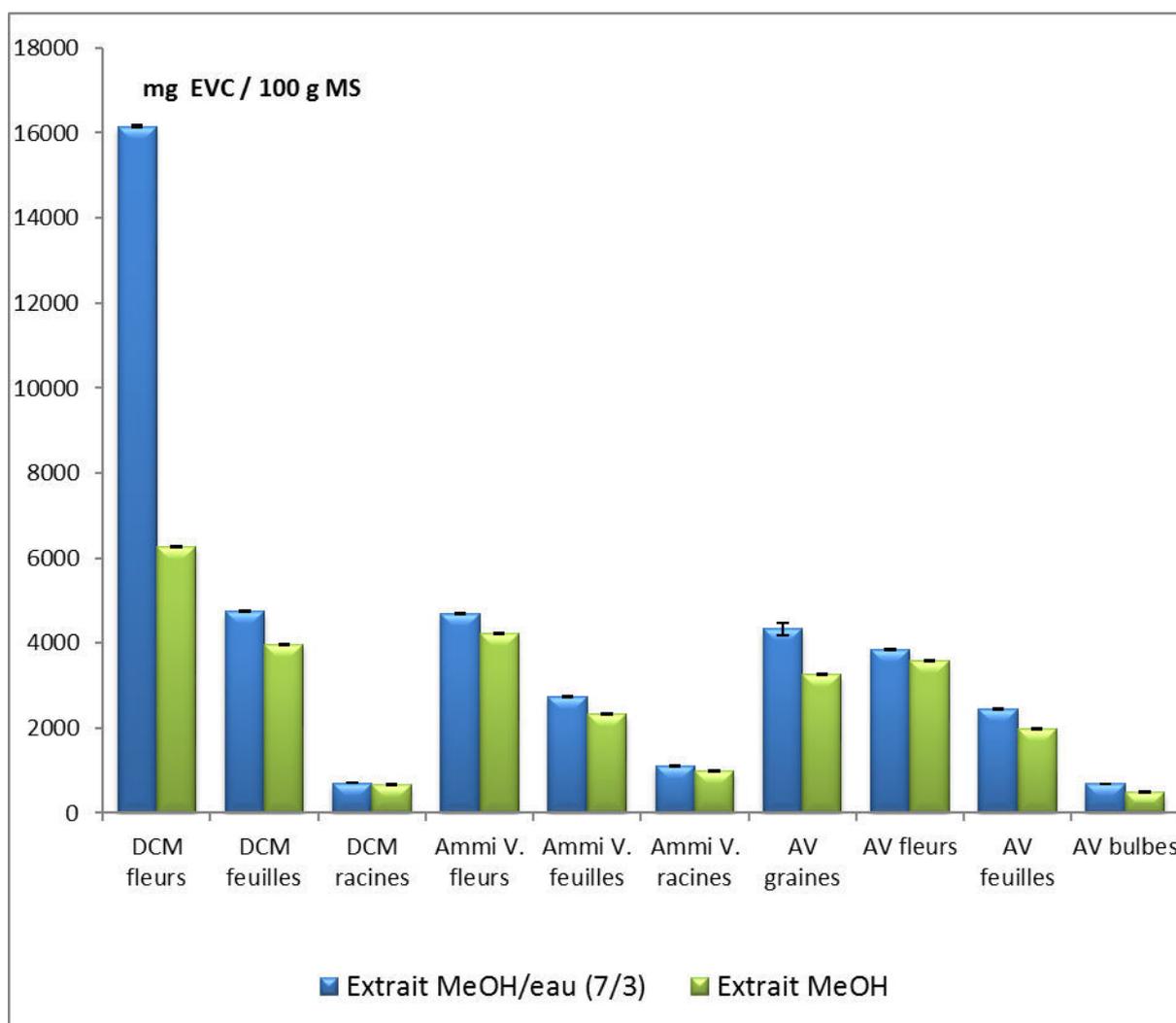


Figure 56 : Histogramme de la capacité antioxydante exprimée en mg EVC/100g MS déterminée par le test ABTS.

Notant que l'extrait hydro-méthanolique des fleurs de *Daucus carota* présentent une capacité antioxydante largement supérieure à celle des autres extraits avec une valeur de 16146,85 mg EVC / 100g MS.

On constate aussi que le test du DPPH donne les plus faibles valeurs d'activité anti-radicalaire par rapport au test ABTS. Cette sous-estimation par le test du DPPH est aussi observée par Kim [183] et par Arnao [184], elle s'expliquerait par les interférences qui se produiraient à 517 nm et par la non-solubilité du DPPH en milieu aqueux.

Malgré ces difficultés liées à l'usage du DPPH, il continue toujours à être utilisé.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, une corrélation positive a été observée du fait que les plantes les plus riches en composés phénoliques possèdent l'activité antioxydante la plus élevée.

VI. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Vu leur richesse en composés phénoliques et leur forte capacité antioxydante, on s'est intéressé à évaluer l'activité antibactérienne des extraits des parties aériennes des trois plantes sur quelques germes pathogènes, en utilisant la méthode du disque ou méthode de diffusion en milieu solide.

10 grammes de matière végétale broyée sont macérées dans 100 ml de solvant pendant 24 heures sous agitation, l'opération est réalisée 03 fois. Après filtration du mélange, le solvant est chassé sous vide, les masses obtenues sont diluées à différentes concentration au DMSO.

VI-1. Activité antibactérienne des extraits de *Daucus carota ssp. maritima*

Les résultats de l'activité antibactérienne sont regroupés dans les tableaux 19 et 20.

D'après ces résultats, on constate que sur 144 tests effectués, 67 sont apparus résistants et 73 tests présentent une sensibilité limitée. De plus, 7 extraits ont présenté une sensibilité moyenne avec des zones d'inhibition comprise entre 14,6 et 17,5 mm. Par ailleurs, Deux extraits ont manifesté une sensibilité élevée, il s'agit de l'extrait méthanolique brut des fleurs (150 mg/ml) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 23) avec une zone d'inhibition de 21,3 mm et de l'extrait hydro-méthanolique brut des feuilles vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* Carbapénèmase négative (KPC⁻) avec une zone d'inhibition de 24,1 mm.

Sur l'ensemble des résultats consignés dans ces tableaux, il apparaît aussi que (KPC⁺) et *Escherichia coli* sont les souches les plus résistantes aux extraits testés. A l'inverse, *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible avec une zone d'inhibition minimale de 12,1 mm, enregistrée avec la plus faible concentration de l'extrait au méthanol (4,68 mg/ml).

D'autre part, pour les fleurs, l'extrait au méthanol manifeste des activités antibactériennes plus élevées que celles de l'extrait hydro-méthanolique comme le reflète la figure 68. Cela peut-être expliqué par la présence de la lutéoline-7-glucoside et de l'acide ellagique, molécules bioactives identifiées antérieurement par LCMS.

Tableau 19 : Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des fleurs de *Daucus carota maritima*.

	150 mg/ml		75 mg/ml		37,5 mg/ml		18,75 mg/ml		9,375 mg/ml		4,68 mg/ml	
	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH
<i>E. coli</i>	9,2	7,2	8,6	7,2	8,6	6,7	7,3	6,6	7,3	6,6	6,7	6,6
KPC +	7,2	12,1	6,7	10,2	< 6	8,2	< 6	8,2	< 6	7,4	< 6	6,6
KPC -	9,0	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	8,2	8	8,2	7,7	8,2
ATCC 53	10,1	15,3	8,7	14,9	8,5	10,2	< 6	9,3	< 6	6,9	< 6	6,9
ATCC 23	9,2	21,3	8,1	17,5	8,1	17,2	7,1	15,5	7	13,6	7	12,1
MRSA	8,7	9,3	8,4	9,3	8,6	9,2	< 6	9,2	< 6	9,0	< 6	8,5

Tableau 20 : Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des feuilles de *Daucus carota maritima*.

	150 mg/ml		75 mg/ml		37,5 mg/ml		18,75 mg/ml		9,375 mg/ml		4,68 mg/ml	
	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH
<i>E. coli</i>	8,1	9,8	7,6	7,7	7,4	7,7	7,4	7,7	7,0	7,7	6,6	7,6
KPC +	7,0	10,6	6,9	9,4	6,9	8	< 6	7,9	< 6	7,1	< 6	6,9
KPC -	24,1	7,9	16,1	7,7	9,6	7,7	9,5	7,6	9	7,1	8,6	7,1
ATCC 53	12,3	10	7,5	9,5	7	9,4	7	6,9	7	6,6	7	6,6
ATCC 23	10,5	9,7	10,1	9,1	9	9	9	9	8,8	7,9	8,8	7,9
MRSA	10,1	14,6	10	11,7	10	10,7	10	9,3	9,8	8,6	9,2	7,6

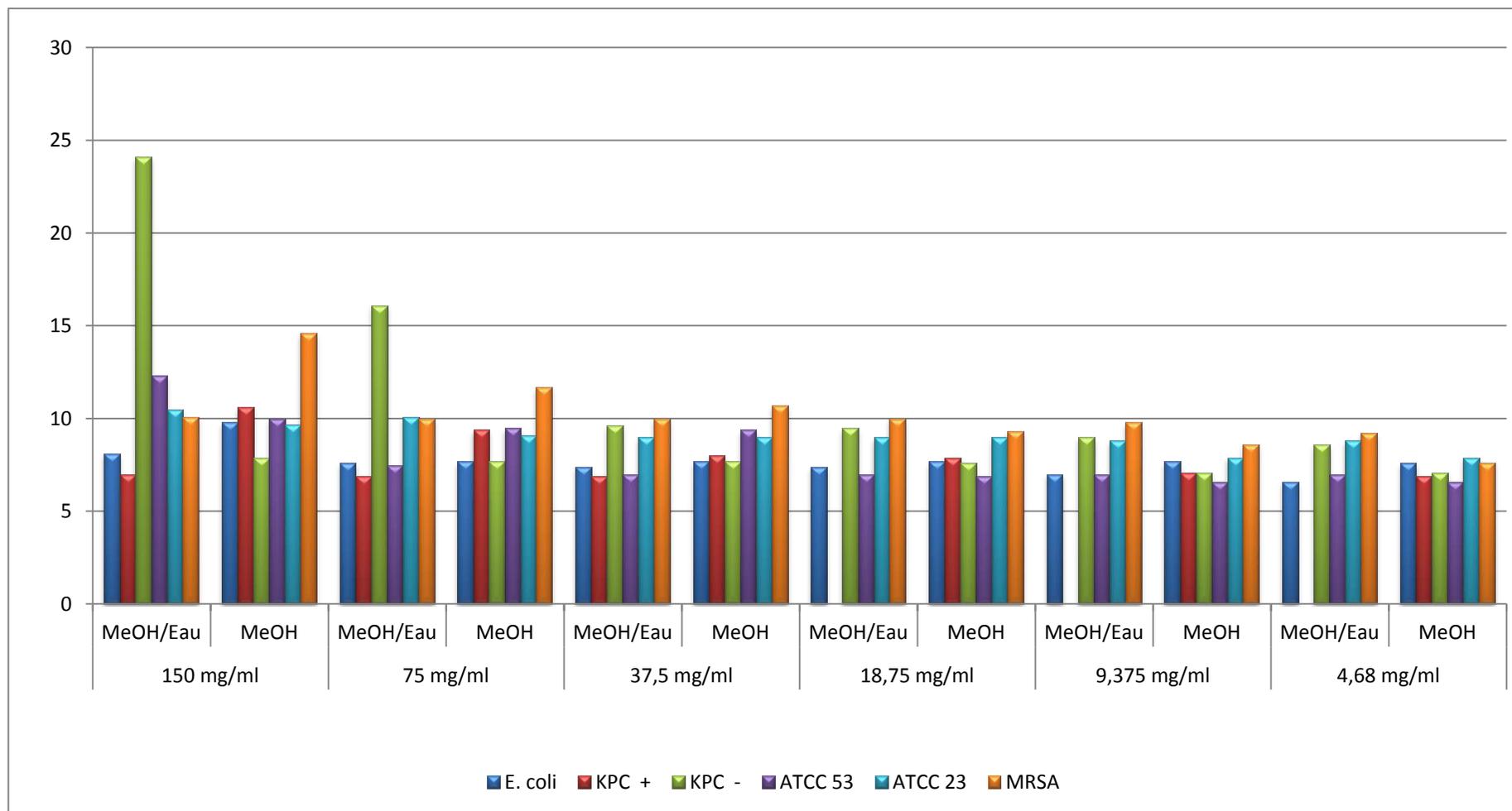


Figure 57 : Histogramme de la capacité antibactérienne des extraits des feuilles de *Daucus carota Maritima*

VI-2. Activité antibactérienne des extraits d'*Ammi visnaga*

Les tableaux 21 et 22 indiquent les diamètres d'inhibition des extraits hydro-méthanolique (7/3) et méthanolique d'*Ammi visnaga*.

Au vu de ces résultats, on remarque que sur 144 tests effectués, 67 sont apparus résistants. Les tests restants ont manifesté des activités antibactériennes dont 73 présentant des sensibilités limitées et 3 présentant des sensibilités moyennes.

Il est à noter que la souche la plus sensible est KPC⁺ avec une zone d'inhibition maximale de 16 mm qui correspond à l'extrait au méthanol brut (150 mg/ml). Par contre la souche la plus résistante est la souche MRSA.

On s'aperçoit aussi que l'extrait méthanolique des fleurs n'a aucun pouvoir antibactérien même aux plus fortes concentrations. A l'inverse, l'extrait hydro-méthanolique présente des activités avec des sensibilités limitées même aux plus faibles concentrations comme le confirme la figure 58.

Tableau 21 : Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des fleurs d'*Ammi visnaga*

	150 mg/ml		75 mg/ml		37,5 mg/ml		18,75 mg/ml		9,375 mg/ml		4,68 mg/ml	
	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH
<i>E. coli</i>	9,6	< 6	9,6	< 6	8,7	< 6	8,4	< 6	7,2	< 6	7,2	< 6
KPC +	11,5	< 6	9,2	< 6	8,1	< 6	8,6	< 6	7,2	< 6	7	< 6
KPC -	9,2	7,7	8,8	7,7	8,7	7,7	8,2	7,6	8,1	7	8,1	7
ATCC 53	12,7	< 6	10,8	< 6	9,3	< 6	9,3	< 6	9,2	< 6	9,2	< 6
ATCC 23	10,5	7,5	9,3	7	9	7	8,7	7	7,5	7	7	7
MRSA	12,1	7,1	10,1	7,1	10,1	7,1	9	7,1	8,9	7,1	8,9	7,1

Tableau 22 : Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des feuilles d'*Ammi visnaga*.

	150 mg/ml		75 mg/ml		37,5 mg/ml		18,75 mg/ml		9,375 mg/ml		4,68 mg/ml	
	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH
<i>E. coli</i>	10,3	10,6	8,5	8,3	8,1	8,3	8,1	8,1	8	8,1	7,9	8,1
KPC +	9,3	16	7,1	13,1	7	12,2	7	7	7	7	7	7
KPC -	9,7	13,1	8,8	11,3	8,1	11,2	8,1	7	8,1	7	7,3	7
ATCC 53	11,2	14,8	9,6	10,1	8,7	9,6	8	8,1	7,7	8,1	7	< 6
ATCC 23	9,7	14,1	8,1	12,1	8,1	8,1	7,9	7,1	7,9	< 6	7,9	< 6
MRSA	8,6	8,6	8	8,4	8	8,1	8	8,1	7,9	7	7,9	< 6

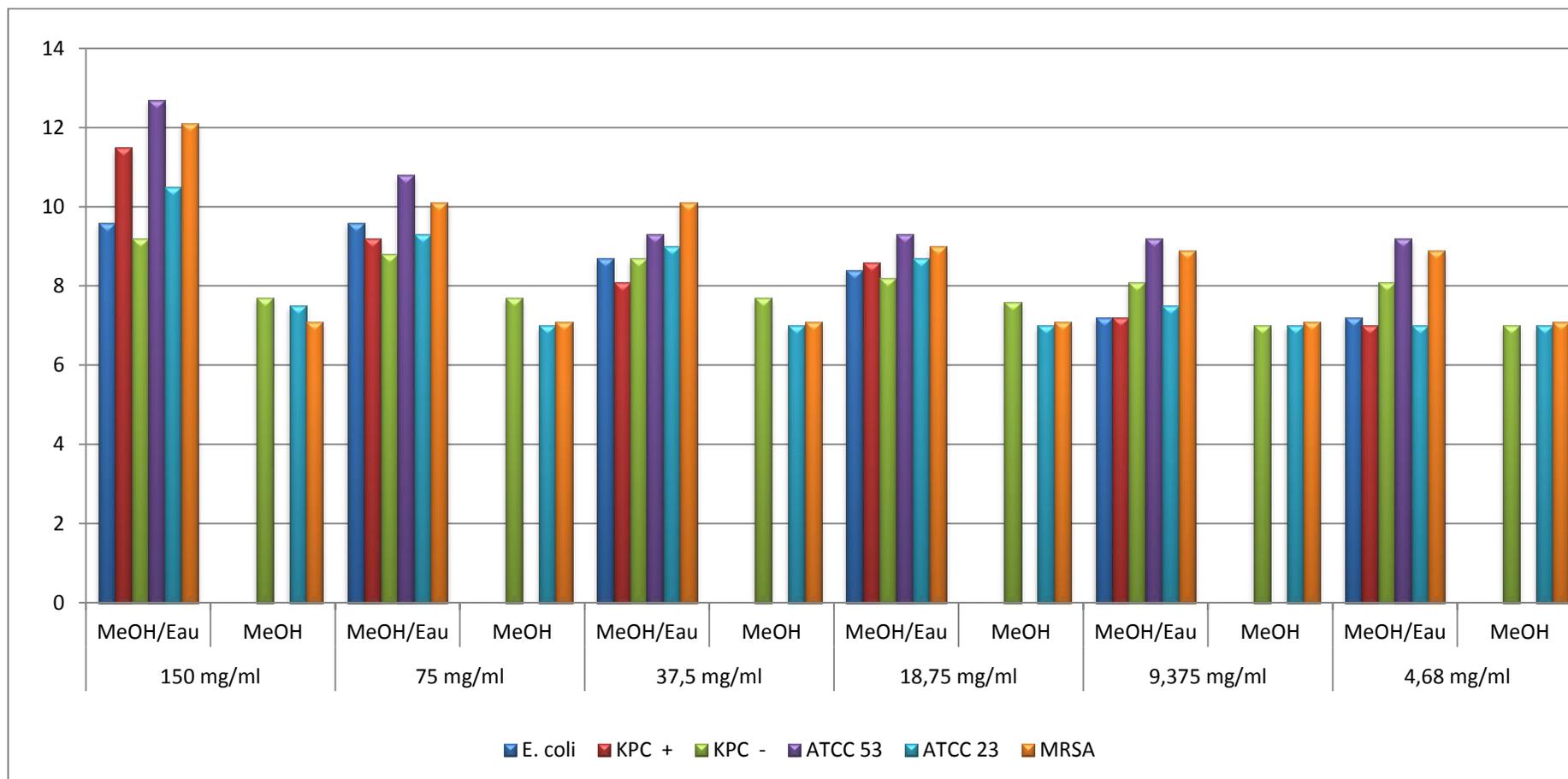


Figure 58 : Histogramme de la capacité antibactérienne des extraits des fleurs d'Ammi visnaga.

VI-3. Activité antibactérienne des extraits d'*Arisarum vulgare*

Les résultats de l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits méthanolique et hydrométhanolique des graines, fleurs et feuilles d'*Arisarum vulgare* sont confiés dans les tableaux 23, 24 et 25.

En observant ces résultats, on s'aperçoit que :

- Pour les extraits des graines ;
 - L'extrait hydro-méthanolique ne possède aucune action inhibitrice sur *E. coli* et que l'activité sur KPC⁺ ne se manifeste qu'avec l'extrait brut et qui présente aussi la valeur de la zone d'inhibition la plus élevée (19,2 mm).
 - L'extrait au méthanol semble actif même avec les plus faibles concentrations.
 - Le *Staphylococcus aureus* ATCC 23 apparait la souche la plus sensible.
- Pour les extraits des fleurs ;
 - Les germes les plus résistants sont KPC⁺ et ATCC 53
 - *Staphylococcus aureus* (ATCC 23) est la souche la plus sensible avec une zone d'inhibition minimale de 11,2 mm qui correspond à l'extrait au méthanol de plus faible concentration (4,68 mg/ml).
 - L'extrait méthanolique brut exhibe une activité antibactérienne très élevée vis-à-vis *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition qui dépasse les 24 mm.
- Les extraits des feuilles n'ont pas donné des activités microbiennes remarquables comme le montre la figure 59.

Tableau 23 : *Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des graines d'Arisarum vulgare.*

	150 mg/ml		75 mg/ml		37,5 mg/ml		18,75 mg/ml		9,375 mg/ml		4,68 mg/ml	
	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH
<i>E. coli</i>	< 6	10,5	< 6	10,1	< 6	9,7	< 6	9,1	< 6	8,8	< 6	8,7
KPC +	19,2	9,5	< 6	9,5	< 6	9,4	< 6	9,1	< 6	8,7	< 6	8,7
KPC -	12,4	13,3	11,1	11,5	10,3	11,4	9,3	9,4	7,7	9,0	< 6	9,0
ATCC 53	9,9	11,9	8,9	11,5	8,1	11,3	7,5	9,4	< 6	9,2	< 6	9,1
ATCC 23	13,5	9,7	11,6	9,2	8,1	9,2	7,5	9,1	7,3	9,0	7,3	9,0
MRSA	11,4	9,6	10,1	9,6	8,5	9,6	8,1	9,5	7,4	9,2	7,2	9,1

Tableau 24 : Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des fleurs d'*Arisarum vulgare*.

	150 mg/ml		75 mg/ml		37,5 mg/ml		18,75 mg/ml		9,375 mg/ml		4,68 mg/ml	
	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH
<i>E. coli</i>	11,3	8,0	9,5	7,1	7,3	7,0	7,3	< 6	7,1	< 6	7,1	< 6
KPC +	9,7	7,9	7,1	7,1	7,0	7,0	< 6	7,0	< 6	7,0	< 6	7,0
KPC -	9,3	8,7	8,3	8,1	8,0	8,1	7,0	8,1	7,0	8,1	7,0	8,1
ATCC 53	11,4	7,9	8,6	7,9	7,1	7,9	< 6	7,9	< 6	6,9	< 6	6,9
ATCC 23	18,1	24,1	13,8	20,8	12,5	18,4	7,1	17,4	< 6	15	< 6	11,2
MRSA	11,7	13,2	10,1	11,9	7,1	10,3	< 6	10	< 6	8,1	< 6	8,0

Tableau 25 : Diamètre de la zone d'inhibition des extraits des feuilles d'*Arisarum vulgare*.

	150 mg/ml		75 mg/ml		37,5 mg/ml		18,75 mg/ml		9,375 mg/ml		4,68 mg/ml	
	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH	MeOH/Eau	MeOH
<i>E. coli</i>	10,4	12	8,5	8,4	7,6	7,6	7,5	7,6	7,1	7,0	7,1	< 6
KPC +	9,1	10	7,0	7,9	7,0	7,1	7,0	7,1	7,0	< 6	7,0	< 6
KPC -	13,9	17,2	9,9	13,9	7,1	8,9	7,1	8,8	7,1	8,6	7,1	8,3
ATCC 53	10,1	7,5	9,1	7,1	9,0	7,1	8,9	7,1	8,9	7,1	7,3	7,1
ATCC 23	13,9	10,1	8,1	9,0	7,6	7,0	7,2	7,0	< 6	< 6	< 6	< 6
MRSA	9,3	10,5	8,1	8,1	7,0	7,0	< 6	< 6	< 6	< 6	< 6	< 6

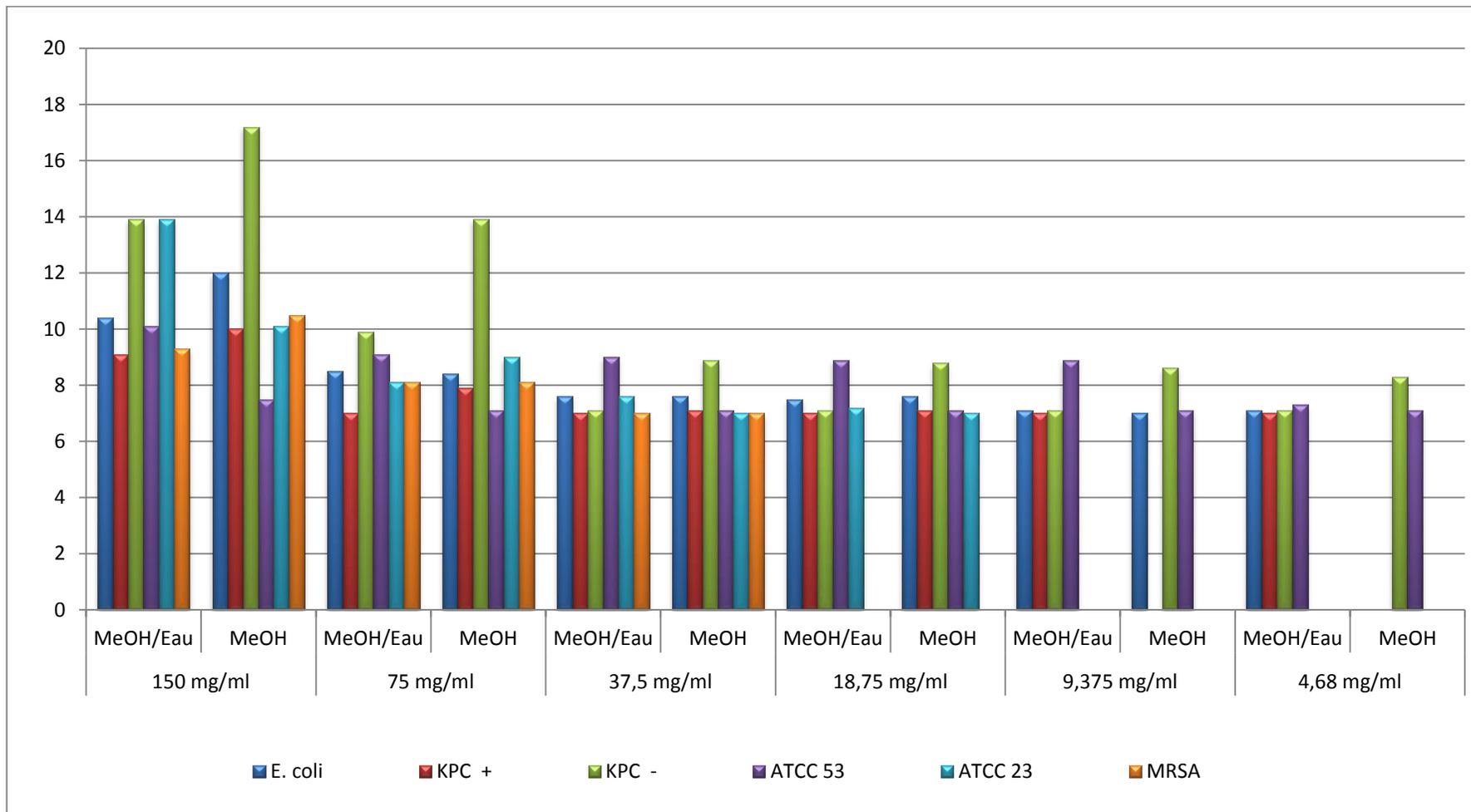
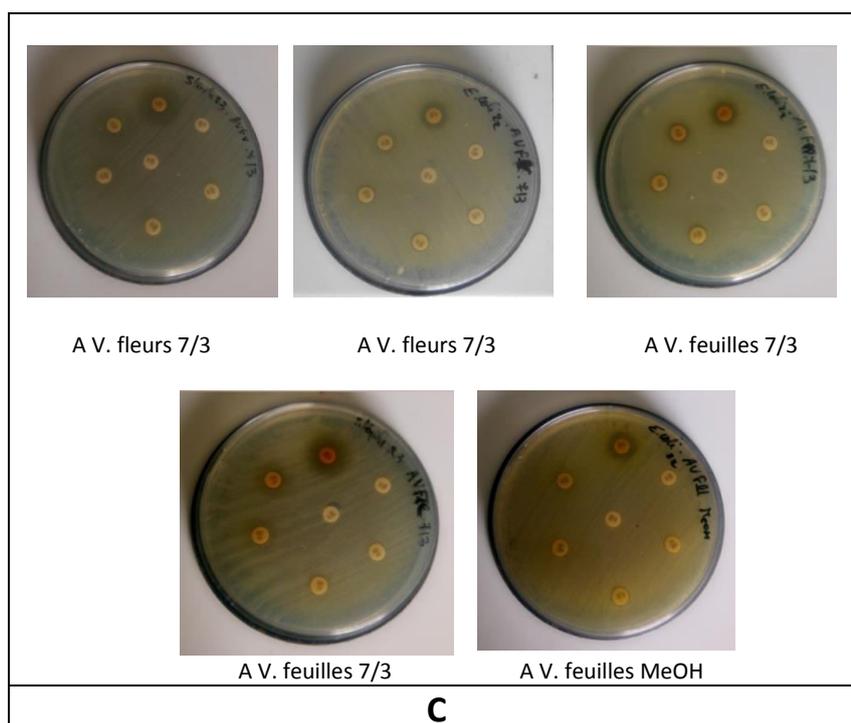
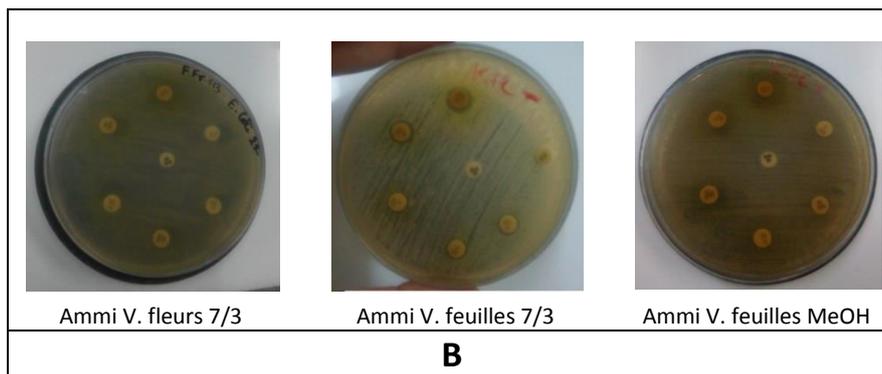
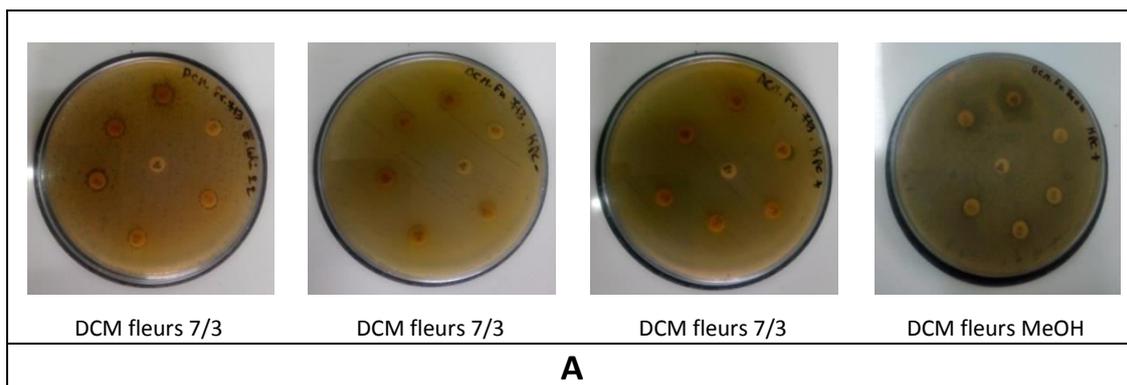


Figure 59 : Histogramme de la capacité antibactérienne des extraits des feuilles d'Arisarum vulgare.

D'une manière globale, la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 23 apparaisse la souche la plus sensible (sa croissance a été inhibée par tous les extraits bruts à la concentration de 150 mg/ml), cette sensibilité varie en diminuant les concentrations ce qui rend ces bactéries plus résistantes. A l'inverse, les souches *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* Carbapénèmase négative ATCC 53 semble les souches les plus résistantes. Cela est probablement dû à la différence de la structure de la paroi cellulaire entre les bactéries gram (+) et les bactéries gram (-) [185]. En effet, ces dernières, indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une membrane externe sélective, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides contenant des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et des porines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire[186]. Cette différence d'activité entre les bactéries gram (+) et les bactéries gram (-) a déjà été observée par plusieurs auteurs [187, 188].

D'autre part, l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de *Daucus carota ssp. maritima* et l'extrait au méthanol des feuilles d'*Ammi visnaga*, semble être les deux meilleurs extraits du point de vue activité antibactérienne. C'est probablement le résultat de la présence de la quercitrine (connu comme anti-amibien et protecteur vasculaire) dans ces deux extraits comme il a été indiqué antérieurement par les analyses chromatographiques.

Quelques exemples de l'effet antibactérien sont illustrés dans la figure ci-dessous :



A : Effet antibactérien de *Daucus carota maritima* contre *E.coli*, KPC^+ et KPC^- .

B : Effet antibactérien de l'*Ammi visnaga* contre *E.coli*, KPC^+ et KPC^- .

C : Effet antibactérien de l'*Arisarum vulgare* contre *E.coli* et *Staphylococcus aureus*.

Figure 60 : Quelques exemples de l'effet antibactérien des plantes étudiées sur différents germes

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail de recherche que nous avons entrepris, s'inscrit dans le cadre de la valorisation des substances naturelles de la flore algérienne. Nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de trois plantes de l'est algérien à savoir : *Daucus carota ssp. maritima*, *Ammi visnaga* et *Arisarum vulgare*.

Nous avons donc quantifié les composés phénoliques présents dans les extraits méthanoliques et hydro-méthanoliques des différents organes de ces trois espèces, puis nous avons identifié quelques phytocomposés (polyphénols et terpènes) par LC-MS et GC-MS, avant de tester les propriétés antioxydantes et antibactériennes de tous les extraits.

Le criblage phytochimique, en tant qu'analyse qualitative, a mis en évidence la forte présence des composés phénoliques et surtout les flavonoïdes. Ces plantes contiennent également d'autres familles de composés tels que les tanins, les terpènes et les alcaloïdes. Quant aux anthocyanes, ils sont absents dans tous les organes des plantes étudiées.

Les dosages des composés phénoliques ont montré les parties aériennes possèdent les teneurs en polyphénols totaux les plus élevés par rapport aux racines et aux bulbes. De plus les extraits hydro-méthanoliques sont toujours plus riches en polyphénols totaux que les extraits au méthanol sauf dans le cas des graines d'*Ammi visnaga*. Le même résultat est obtenu pour les flavonoïdes totaux.

En outre, les analyses chromatographiques ont montré la présence de certains composés communs entre les trois espèces et d'autres qui sont spécifiques pour chaque espèce. Notons que les fleurs et les feuilles sont les organes les plus riches en composés phénoliques. Par ailleurs, la phase acétate d'éthyle apparaît la phase qui contient le plus de composés identifiés.

L'étude des extraits de dichlorométhane (CH_2Cl_2) des différents organes a montré que les fleurs d'*Ammi visnaga* possèdent le plus grand nombre caractérisé de composés terpéniques.

Il ressort de l'étude des activités antioxydantes que les parties aériennes exhibent les plus grandes valeurs estimées par les deux méthodes (DPPH et ABTS) et que les extraits hydro-méthanoliques sont plus actifs que les extraits méthanoliques. Ces résultats présentent une bonne corrélation positive avec les teneurs en polyphénols totaux.

Nous avons pu mettre en évidence l'effet inhibiteur *in vitro* de certains extraits des trois plantes sur plusieurs souches bactériennes. Les résultats obtenus montrent que la majorité de ces extraits présentent des effets inhibiteurs plus au moins remarquables. En revanche, cette étude indique l'absence de corrélations avec les teneurs en composés phénoliques totaux.

En conclusion, les résultats obtenus méritent d'être complétés. Il serait intéressant d'évaluer d'autres activités pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* tout en cherchant à isoler et à caractériser les molécules bioactives responsables de ces activités.

Références Bibliographiques

Livres et publications scientifiques :

- [1] : Singh, A. P., and BAMS, M. (2002) : A treatise on phytochemistry. *Emedia Science Ltd in the UK*. p.(N/A).
- [2]: Bidlack, W. R., Omaye, S. T., Meskin, M. S., and Topham, D. K. (Eds.). (2000): *Phytochemicals as bioactive agents*. CRC press.
- [3]: Green, J. (2011): *The Herbal Medicine-Maker's Handbook: A Home Manual*. Crossing Press.
- [4]: Lucchesi, M. E. (2005) : Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles (*Doctoral dissertation*, Université de la Réunion).
- [5]: World Health Organization. (1999): *WHO monographs on selected medicinal plants* (Vol. 2). World Health Organization.
- [6]: HANIFI, N. (1991) : Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. *In conservation des ressources végétales*.
- [7]: Glimn-Lacy, J., and Kaufman, P. B. (2006): Botany illustrated: *introduction to plants, major groups, flowering plant families*. Springer Science & Business Media.
- [8]: Ghisalberti, E. L. (1994): The daucane (carotane) class of sesquiterpenes. *Phytochemistry* 37(3), 597-623.
- [9]: Evergetis, E., Koulocheris, S. D., Haroutounian, S. A. (2015): Exploitation of Apiaceae Family plants as valuable renewable source of essential oils containing crops for the production of fine chemicals: Part II. *Industrial Crops and Products* 64, 59-67.
- [10]: Murray, M., Morrison, W. I., Whitelaw, D. D. (1982): Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance. *Advances in parasitology* 21, 1-68.
- [11]: Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, AL., Mitaku, S., Leonce, S., Renard, P., Pierre, A., Atassi, G. (1998): Synthesis and cytotoxic activity of pyranocoumarins of the seselin and xanthyletin series. *Journal of Natural Products* 61(8), 982–986.
- [12]: Hartwell, J.L. (1971): Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 34, 310.
- [13]: Bishayee, A., Sarkar, A., Chatterjee, M. (1995): Hepatoprotective activity of carrot (*Daucus carota* L.) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver. *Ethnopharmacology* 47(2), 69–74.
- [14]: Majumder, P.K., Dasgupta, S., Mukhopadhaya, R.K., Majumdar, U.K., Gupta, M. (1997): Anti-steroidogenic activity of the petroleum ether extract and fraction 5 (fatty acids) of carrot (*Daucus carota* L.) seeds in mouse ovary. *Ethnopharmacology* 57(3), 209–212.
- [15]: Christensen, L.P., Brandt, K. (2006): Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(3), 683–693.

- [16]: Matsunaga, H., Katano, M., Yamamoto, H., Fujito, H., Mori, M., Takata, K. (1990): Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* CA Meyer. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 38(12), 3480–3482.
- [17]: Brandt, K., Christensen, L.P., Hansen-Møller, J., Hansen, S.L., Haraldsdottir, J., Jespersen, L., Purup, S., Kharazmi, A., Barkholt, V., Frøkiær, H., Kobæk-Larsen, M. (2004): Health promoting compounds in vegetables and fruits: A systematic approach for identifying plant components with impact on human health. **Trends in Food Science & Technology** 15, 384–393.
- [18]: Porchezian, E., Ansari, S.H., Ali, M. (2000): Analgesic and anti-inflammatory activity of volatile oil from *Daucus carota* L. seed. **Indian Journal of Natural Products** 16(1), 24–26.
- [19]: Ahmed, A.A., Bishr, M.M., El-Shanawany, M.A., Attia, E.Z., Ross, S.A., Paré, P.W. (2005): Rare trisubstituted sesquiterpenes daucanes from the wild *Daucus carota*. **Phytochemistry** 66(14), 1680–1684.
- [20]: Glassgen, W.E., Wray, V., Strack, D., Metzger J. W., Seitz, H.U. (1992): Anthocyanins from cell suspension cultures of *Daucus carota*. **Phytochemistry** 31(5), 1593-1601.
- [21]: Dirks, U., Herrmann, K., (1984): 4-(β -D-glucopyranosyloxy) benzoic acid, a characteristic phenolic constituent of the apiaceae. **Phytochemistry** 23(8), 1811-1812.
- [22]: Dhillon, R.S., Gautam, V.K., Kalsi, P.S., Chabra, B.R. (1989): Carota 1,4- β -oxide, a sesquiterpene from *Daucus carota*. **Phytochemistry** 28(2), 639–640.
- [23]: Mazzoni, V., Tomi, F., Casanova, J. (1999): A daucane-type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil. **J. Favour Frag** 14(5), 268–272.
- [24]: Ceska, O., Chaudhary, S.K., Warrington, P.J., Ashwood-Smith, M.J. (1985): Furocoumarins in the cultivated carrot, *Daucus carota*. **Phytochemistry** 25(1), 81–83.
- [25]: Kumarasamy, Y., Nahar, L., Byres, M., Delazar, A., Sarker, S. D. (2005): The Assessment of Biological Activities Associated with the Major Constituents of the Methanol Extract of ‘Wild Carrot’ (*Daucus carota* L.) Seeds. **Journal of Herbal Pharmacotherapy** 5(1), 61-72.
- [26]: Gupta, K.R., Niranjana, G.S. (1982): A new flavone glycoside from seeds of *Daucus carota*. **Planta Medica** 46(12), 240–241.
- [27]: Lund, E.D. (1992): Polyacetylenic carbonyl compounds in carrots. **Phytochemistry** 31(10), 3621–3623.
- [28]: Kilibarda, V., Ivanić, R., Savin, K., & Mirić, M. (1989): Fatty oil from the fruit of wild (*Daucus carota* O. ssp. *caroto*) and cultivated carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* (Hoffm.) Arcang.). **Pharmazie** 44(2), 166-167.
- [29]: Baranska, M., Schulz, H., Baranski, R., Nothnagel, T., Christensen, L.P. (2005): In Situ Simultaneous Analysis of Polyacetylenes, Carotenoids and Polysaccharides in Carrot Roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53(17), 6565-6571.
- [30]: Miski, M., Mabry, T.J. (1986): A new daucane esters from *Ferula tingitana*. **Journal of Natural**

Products 49(4), 657–660.

[31]: Lamnaouer, D., Bodo, B., Martin, M.T., Molho, D. (1987): Ferulenol and ω -hydroxy ferulenol, toxic coumarins from *Ferula communis* var. *genuina*. *Phytochemistry* 26(6), 1613–1615.

[32]: Algarra, M., Fernandes, A., Mateus, N., De Freitas, V., Da Silva, J.C.E., Casado, J. (2014) : Anthocyanin profile and antioxidant capacity of black carrots (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) from Cuevas Bajas, Spain. *Journal of Food Composition and Analysis* 33(1), 71–76.

[33]: Glassgen, W.E., Seitz, H.U., Metzger, J.W. (1992): High-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of Anthocyanins from Plant Tissues and cell cultures of *Daucus carota* L. *Biological mass spectrometry* 21(6), 271-277.

[34]: Ozcelik, B., Kusmenoglu, S., Turkoz, S., Abbasoglu, U. (2004): Antimicrobial Activities of Plants from the Apicaceae. *Pharmaceutical Biology* 42(7), 526–528.

[35]: Gattefossé, J. (1952): L'*Ammi visnaga* et la Khelline, *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale* 32(353), 116-123.

[36]: Ghareeb, A.M., Zedan, T.H., Gharb L.A. (2011): Antibacterial and antifungal activities of *Ammi visnaga* extracts against pathogenic microorganisms. *Iraqi J Sci* 52(1), 30-36.

[37]: Vanachayangkul, P., Byer, K., Khan, S., Butterweck, V. (2007): An extract of *Ammi visnaga* L. prevents cell damage caused by oxalate. *Planta Medica* 73(9), 240.

[38]: Ashour, A., El-Sharkawy, S., Amer, M., Abdel-Bar, F., Kondo, R., Shimizu, K. (2013): Melanin Biosynthesis Inhibitory Activity of Compounds Isolated from Unused Parts of *Ammi visnaga*. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 3, 40-43.

[39]: Sonnenberg, H., Kaloga, M., Eisenbach, N., Fromming, K.K. (1995): Isolation and Characterization of an Angular-Type Dihydropyranocoumarin glycoside from the Fruits of *Ammi visnaga* (L.) LAM. (Apiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung* 50(9-10), 729-731.

[40]: Abduljalil, T.Z., Saour, K., Nasser, A.M. (2010): Phytochemical study of some flavonoids present in the fruits of Two *Ammi* L. Species wildy grown in Iraq. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences* 19(1), 48-57.

[41]: Bencheraiet, R., Kherrab, H., Kabouche, A., Kabouche, Z., Jay, M. (2011): Flavonols and Antioxidant Activity of *Ammi visnaga* L. (Apiaceae). *Records of Natural Products* 5(1), 52- 55.

[42]: Semyari, H., Owlia, P., Farhadi, S., Tabrizi, S.M. (2011). Evaluation of antimicrobial effect of “*Ammi visnaga*” against oral *streptococci*. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3(5), 126-129.

[43]: Saleh, N.A.M., El-Negoumy, S.I., El-Hadidi, M.N., Hosni, H.A. (1983). Comparative study of the flavonoids of some local members of the Umbelliferae. *Phytochemistry* 22(6), 1417-1420.

[44]: Kursinszki, L., Troilina, J., Szoke, E. (1998): Determination of visnagin in *Ammi visnaga* hairy root cultures using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Microchemical Journal* 59, 392-398.

- [45]: Kursinszki, L., Troilina, J., Szoke, E. (2000): Quantitative TLC of visnagin in genetically transformed root culture of *Ammi visnaga*. *Journal of planar Chromatography-Modern TLC* 13(6), 463-467.
- [46]: Xavier, C., & Molina, J. (2016): Phylogeny of medicinal plants depicts cultural convergence among immigrant groups in New York City. *Journal of Herbal Medicine* 6(1), 1-11.
- [47]: Arnold, H.J., Arnold, N., Gehu, J.M., Gehu-Franck, J. (1990): Ethnopharmacological survey of antidiabetic plants from syria, *Giornale Botanico Italiano* 124(1), 184-189.
- [48]: Ghrabi, Z. (2005): A guide to medicinal plants in north Africa. *Malaga: IUCN Centre for Mediterranean Cooperation*.
- [49]: Vanachayangkul, P. (2008). Ammi visnaga L. for the prevention of urolithiasis (*Doctoral dissertation*, University of Florida).
- [50]: Vanachayangkul, P., Byer, K., Khan, S., Butterweck, V. (2010). An aqueous extract of *Ammi visnaga* fruits and its constituents khellin and visnagin prevent cell damage caused by oxalate in renal epithelial cells. *Phytomedicine* 17(8), 653–658.
- [51]: Nelson, L.S., Shih, R.D. and Balick, M.J. (2007): *Handbook of poisonous and injurious Plants*. New York Botanical Garden.
- [52]: Grenand, P., Moretti, C. and Jacquemin, H. (1987) : *Pharmacopées traditionnelles en Guyane : créoles, palikur, wayâpi*.
- [53]: Dzutam, J.K., Touani, F.K., Kuete, V., 2015. Antibacterial activities of the methanol extracts of *Canarium schweinfurthii* and four other Cameroonian dietary plants against multi- drug resistant Gram-negative bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23(5), 565-570.
- [54]: Kim, K.H., Moon, E., Kim, H.K., Oh, J.Y., Kim, S.Y., Choi, S.U., Lee, K.R. (2012): Phenolic constituents from the rhizomes of *Acorus gramineus* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22(19), 6155–6159.
- [55]: Okoli, C.O., Akah, P. A. (2004): Mechanisms of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Culcasia scandens* P. Beauv (Araceae). *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 79(3), 473–481.
- [56]: Salako, O.A., Akindele, A.J., Shitta, O.M., Elegunde, O.O., Adeyemi, O.O. (2015): Antidiarrhoeal activity of aqueous leaf extract of *Caladium bicolor* (Araceae) and its possible mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology* 176, 225-231.
- [57]: Muhit, M.A., Izumikawa, M., Umehara, K., Noguchi, H. (2016): Phenolic constituents of the Bangladeshi medicinal plant *Pothos scandens* and their anti-estrogenic, hyaluronidase inhibition, and histamine release inhibitory activities. *Phytochemistry* 121, 30-37.
- [58]: Jamil Ahmed, M., Murtaza, G. (2015): A study of medicinal plants used as ethnoveterinary: Harnessing potential phytotherapy in Bheri, District Muzaffarabad (Pakistan). *Journal of Ethnopharmacology* 159, 209–214.

- [59]: Hegnauer, R. (1963): The taxonomic significance of alkaloids. *Chemical plant taxonomy* 389-427.
- [60]: Bate-Smith, E.C. (1968): The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance, II. Monocotyledons. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 60(383), 325-356.
- [61]: Williams, C.A., Harborne, J.B., Mayo, S.J. (1981): Anthocyanin pigments and leaf flavonoids in the family araceae. *Phytochemistry* 20(2), 217-234.
- [62]: Pagani, F. (1982): Phytoconstituents of *Arisarum vulgare* O. Targ.-Tozz. (Araceae). *Bollettino Chimico Farmaceutico* 121(9), 460-464.
- [63]: Kite, G.C., Sharp, H.J., Hill, P.S., Boyce, P.C. (1997) : Polyhydroxy alkaloids in the Aroid tribes Nephthytideae and Agloanemateae: Phytochemical support for intertribal relationship. *Biochemical Systematics and Ecology* 25(8), 757-766.
- [64]: Singh, J., Kamboj, S.S., Sandhu, R.S., Shangary, S., Kamboj, K.K. (1993): Purification and characterization of a tuber lectin from *Alocasia indica*. *Phytochemistry* 33(5), 979-983.
- [65]: Shangary, S., Singh, J., Kamboj, S.S., Kamboj, K.K., Sandhu, R.S. (1995): Purification and properties of four monocot lectins from the family Araceae. *Phytochemistry* 40(2), 449- 455.
- [66]: Allen, A. K. (1995): Purification and characterization of an *N*-acetyllactosamine-specific lectin from tubers of *Arum maculatum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1244(1), 129-132.
- [67]: Choo, C.Y., Chan, K.L., Sam, T.W., Hitotsuyanagi, Y., Takeya, K. (2001): The cytotoxicity and chemical constituents of the hexane fraction of *Typhonium flagelliforme* (Araceae). *Journal of Ethnopharmacology* 77(1), 129–131.
- [68]: Schmid, P.C., Holman, R.T., Soukup, V.G. (1997): 13-Phenyltridecanoic acid in seed lipids of some aroids. *Phytochemistry* 45(6), 1173-1175.
- [69]: Van, N.T.H., Minh, C.V., De Leo, M., Siciliano, T., Braca, A. (2006): Secondary metabolites from *Lasia spinosa* (L.) Thw. (Araceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 882-884.
- [70]: Franke, K., Hoffmann, M., Schmidt, J., Porzel, A., Arnold, N., Wessjohann, L. (2006): 2''-*O*-Glucosylvitexin, a chemotaxonomic marker for the genus *Cryptocoryne* (Araceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 546-548.
- [71]: Wu, Y.Y., Huang, X.X., Zhang, M.Y., Zhou, L., Li, D.Q., Cheng, Z.Y., Li, L.Z., Peng, Y., Song, S.J. (2015). Chemical constituents from the tubers of *Pinellia ternata* (Araceae) and their chemotaxonomic interest. *Biochemical Systematics and Ecology* 62, 236-240.
- [72]: Melhaoui, A., Jossang, A., Bodo, B. (1992): Structure of irniine, a pyrrolidine alkaloid from *Arisarum vulgare*. *J. Nat. Prod.* 55(7), 950–952.
- [73]: Melhaoui, A., Mallea, M., Jossang, A., Bodo, B. (1993): Antibiotic and Antifungal Pyrrolidine Alkaloids, from *Arisarum vulgare*. *Natural Product Letters* 2(3), 237-242.
- [74]: Melhaoui, A., Bodo, B. (1995): Inirgaine and *N*-methylirrigaine, two new piperidinol alkaloids

from tubers of *Arisarum vulgare*. *Natural Product Letters* 7(2), 101-108.

[75]: Fournier, P. (194) : **Le livre des Plantes médicinales et vénéneuses de France**. Paris, Ed. P. Lechevalier.

[76]: Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2831-2846.

[77]: Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., Curini, M. (2007): Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68(7), 939-953.

[78]: ابو زيد، الشحات نصر. (1986): *النباتات والأعشاب الطبية الشحات نصر ابو زيد*.

[79]: Raven, P.H., Johnson, G.B., Mason, K.A., Losos, J.B., Singer, S.R. (2017): **Biologie végétale**. Ed. De Boeck, 32 P

[80]: Small, E., Catling, P.M. (2000): **Les cultures Médicinales Canadiennes**. NRC Reserch Press, 1 P.

[81]: Bruneton, J. (2009) : **Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales**, 4 ème édition, Technique & documentation, Paris.

[82]: Muanda, F.N. (2010) : Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques (**Doctoral dissertation**, Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, 55-86).

[83]: Bouvier, F., Rahier, A., Camara, B. (2005) : Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research* 44(6), 357-429.

[84]: Walton, N.J., Brown, D.E. (1999): **Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products**; Ed: World Scientific.

[85]: Harbon, J.B., Williams, C.A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55(6), 481-504.

[86]: Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy, C., Jiménez L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79(5), 727 – 747.

[87]: Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005): Phenolic Compounds plants: An example of secondary metabolites of economic importance. Ed. **Polytechnic and university romandes presses, Lausanne, Italie**, 192 P.

[88]: Alkurd, A.R., Takruri, H.R., Al-Sayyed H. (2008): Tannin contents of selected plants used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4(3), 265 – 274.

[89]: Conrad, J., Vogler, B., Klaiber, I., Roos, G., Walter, U., Kraus, W. (1998): Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Phytochemistry* 48(4), 647 - 650.

[90]: Wollgast, J., Anklam, E. (2000): Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33(6), 423 - 447.

- [91]: Dykes, L., Rooney, L.W. (2006): Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Sciences* 44(3), 236 - 251.
- [92]: Axelson, M., Sjoval, J., Gustafsson, B.E., Setchell, K.D.R. (1982): Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature* 298, 659-660.
- [93]: Andersson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T. (1996): Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Advances in Drug Research* 28, 65-180.
- [94]: Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y., Fujisawa, S. (2005): Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry* 66(17), 2108 - 2120.
- [95]: De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman U.A.T. (2006): Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112, 31-63.
- [96]: Guignard, J.L. (1974) : *Abrégé de biochimie végétale*, Ed. Masson, Paris.
- [97]: Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J. (2005) : Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.
- [98]: Ribereau- Gayon, P. (1968) : *Les composés phénoliques des végétaux, Pascal Ribereau-Gayon*. Dunod, Paris, 254 P.
- [99]: Harborne, J.B. (1967): *Comparative biochemistry of the flavonoides*. Academic press. New York, 1-130 P.
- [100]: Brouillard, R. (1988): *The flavonoids, Advances Research Science 1980*, Ch 16: Flavonoids and flower colour, 525-538 P.
- [101]: Harborne, J.B., Grayer, R.J. (1988). *The flavonoids, Advances Research Science 1980*, Ch1: The anthocyanins, 1-20 P.
- [102]: Sannomiya, M., Fonseca, V.B., Da silva, M.A., Rocha L.R.M., Dos Santos L.C., Hiruma-Lima, C.A., Souza Brito, A.R.M., Vilegas, W. (2005): Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 97(1), 1-6.
- [103]: De Barros, M.P., Lemos, M., Maistro, E.L., Leite, M.F., Soosa, J.P.B., Bastos, J.K., De Andradede, S.F. (2008). Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 120(3), 372-377.
- [104]: Gurbuz, I., Yesilada, E., Ito, S. (2009): An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology* 121(3), 360-365.
- [105]: Ito, C., Itoigawa, M., Onoda, S., Hosokawa, A., Ruangrunsi, N., Okuda, T., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H. (2005): Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti- tumor promoting effect. *Phytochemistry* 66(5), 567-572.

- [106]: Win, N.N., Awale, S., Esumi, H., Tezuka, Y., Kadota, S. (2008): Novel anticancer agents, kayeassamins C-I from the flower of *Kayea assamica* of Myanmar. **Bioorg. Med. Chem** 16(18), 8653-8660.
- [107]: Hitara, T., Fujii, M., Akita, K., Yanaka, N., Ogawa, K., Kuroyanagi, M., Hongo, D. (2009): Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-corpulence and anticancer. **Bioorg. Med. Chem** 17(1), 25-28.
- [108]: Melagraki, G., Afantitis, A., Igglessi-Markopoulou, O., Detsi, A., Koufaki, M., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D.J. (2009): Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of Novel coumarin-3-aminoamides and their α -lipoic acid adducts. **European Journal of Medicinal Chemistry** 44(7), 3020-3026.
- [109]: Kalkhambkar, R.G., Kulkarni, G.M., Shivkumar, H., Nagendra-Rao, R. (2007): Synthesis of novel triheterocyclic thiazoles as anti-inflammatory and analgesic agents. **European journal of Medicinal chemistry** 42(10), 1272-1276.
- [110]: Smyth, T., Ramachandran, V.N., Smyth, W.F. (2009): A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. **International journal of antimicrobial agents** 33(5), 421-426.
- [111]: Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., Giammanco, M. (2007): *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food chemistry** 104(2), 466-479.
- [112]: Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Kadota, S. (2008): Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure- activity relationship. **Bioorg. Med. Chem** 16(10), 5434-5440.
- [113]: Rao, Y.K., Fang, S.H., Hsieh, S.C., Yeh, T.H., Tzeng, Y.M. (2009): The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities. **Journal of Ethnopharmacology** 121(2), 292-296.
- [114]: Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H.Y., Rodriguez- Mateos, A., Williams, R.J., Spencer, J.P.E. (2009): The *citrus* flavanone naringenin inhibits inflammatory signaling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 484(1), 100-109.
- [115]: Sutradhar, R.K., Rahman, A.K.M.M., Ahmad, M.U., Bachar S C. (2008): Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. **Phytochemistry Letters** 1(4), 179-182.
- [116]: Choi, H.J., Kim, J.H., Lee, C.H., Ahn, Y.J., Song, J.H., Baek, S.H., Kwon, D.H. (2009): Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. **Antiviral Research** 81(1), 77-81.
- [117]: Maurya, R., Gupta, P., Chand, K., Kumar, M., Dixit, P., Singh, N., Dube, A. (2009) : Constituents of *Tinospora sinensis* and their antileishmanial activity against *Leishmania donovani*, **Natural Product Research** 23(12), 1134-1143.
- [118]: Shon, H.Y., Son, K.H., Kwon, C.S., Kwon, G.S., Kang, S.S. (2004): Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinophora*

koreensis Nakai. *Phytomedicine* 11, 666-672.

[119]: Bruneton, J. (1993) : *Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales*. Paris, France: Lavoisier. 278-279 P.

[120]: Masquelier, J., Dumon, M.C., Dumas, J. (1981) : Stabilisation du collagène par les oligomères procyanidoliques. *Acta Therapeutica* 7, 101-105.

[121]: Okamura, H., Mimura, A., Yakou, Y., Niwano, M., Takahara, Y. (1993) : Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* 33(3), 557-561.

[122]: Kubata, B.K., Nagamune, K., Murakami, N., Merkel, P., Kabututu, Z., Martin, S.K., Kalulu, T.M., Mustakuk, H., Yoshida, M., Ohnishi-kameyama, M., Kinoshita, T., Duszenko, M., Urade, Y. (2005): *Kola acuminata* proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against *Trypanosoma brucei*. *International Journal for Parasitology* 35(1), 91-103.

[123]: Kim, J.Y., Lim, H.J., Lee, D.Y., Kim, J.S., Kim, D.H., Lee, H.J., Kim, H.D, Jeon, R., Ryu, J.H. (2009): In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 19(3), 937-940.

[124]: Nebeling, L. (2002): Phytochemicals: the color of a healthy diet. *J Ped Nutr Dev* 98, 2-9.

[125] : Ghnimi, W. (2015) : Etude phytochimique des extraits de deux *Euphorbiacées*: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*, Evaluation de leur propriété anti- oxydante leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase (*Doctoral dissertation*, Université de Lorraine).

[126] : Galez, P. (2011) : Mesures Physiques Annecy : *Techniques spectroscopiques d'analyse / Spectrophotométrie UV/visible*, 1-17 P.

[127] : Ludovic, J. (2006) : *De la substance à la structure : Exemples en chimie organique*, 16- 17 P.

[128]: Clark, B.J., Frost, T. and Russell, M.A. (1993): *UV spectroscopy techniques, instrumentation and data handling. Techniques in visible and ultraviolet spectrometry*, (vol4). Springer Science & Business Media.

[129]: Marston, A. (2007): Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry* 68, 2786–2798.

[130] : Panaiva, L. (2006) : *Les techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites*. Conférence Eurocopter, 2-24 P.

[131]: Kazakevich, Y. and LoBrutto, R. (2007): *HPLC for pharmaceutical scientifics*. John Wiley & Sons, INC., Publication.

[132]: Kibbey, C.E. (1997): An automated system for the purification of combinatorial libraries by preparative LC/MS. *Laboratory Robotics and Automation* 9(6), 309-321.

[133]: Ahuja, S. and Dong, M.W. (2005): *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC (Separation Science and Technology)*. Volume 6. Ed. Elsevier-Academic press.

[134]: Korfmacher, W.A. (2005): Foundation review: Principles and applications of LC–MS in new

drug discovery. *Drug Discovery Today* 10(20), 1357-1367.

[135]: McMaster, M.C. (2005): *LC/MS: A Practical User's Guide*. John Wiley & Sons, INC., Publication.

[136]: Sparkman, O.D., Penton, Z.E. and Kitson, F.G. (2011): *Gas chromatography and mass spectrometry. A practical guide*. 2nd ed., Elsevier, Inc., Oxford, UK.

[137]: Koppenol, W.H. (2001): 100 Years of peroxy-nitrite chemistry and 11 years of peroxy-nitrite biochemistry. *Redox Report* 6(6), 339-341.

[138]: Sies, H. (1991): Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift* 69(21), 965-968.

[139]: Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006): Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97(4), 654-660.

[140]: Koné, D. (2009) : Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes: extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols: étude de leur activité antioxydante (*Doctoral dissertation*, Metz).

[141]: Cavin, A. (1999) : Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires : *Tinospora crispa* (Menispermaceae) *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae) (*Doctoral dissertation*, Lausanne).

[142]: Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A., Aruoma, O.I. (2002) : Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J. Agric. Food Chem.* 50(18), 5042-5047.

[143]: Dasgupta, N., De, B. (2007): Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry* 101(2), 471-474.

[144]: Franceschini, P. (1994): *La peau et son vieillissement*. Ed Flammarion Dominos, Paris, 125 P.

[145]: Auberval, N. (2010) : Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle (*Doctoral dissertation*, Université de Strasbourg).

[146]: Bouayed, J. (2007) : Etude de la corrélation anxiété/statut oxydatif des granulocytes chez la souris et évaluation des effets antioxydants/neuroactifs des polyphénols extraits de *Prunus domestica* L (*Doctoral dissertation*, Metz).

[147]: Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., Manian, S. (2008): The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry* 107(3), 1000- 1007.

[148]: Halliwell, B. (1991): Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine* 91(3), 14S-22S.

[149]: Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio JR., A.Z., Scheerens, J.C., Miller, A.R. (2006): Modified 2,2-

Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem.* 54(4), 1151-1157.

[150]: Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1), 25-30.

[151]: Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y. (2003): Antioxydant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 81(3), 321-326.

[152]: Molyneux, P. (2004): The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn. J. Sci. Technol.* 26(2), 211-219.

[153]: Osman, A.M., Wong, K.K.Y., Fernyhough, A. (2006): ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346(1), 321-329.

[154]: Nauciel, C. and Vildé, J.L. (2005): *Bactériologie médicale*, 2^{ème} édition Masson.

[155]: Hart, T. and Shears, P. (1998) : *Atlas de poche de microbiologie en couleurs*, Médecine-science. Flammarion.

[156]: Nicklin, J., Graeme-cook, Paget, T. and Killington, R. (2000) : *L'essentiel en microbiologie*, Ed Berti.

[157]: Denis, F. (2011) : *Bactériologie médicale*. Elsevier-Masson Ed. 283 P.

[158]: Dedet, J.P. (2007) : *La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes*. Dunod, Paris.

[159]: Vincent, M.C. (1991) : *L'aromatogramme. Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie*. 4, Paris 6.

[160]: Ponce, A.G., Fritz, R., DE, L., Valle, C., Roura, S.I. (2003) : Antimicrobial activity of essential oils on the vative microflora of organic Swiss chard, *Lebensm-wiss. U-technol.* 36, 679-684.

[161]: Heni, S. (2016) : Sélection d'extraits bio-actifs des espèces du genre *Thymus* comme conservateurs antibactériens naturels. (Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar)

[162]: Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. (2005) : *Bactériologie clinique*. Chapitre XI — *Escherichia coli*. 152 P.

[163]: Kitchel, B., Rasheed, J.K., Patel, J.B., Srinivasan, A., Navon-Venezia, S, Carmeli, Y., Brolund, A., Giske, C.G. (2009): Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob. Agents Chemother* 53(8), 3365-3370.

[164]: Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Montiel, H., 1992. *Bactériologie clinique*, 2^{ème} Ed., Ellipse, Chapitre XXII — *Pseudomonas*, 265 P.

[165]: Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (2010): *Microbiologie* 3^{ème} Ed., De Boeck. 520-582

- [166]: Fauchère, J.L., Avril, J.L. (2002) : *Bactériologie générale et médicale*. Ed., Ellipse. 213- 281P.
- [167]: Harborne, J.B. (1984): *Phytochemical Methods a guide to modern technique of plants analysis*, Chapman et Hall, 2 nd ed. London.
- [168]: Harborne, J.B. (1994): *The flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall, Cambridge.
- [169]: Razafindrambao, R.S. (1973) : *Travaux et documents de l'ORSTOM*, N° 25 ORSTOM. Paris.
- [170]: Bouquet, A. (1972) : *Travaux et documents de L'ORSTOM*, N° 13, ORSTOM, Paris.
- [171]: Bruneton, J. (1993) : *Pharmacognosie et Phytochimie des plantes médicinales*. 2^{ème} édition, Paris. 914 P.
- [172]: Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T., Troszynska, A. (2008) : Antioxidant activity of extract of Adzuki bean and its fractions. *Journal of Food Lipids* 15(1), 119-136.
- [173]: Kim, D.O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.Y., Lee, C.Y. (2003): Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 51(22), 6509-6515.
- [174]: Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999): The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4), 555-559.
- [175]: Chun, O.K., Kim, D.O., Lee, C.Y. (2003): Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 51(27), 8067- 8072.
- [176]: Toudert, N. (2011) : Etude phytochimique et évaluation de quelques activités biologiques de *Ampelodesma mauritanica*. *Thèse de Doctorat*, Université Badji Mokhtar- Annaba-.
- [177]: Blois, M.S. (1958): Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.
- [178]: Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) : Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology Medicine* 26, 1231-1237.
- [179]: Franchi, G.G., Bovalini, L., Martelli, P., Ferri, S., Sbardellati, E. (1985) : High performance liquid chromatography analysis of the furanochromones khellin and visnagin in various organs of *Ammi visnaga* (L.) Lam. at different developmental stages. *Journal of ethnopharmacology* 14(2-3), 203-212.
- [180]: Sridhar, S.R., Rajagopal, R.V., Rajavel, R., Masilamani, S., Narasimhan, S. (2003) : Antifungal activity of some essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7596–7599.
- [181]: Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. (2007): Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105(3), 940–949.
- [182]: Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C., et Abdelly, C. (2009) : Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*

47(8), 2083-2091.

[183]: Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y., 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50(13), 3713-3717.

[184]: Arnao, M.B. (2000): Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology* 11(11), 419-421.

[185]: Nikaido, H. (2003): Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(4), 593–656.

[186]: Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008): Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies* 331(5), 372-379.

[187]: Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007): The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* 105, 1126-1134.

[188]: Garrett, R-H. and Grisham, C-M. (2000): Les transports membranaires, *Biochimie*. Ed DeBoeck. Pp 314.

Sites et pages consultées:

[site 1]: L'état des ressources génétiques forestières mondiales (rapport national Algérie) Edition 2012, <http://www.fao.org/3/a-i3825e/i3825e0.pdf>. Page consultée mars 2017.

[site 2] : fiche eFlore de *Daucus carota subsp. maritimus*, www.tela-botanica.org. Page consultée juillet 2015.

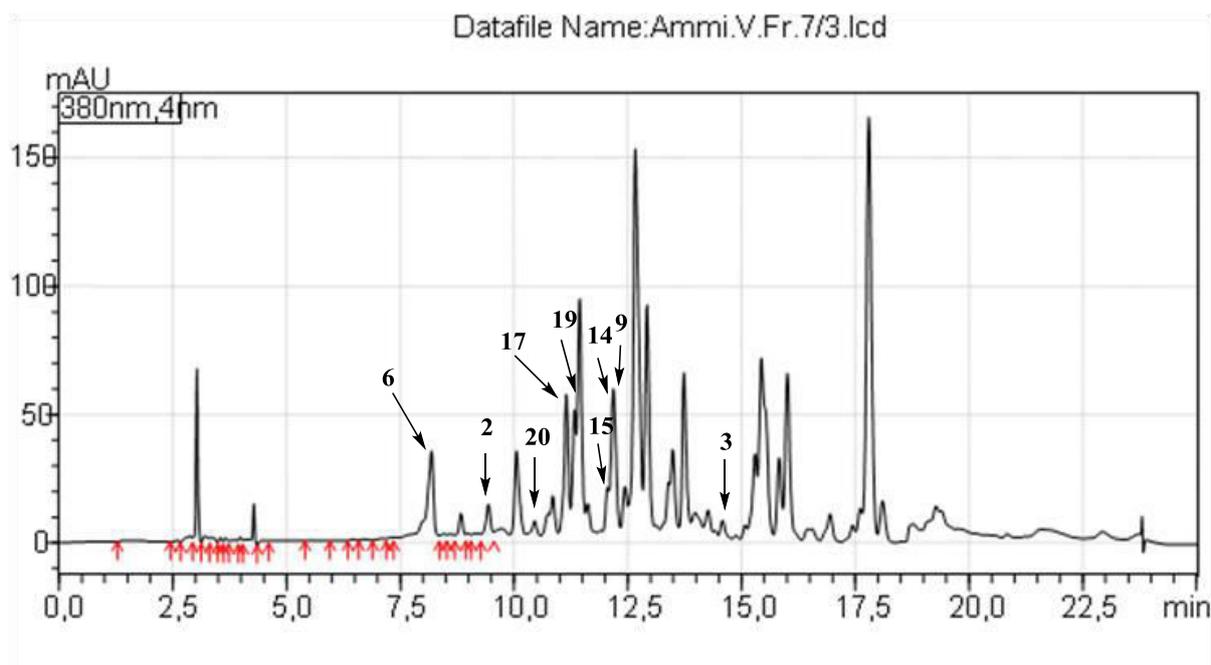
[site 3]: fiche eFlore de *Visnaga daucooides*, www.tela-botanica.org. Page consultée juillet 2015.

[site 4]: fiche eFlore de *Arisarum vulgare*, www.tela-botanica.org. Page consultée juillet 2015.

[site 5]: <http://www.phac-aspc.gc.ca/id-mi/mrsa-fra.php>, page consultée mai 2017.

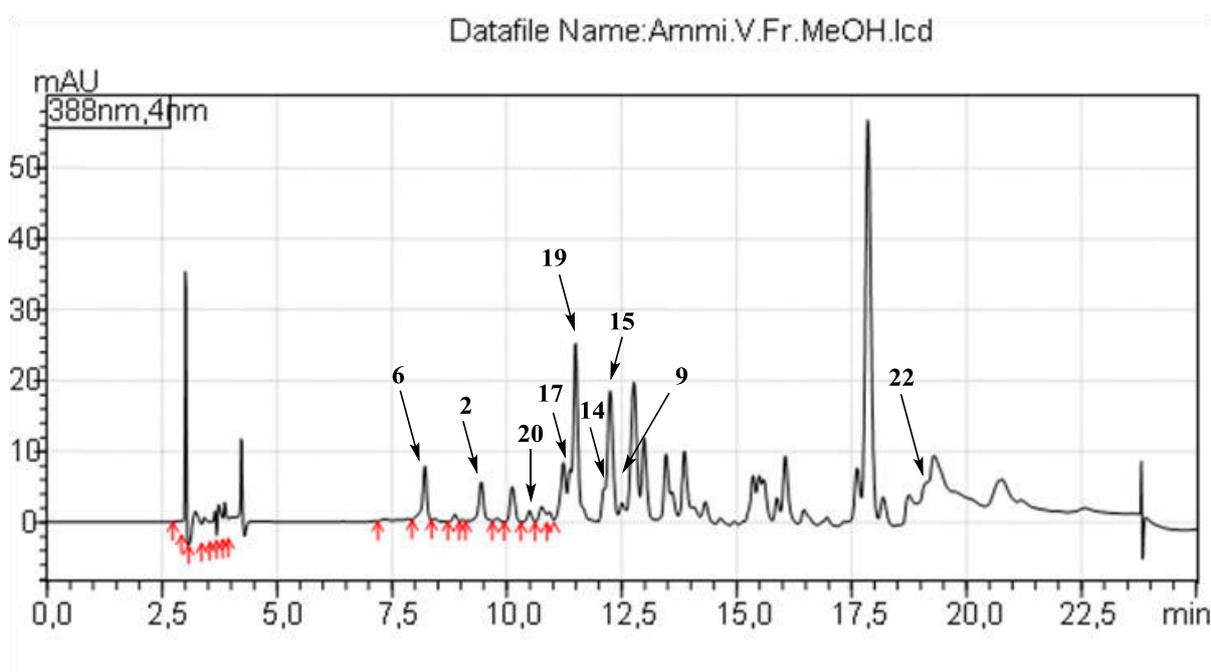
[site 6]: <http://www.algerie-monde.com/parcs-naturels/el-kala/>. Page consultés mai 2017.

Annexe



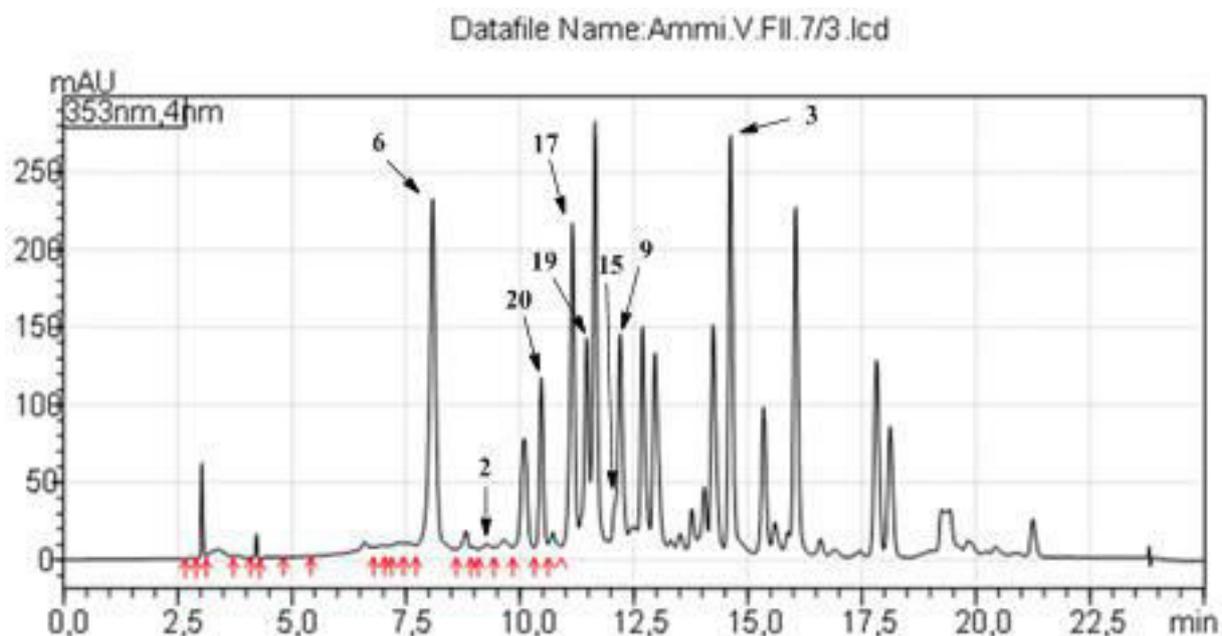
2 : acide caféique, 3 : acide férulique, 6 : acide chlorogénique, 9 : acide 1,5/3,5 dicaféylquinique, 14 : quercitrine, 15 : kaempférol-glucoside, 17 : isoquercétine, 19 : kaempférol-rutinoside, 20 : rutine

Figure 61: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait 7/3 des fleurs d'*Ammi visnaga*.



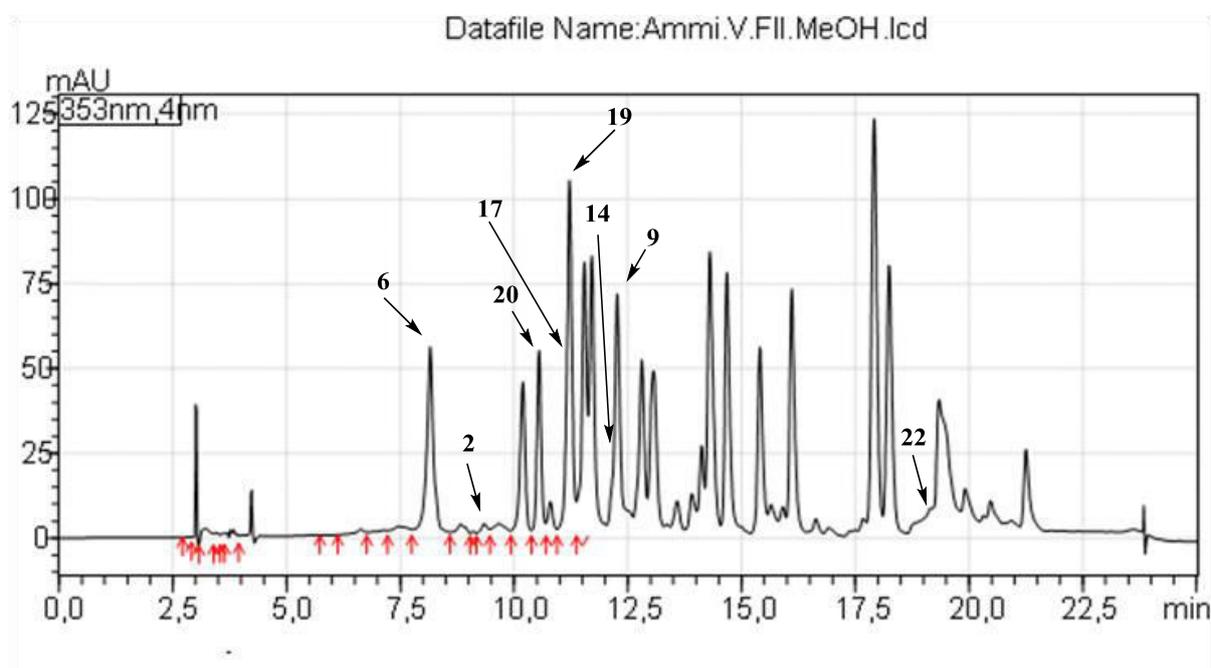
2 : acide caféique, 6 : acide chlorogénique, 9 : acide 1,5/3,5 dicaféylquinique, 14 : quercitrine, 15 : kaempférol-glucoside, 17 : isoquercétine, 19 : kaempférol-rutinoside, 20 : rutine, 22 : isoxanthohumol

Figure 62 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait MeOH des fleurs d'*Ammi visnaga*.



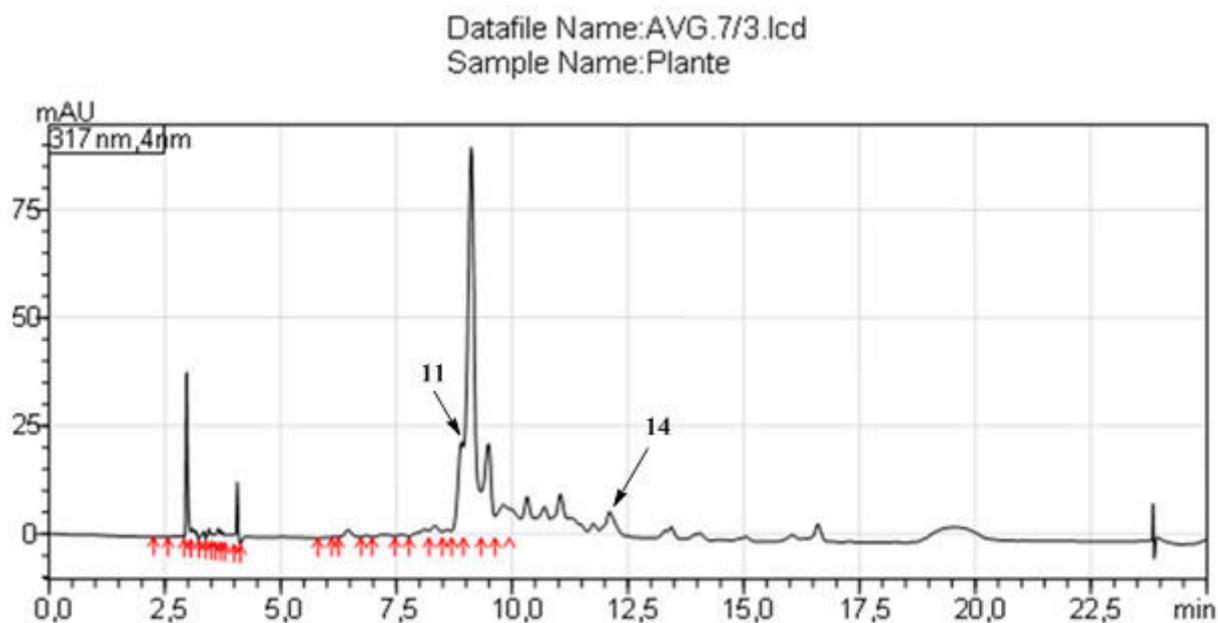
2 : acide caféique, 3 : acide férulique, 6 : acide chlorogénique, 9 : acide 1,5/3,5 dicaféylquinique, 15 :
kaempférol-glucoside, 17 : isoquercétine, 19 : kaempférol-rutinoside, 20 : rutine

Figure 63: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait 7/3 des feuilles d'Ammi visnaga.



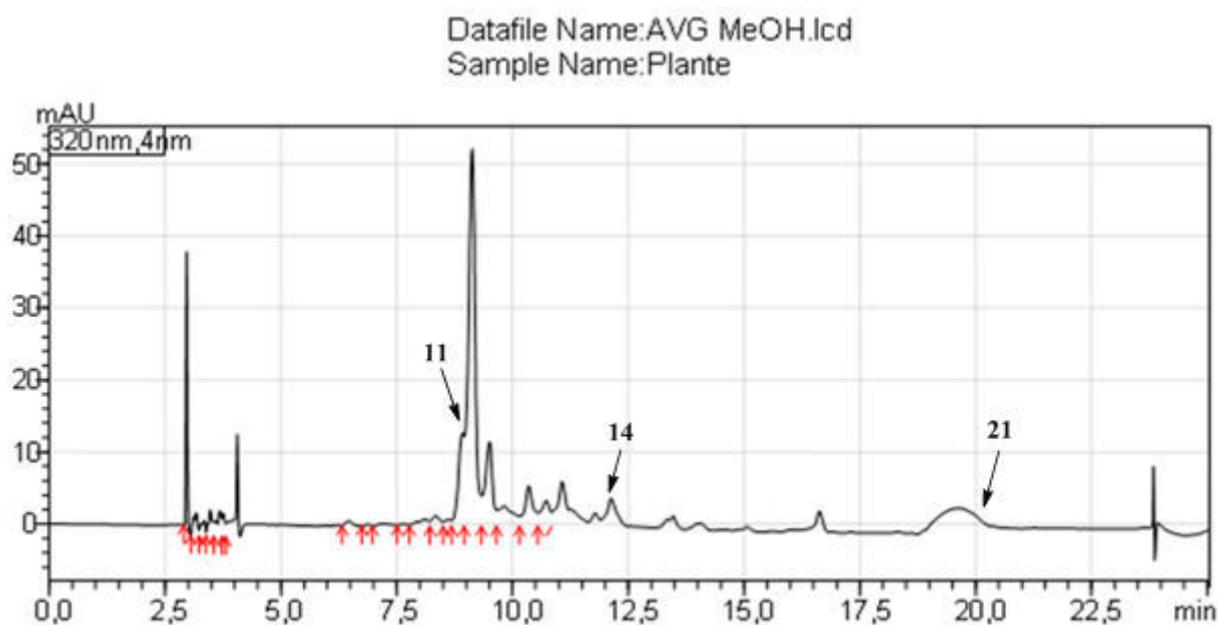
2 : acide caféique, 6 : acide chlorogénique, 9 : 3,5 dicaféylquinique, 14 : quercitrine, 17 : isoquercétine, 19 :
kaempférol-rutinoside, 20 : rutine, 22 : isoxanthohumol

Figure 64: Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait MeOH des feuilles d'Ammi visnaga.



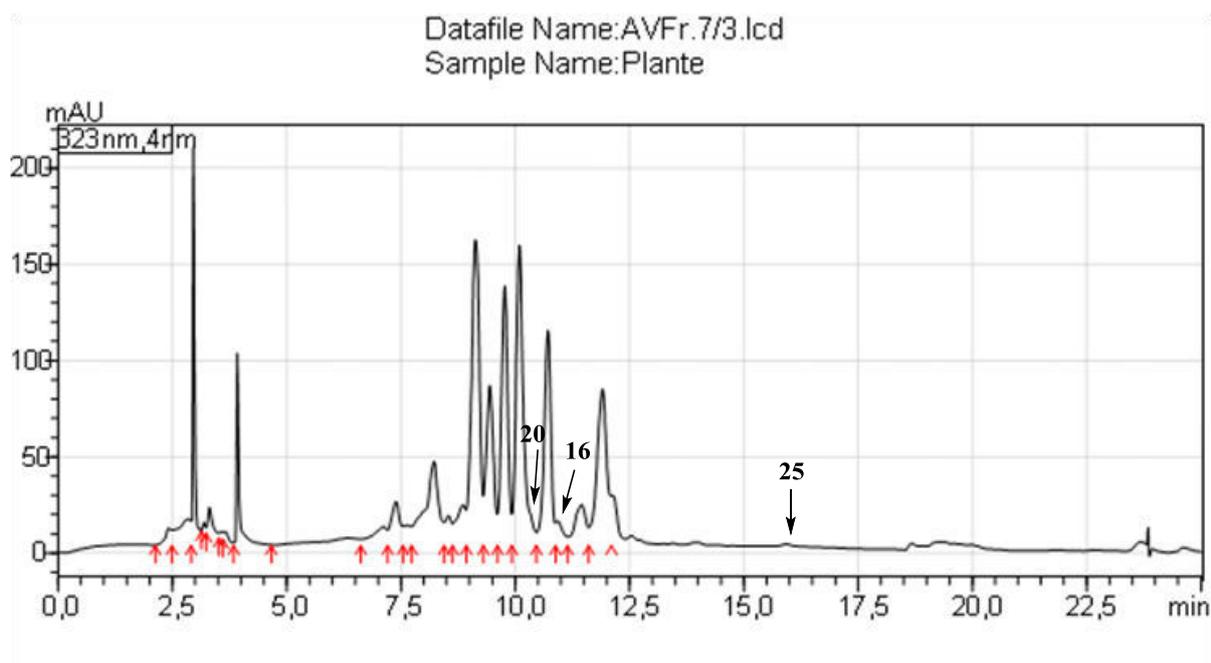
11 : épicatechine, 14 : quercitrine.

Figure 65 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait 7/3 des graines d'*Arisarum vulgare*.



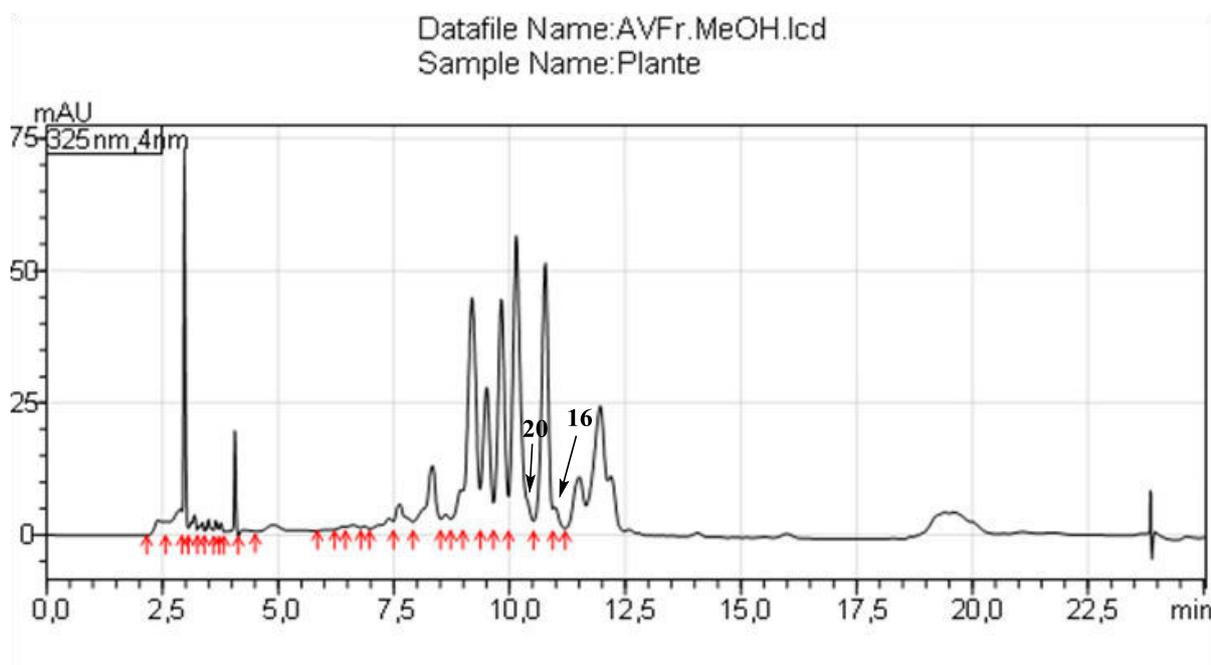
11 : épicatechine, 14 : quercitrine, 21 : xanthohumol.

Figure 66 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait MeOH des graines d'*Arisarum vulgare*.



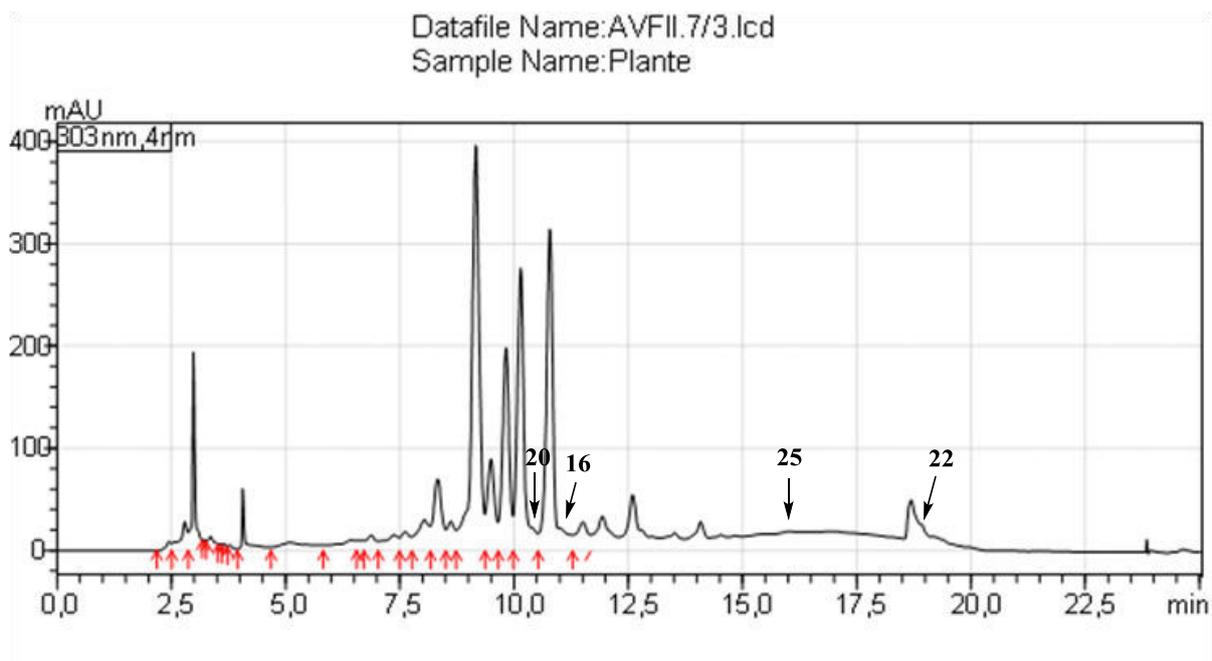
16 : lutéoline-7-glucoside, 20 : rutine, 25 : quercitine

Figure 67 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait 7/3 des fleurs d'*Arisarum vulgare*.



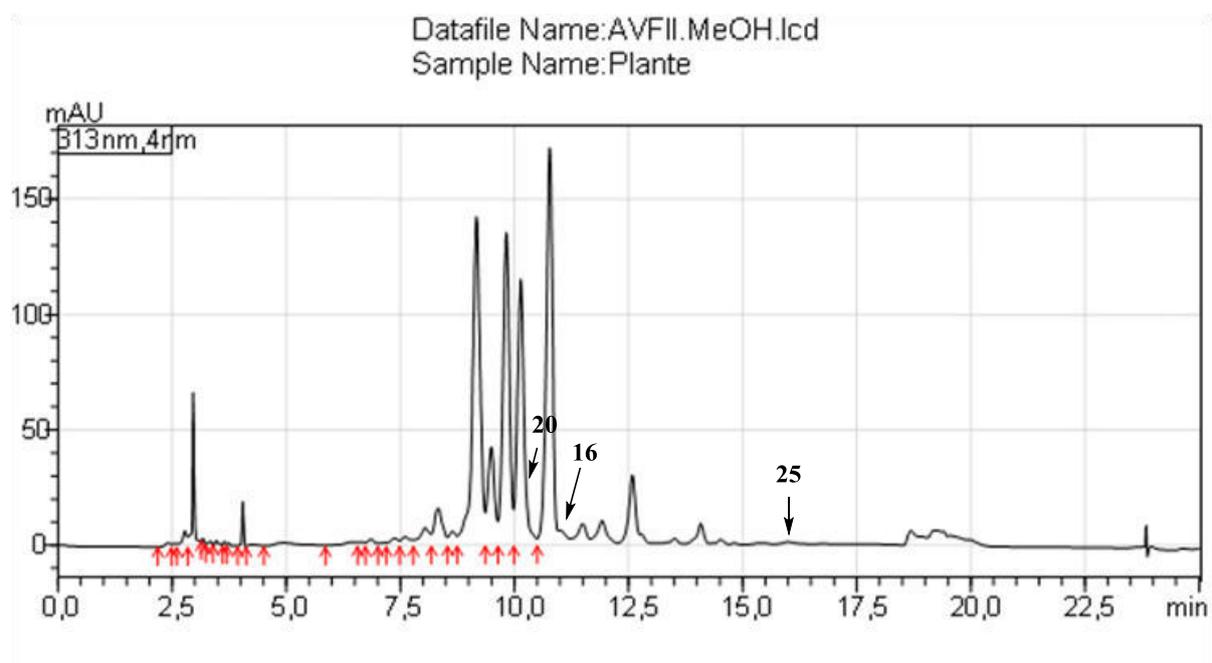
16 : lutéoline-7-glucoside, 20 : rutine

Figure 68 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait MeOH des fleurs d'*Arisarum vulgare*.



16 : lutéoline-7-glucoside, 20 : rutine, 22 : isoxanthohumol, 25 : quercitine

Figure 69 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait 7/3 des feuilles d'*Arisarum vulgare*.



16 : lutéoline-7-glucoside, 20 : rutine, 25 : quercétine

Figure 70 : Profil chromatographique (LCMS) de l'extrait MeOH des feuilles d'*Arisarum vulgare*.

Publication scientifique

PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS, ANTIOXIDANT ACTIVITY, TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENTS OF *ARISARUM VULGARE* SEEDS

Hadjer Kadri, Salah Eddine Djilani, Abdelouaheb Djilani✉

LSBO Department of Chemistry, Badji Mokhtar University
B.P. 12, Annaba, Algeria

ABSTRACT

Background. *Arisarum vulgare* is screened and its total phenolic compounds and total flavonoid contents were measured. In addition, the antioxidant capacity of the methanol-water (7:3) extract of this plant is evaluated by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)) tests expressed by Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC). HPLC analyses are carried out to identify some polyphenols. The aim of this study is to identify, to quantify the phenolic compounds contained in the seeds of *A. vulgare*, and to evaluate their antioxidant capacity.

Material and methods. Methanol-water (7:3) extract and three fraction obtained from silica gel column chromatography of *A. vulgare* were assayed by using RP-HPLC, spectrophotometric analyses, DPPH and ABTS tests.

Results. Results obtained in the present study, revealed that total phenolic and flavonoids of methanol-water extract of *A. vulgare* seeds were respectively 1.2 g GAE and 0.34 g QE per 100 g of plant extract dry weight. The total antioxidant capacity expressed as vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) per 100 g of plant extract, obtained by ABTS and DPPH tests were respectively 1.3 g and 0.99 g VCE per 100 g dry weight. On the other hand RP-HPLC analyses reveal that the main phenolic compounds identified in the methanol-water (7:3) extract are gallic acid, caffeic acid and rutin.

Conclusions. The results reveal that the methanol-water extract of *A. vulgare* seeds possesses strong antioxidative properties *in vitro*. Results confirmed by high polyphenols and flavonoids contents and corroborated by HPLC identifications.

Key words: medicinal plants, screening, extraction, ABTS, DPPH, RP-HPLC

INTRODUCTION

Interest in toxic plants is increasing because it is recognised that these plants contain bioactive compounds and then, have medicinal virtues. So, medicinal plants are of great importance to the health. Also, many papers have reported that the major pharmacological proprieties of medicinal plants are associated and attributed to their antioxidant activity, then; much

attention is being paid to antioxidant compounds [Gramza-Michałowska et al. 2008].

In this work, we targeted *Arisarum vulgare* plant growing in El-Kala National Park. This park is situated in the extreme North-East of Algeria (36°55'-36°90'N; 08°16'-08°43'E) is a specific site recognized for its floristic wealth, it presents a remarkable

✉ jilaniouaheb@yahoo.fr, djillani.abdelouheb@univ-annaba.org

originality [Djilani et al. 2007]. *Arisarum vulgare* is very toxic, but their tubers are eaten in times of scarcity after boiling in water. It is also known for its uses in traditional medicine to treat various diseases. For example and according to ethnobotanical investigations, it is observed that in some regions of Algeria, *A. vulgare* is used for the treatment of several diseases such as headaches, asthma, flu and it promotes healing of early wound skin lesions.

To our knowledge, there are still no phytochemical and biological studies or reports on *A. vulgare* seeds. The present study is aimed to identify, to quantify the phenolic compounds contained in the seeds of *A. vulgare*, and to evaluate their antioxidant capacity by DPPH and ABTS *in vitro* test. Identification of some flavonoids from different fractions of methanol-water extract seeds was carried out, using RP-HPLC.

MATERIAL AND METHODS

Plant materials

Plants are collected from the National Park of El Kala and they were identified by Dr. G. Debelair (Department of Biology, University of Badji Mokhtar-Annaba, Algeria). Seeds of *A. vulgare* were collected in October 2011. The seeds were air dried in shade at room temperature, ground on mill to obtain powder and stored in a glass flask to protect them from humidity and light.

Chemicals

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, aluminum chloride, gallic acid, rutin, protocatechic acid, epicatechic acid, para-coumaric acid, quercetin, chlorogenic acid, caffeic acid and vitamin C were purchased from Across Organics. Potassium persulphate, ammonium phosphate, sodium carbonate, sodium nitrite, hydrochloric acid, ammonium hydroxide, sodium hydroxide, acetonitrile, methanol, dichloroethane, ethyl acetate, phosphoric acid, ABTS and DPPH were obtained from Sigma and Roth (France). The chemicals used were of HPLC and analytical grade.

Apparatus. The RP-HPLC analyses were performed with a Waters 600E pump coupled to a Waters 486 UV visible tunable detector and equipped with a 20 μ L injection loop and an Alltech Intertsil ODS column (RP C₁₈ column size 4.6 mm \times 150 mm; particle size, 5 μ m).

Phytochemical screening

Preliminary tests for determination of major chemical groups were carried out according to the Harborne technique [Harborne 1984].

Extraction procedure

The dried powdered seeds were extracted three times (24 h for each time) with methanol/water (7:3). Then the green organic phase was filtered through Whatmann paper N^o1, concentrated under reduced pressure to dryness. The residue was dissolved in methanol and the solution was fractionated on silica gel column chromatography using dichloromethane-ethyl acetate-methanol gradient. Three major fractions obtained are (F1), (F2) and (F3).

DOSAGE OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

Determination of total phenols

Total phenolic contents were evaluated with Folin-Ciocalteu's phenol reagent [Amarowicz et al. 2008, Kim et al. 2003] using the spectrophotometric analyses (Cary 50 Scan UV-Visible apparatus). Briefly, an aliquot (1 ml) of standard solutions of gallic acid at different concentrations or appropriately diluted extract was added to a 25 ml volumetric flask containing 9 ml of ddH₂O. A reagent blank using ddH₂O was prepared. One milliliter of Folin-Ciocalteu's phenol reagent was added to the mixture and shaken. After 5 min, 10 ml of 7% Na₂CO₃ solution was added with mixing. The solution was then immediately diluted to volume (25 ml) with ddH₂O and mixed thoroughly. After incubation for 90 min at 23°C, the absorbance versus prepared blank was read at 750 nm. Total phenolic content was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g dry weight (dw). Samples were analysed in three replications.

Total flavonoid compounds

Total flavonoid content was measured according to a colorimetric assay [Zhishen et al. 1999]. A 1 ml aliquot of standard solutions of quercetin at different concentrations or appropriately diluted samples was added to a 10 ml volumetric flask containing 4 ml ddH₂O. At zero time, 0.3 ml 5% NaNO₂ was added to the flask. After 5 min, 0.3 ml 10% AlCl₃ was added.

At 6 min, 2 ml of 1 M NaOH was added to the mixture. Immediately, the solution was diluted to volume (10 ml) with ddH₂O and mixed thoroughly. Absorbance of the mixture, pink in colour, was determined at 510 nm versus the prepared blank. Total flavonoid content was expressed as mg quercetin equivalents (QE)/100 g dry weight (dw). Samples were analyzed in three replications.

Antioxidant activities

Two tests have been used to determine the total antioxidant capacity, the ABTS and the DPPH tests.

ABTS radical scavenging test

Total antioxidant activity was determined by scavenging blue-green ABTS radicals and was expressed as mg vitamin C equivalent (VCEAC)/100 g dry weight [Chun et al. 2003, Re et al. 1999]. ABTS radical cation (ABTS^{•+}) was generated according to the experiment using an improved method. It is produced by reacting of ABTS solution (7 mM in water) with 2.5 mM potassium persulfate (final concentration) for 16 h at ambient temperature in the dark (stock solution). Then the ABTS^{•+} stock solution was diluted with methanol to an absorbance of 0.7 ± 0.2 at 734 nm. A quantity of 1 mg of the extract was dissolved in 5 ml of 70% aqueous methanol. A quantity of 50 μ l of extract solution, was added to 2.0 ml of diluted ABTS^{•+} solution ($A = 0.7 \pm 0.2$). The decrease of absorbance was measured after 5 min of incubation at room temperature in the dark and plotted as function of concentration of antioxidants. All determinations were carried out in triplicate on each occasion and at each separate concentration of the standard. Methanol and L-ascorbic acid were used as negative and positive control, respectively. All radical stock solutions were prepared fresh daily.

DPPH radical scavenging activity

The antioxidant activity of plant extract was estimated using a slight modification of the DPPH radical scavenging protocol reported by [Chun et al. 2003]. Two and nine tenths ml of 100 mM DPPH solution in methanol was mixed with 0.1 ml of plant extract. The reaction mixture was incubated in the dark for 30 min and thereafter the optical density was monitored at 517 nm against the blank. Vitamin C equivalent antioxidant

capacity (VCEAC) was calculated by using ascorbic acid as a reference compound to prepare the standard curve and was expressed as mg/100 g of dry matter of VCEAC. For the control, 2.9 ml of DPPH solution in methanol (100 mM) was mixed with 0.1 ml of methanol. The radical solution was prepared daily.

Phenolic compounds extraction for RP-HPLC analysis. A sample of different fraction obtained by column chromatography was dissolved by ultrasound bath in minimum of methanol. The sample was centrifuged at $1536 \times g$ for 15 minutes at ambient temperature. The supernatant was taken into a 10 ml volumetric flask. All solutions were prepared daily and stored at 4°C.

Statistical analysis

All analyses were carried out in triplicates. The results of scavenger activity, total phenolic and total flavonoid contents were performed from the averages of all samples reading mean \pm standard deviation using Excel 2007 and STATISTICA software on student one Test. Observed differences were statistically considered significant at the level of $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical screening

The phytochemical screening of *Arisarum vulgare* seeds revealed the presence of flavonoids, tannins, lipids, anthocyanins, sterols and terpenes.

Determination of total phenolic, total flavonoids and total antioxidant capacity (VCEAC assay)

The results obtained in the present study and shown in Figure 1, revealed that total phenolic and flavonoids of methanol-water extract of *A. vulgare* seeds were respectively 1233.68 ± 51.54 mg GAE and 347.77 ± 33.14 mg QE per 100 g of plant extract dry weight. The total antioxidant capacity expressed as vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) per 100 g of plant extract, obtained by ABTS and DPPH tests were respectively 1300.8 ± 66.21 mg and 991.2 ± 55.45 mg VCE per 100 g dry weight. A correlation between recorded antioxidant activity and total phenolic compounds is found ($R^2 = 0.95$) but there is no correlation between total flavonoid compounds and antioxidant activity ($R^2 = 0.70$).

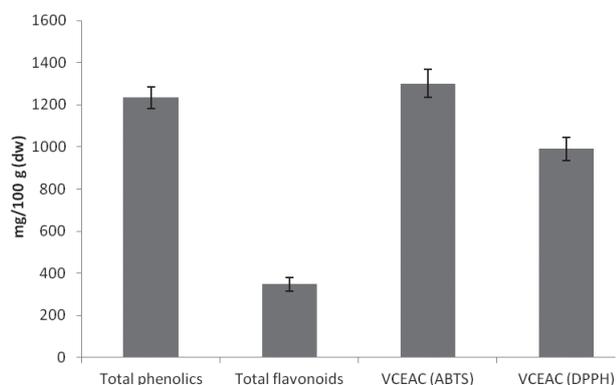


Fig. 1. Total phenol and flavonoid content in methanol-water (7:3) extract of *A. vulgare* (seeds) and quantification of antioxidant activity by VCEAC assay

RP-HPLC analysis

The samples (F1), (F2) and (F3) were filtered through a 0.45 μm PTFE syringe tip filter and were analysed using an RP-HPLC system equipped with a 20 μL injection loop, a waters UV-Visible tunable detector on a reverse phase (RP C_{18}) column Alltech Interstil ODS-5 $\mu\text{m} \times 4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$. The flow rate was set at 1 ml/minute at room temperature. To perform this study, a gradient of three mobile phases was used; solvent A: 50 mM ammonium phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) pH 2.6 (adjusted with phosphoric acid), solvent B: (80:20 (v/v)) acetonitrile/solvent A, and solvent C: 200 mM of phosphoric acid pH 1.5 (pH adjusted with ammonium hydroxide). The solvents were filtered through a Whatman paper N $^{\circ}$ 1 and placed in an ultrasonic

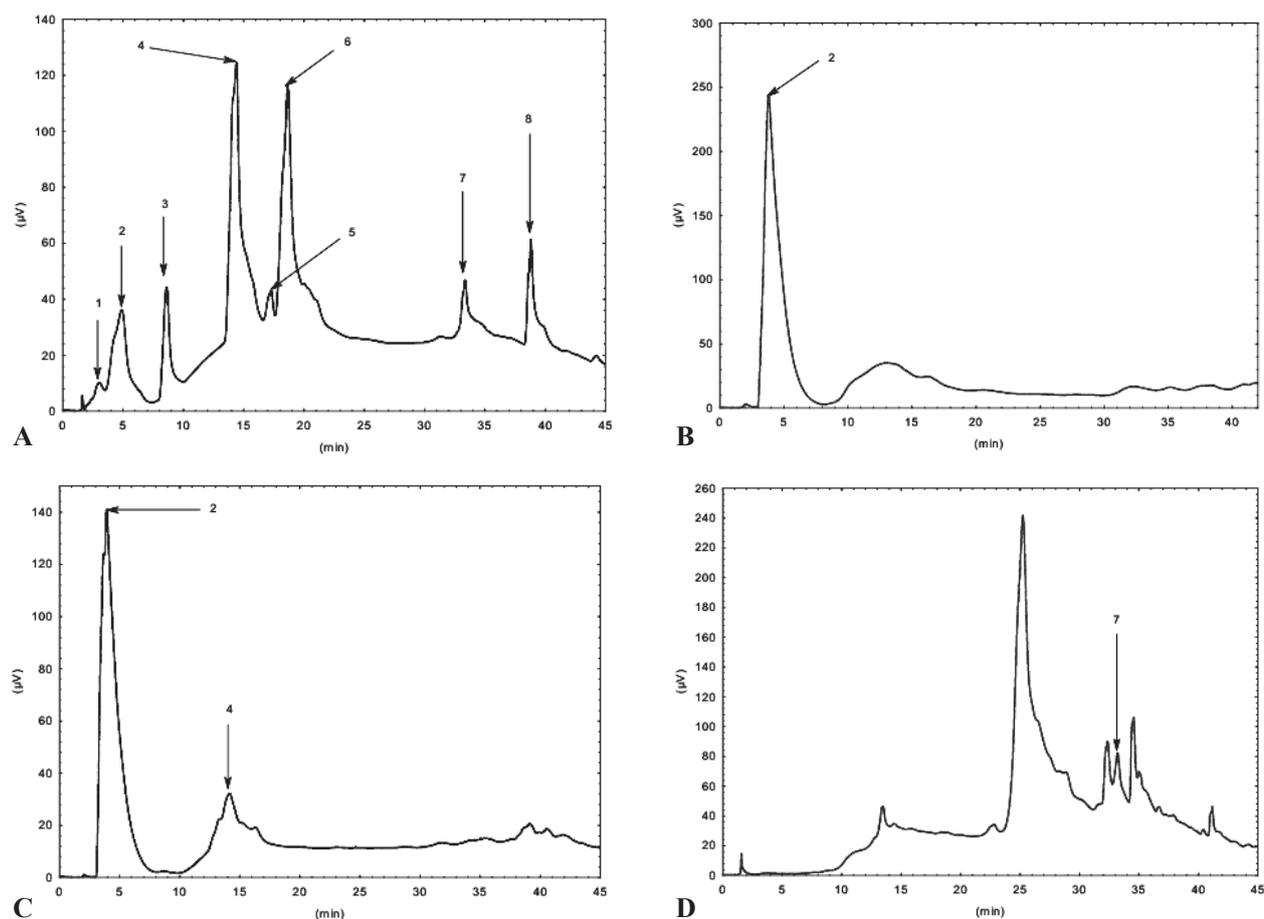


Fig. 2. **A.** HPLC chromatogram at 280 nm of polyphenols standards: 1 – chlorogenic acid, 2 – gallic acid, 3 – protocatechic acid, 4 – caffeic acid, 5 – epicatechic acid, 6 – para coumaric acid, 7 – rutin, 8 – quercitine. **B.** HPLC chromatogram at 280 nm of fraction F1. **C.** HPLC chromatogram at 280 nm of fraction F2. **D.** HPLC chromatogram at 280 nm of fraction F3

bath for 20 minutes. The gradient profile was linearly changed as follows (total 60 minutes): 100% solvent A at zero minutes, 92% A/8% B at 4 minutes, 14% B/86% C at 10 minutes, 16% B/84% C at 22.5 minutes, 25% B/75% C at 27.5 minutes, 80% B/20% C at 50 minutes, 100% solvent A at 55 minutes, and 100% A at 60 minutes. After each run, the system was re-conditioned for 10 minutes before analysis of the next sample. Under these conditions, each sample analysis was done in triplicate. Polyphenolic external standards were prepared by dissolving 2 mg/ml and used as reference. In each sample, polyphenol was identified by comparing its retention time with that of the corresponding external standard. Detection was done at 280 nm.

CONCLUSION

The results indicate that the methanol-water extract of *A. vulgare* seeds possesses strong antioxidative properties *in vitro*. They are confirmed by high polyphenols and flavonoids contents and corroborated by HPLC identifications. Moreover, HPLC analysis reveal the presence of gallic acid, caffeic acid and rutin in the different fractions and then corroborate the richness of *A. vulgare* seeds in polyphenols.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Professor A. Dicko from 'Université de Lorraine' (France) for his assistance in HPLC analyses.

Received – Przyjęto: 12.10.2012

For citation – Do cytowania

Kadri H., Djilani S.E., Djilani A., 2013. Phytochemical constituents, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of *Arisarum vulgare* seeds. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 12(2), 169-173.

REFERENCES

- Amarowicz R., Estrella I., Hernandez T., Troszynska A., 2008. Antioxidant activity of extract of Adzuki bean and its fractions. *J. Food Lipid.* 15, 119-136.
- Chun O.K., Kim D.O., Lee C.Y., 2003. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 51, 8067-8072.
- Djilani A., Bayoud B., Legseir B., Soulimani R., Dicko A., Younos C., 2007. Antibacterial activity of some toxic plants of Algerian flora growing in El-Kala National Park. In: *Recent progress in medicinal plants: natural products II*. Eds J.N. Govil, V.K. Singh, N. Siddiqui. Studium Press, LLC, USA, 18, 35-39.
- Gramza-Michałowska A., Abramowski Z., Jovel E., Heś M., 2008. Antioxidant potential of herbs extracts and impact on HEPG2 cells viability. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 7(4), 61-72.
- Harborne J.B., 1984. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis*. Chapman & Hall London.
- Kim D.-O., Chun O.K., Kim Y.J., Moon H.-Y., Lee C.Y., 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6509-6515.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pamala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radicalcation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 1231-1237.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555-559.

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 20.02.2013