

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de chimie

MEMOIRE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Chimie organique

Intitulé

**Contribution à l'étude phytochimique et biologique de
l'espèce *Antirrhinum majus***

Présenté par:

DARMOUNI Chaïma

SAADI Soumeya

Devant le jury composé de:

Mme. N. BENSEMMANE

Maitre-assistant B

Présidente

Mme. C. ESSEID

Maître de conférences B

Examinatrice

Mme. M. AISSAOUI

Maître de conférences B

Promotrice

Soutenu le 03/07/2023

REMERCIEMENT

Nous remercions notre bon Dieu qui nous a donné le courage et la volonte de poursuivre nos études, ainsi que nos parents, qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements et le plus grand respect à notre encadreur de mémoire Mme « **Meriem AISSAOUI** » pour sa compréhension, sa disponibilité, de savoir-faire, ses conseils judicieux, et toute l'aide qu'elle nous a rapporté. Merci de tout cœur.

Nous remercions profondément monsieur **Abderrahmane MEZRAG** pour sa disponibilité, son aide et ses précieux conseils pendant notre formation. Nous exprimons notre profonde gratitude à Monsieur **Adlan BENYAMINA** pour sa patience et son aide indispensable à la réalisation de ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme **Nachida BENSEMMANE**, Pour l'honneur qu'elle nous a fait d'accepter d'être présidente du jury.

Nous tenons également à remercier Mme **Chahrazed ESSEID**, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions tous les membres du laboratoire de Saad dahlab qui nous a accompagné tout le long de cette expérience professionnelle avec beaucoup de gentillesse et de patience.

A tous les membres d'équipe de laboratoire de microbiologie et d'hygiène de l'établissement public hospitalier de la Wilaya de Blida.

Nous tenons aussi à adresser un vif remerciement à tous les enseignants qui ont contribué à notre apprentissage durant ces cinq années d'étude.

Résumé

Ce travail se concentre sur l'étude phytochimique et biologique d'*Antirrhinum majus* L, une espèce appartenant à la famille des Plantaginacées. Notre objectif principal est de valoriser la flore algérienne en mettant en évidence les substances chimiques qui pourraient avoir des applications thérapeutiques potentielles. Dans le cadre de notre thèse, nos recherches comprennent les étapes suivantes:

- ✓ Screening phytochimique de la partie aérienne de cette espèce : Nous avons réalisé une analyse approfondie pour détecter la présence de différents métabolites secondaires. Les résultats ont révélé la présence de flavonoïdes, d'alcaloïdes, de saponines et de tanins catéchiqes.
 - ✓ Quantification des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins totaux : Nous avons utilisé des méthodes colorimétriques pour quantifier ces composés dans les extraits de chloroforme et d'éthanol. Les résultats du dosage indiquent que la teneur en polyphénols est supérieure à celle des flavonoïdes et des tanins. Nous observons que l'extrait éthanol affiche la teneur la plus élevée.
 - ✓ Activité antioxydante : Nous avons évalué l'activité antioxydante à l'aide de deux techniques différentes. Tout d'abord, nous avons utilisé la méthode du piégeage du radical libre DPPH. Ensuite, nous avons employé la méthode du blanchissement du β -carotène pour évaluer l'activité antioxydante des extraits. Cette étude a révélé que l'extrait éthanolique présente une capacité antioxydante avec des valeurs d'IC₅₀ significativement comparables à celles de l'acide ascorbique.
 - ✓ L'activité antimicrobienne a été déterminée sur cinq souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella aboney*, en utilisant la méthode de diffusion de disque. Les deux extraits ont démontré un effet notable uniquement sur *Staphylococcus aureus* et *Salmonella aboney*, mais aucun effet sur les autres microorganismes testés.
 - ✓ Quant à l'activité antifongique, elle a été évaluée en utilisant *Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans* ; cependant, aucune réponse ou effet n'a été observé pour ces champignons spécifiques.
- Ces différentes étapes nous ont permis de mieux comprendre la composition phytochimique de l'*Antirrhinum majus* L et d'évaluer ses activités biologiques potentielles.

Mots clés : *Antirrhinum majus* L, flavonoïdes, antioxydante. Polyphénols.

Abstract

This work focuses on the phytochemical and biological study of *Antirrhinum majus* L, a species belonging to the Plantaginaceae family. Our main objective is to valorize the Algerian flora by highlighting the chemical substances that could have potential therapeutic applications. In the scope of our thesis, our research includes the following steps:

- ✓ Phytochemical screening of the aerial part of this species: We conducted a comprehensive analysis to detect the presence of different secondary metabolites. The results revealed the presence of flavonoids, alkaloids, saponins, and catechic tannins.
- ✓ Quantification of total polyphenols, flavonoids, and tannins: We used colorimetric methods to quantify these compounds in chloroform and ethanol extracts. The assay results indicate that the content of polyphenols is higher than that of flavonoids and tannins. We observe that the ethanol extract displays the highest content.
- ✓ Antioxidant activity: We evaluated the antioxidant activity using two different techniques. Firstly, we used the DPPH free radical scavenging method. Then, we employed the β -carotene bleaching method to evaluate the antioxidant activity of the extracts. This study revealed that the ethanol extract exhibits antioxidant capacity with IC₅₀ values significantly comparable to that of ascorbic acid.
- ✓ Antimicrobial activity was determined against five bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella aboney*, using the disc diffusion method. Both extracts demonstrated a notable effect only against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella aboney*, but no effect on the other tested microorganisms.
- ✓ As for antifungal activity, it was evaluated using *Aspergillus brasiliensis* and *Candida albicans*; however, no response or effect was observed for these specific fungi.

These different steps allowed us to better understand the phytochemical composition of *Antirrhinum majus* L and evaluate its potential biological activities.

Keywords: *Antirrhinum majus* L, flavonoids, antioxidant, polyphenols.

ملخص

يتمحور هذا العمل حول الدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية لنبات *Antirrhinum majus L* ، وهو نوع ينتمي إلى عائلة نباتات الشفوية. هدفنا الرئيسي هو تسليط الضوء على الكيمياء النباتية للنباتات الجزائرية واستخلاص المركبات الكيميائية التي قد تكون لها تطبيقات علاجية محتملة. في إطار أطروحتنا، تشمل أبحاثنا المراحل التالية:

✓ الفحص الفيتوكيميائي للجزء الهوائي لهذا النوع: قمنا بإجراء تحليل مفصل لاكتشاف وجود مركبات ثانوية مختلفة. أظهرت النتائج وجود فلافونويدات وقلويدات وصابونين وتانينات كاتيكية.

✓ قياس محتوى البوليفينولات والفلافونويدات والتانينات الكلية: استخدمنا أساليب ملونة لقياس هذه المركبات في الاستخلاصات المذيبات الكلوروفورم والإيثانول. أظهرت نتائج القياس أن محتوى البوليفينولات أعلى من الفلافونويدات والتانينات. لاحظنا أن الاستخلاص الإيثانولي يعرض أعلى محتوى.

✓ النشاط المضاد للأكسدة: قمنا بتقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام تقنيتين مختلفتين. أولاً، استخدمنا طريقة اصطياد الجذور الحرة DPPH. ثم، استخدمنا طريقة إزالة البيتا-كاروتين لتقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات. أظهرت هذه الدراسة أن المستخلص الإيثانولي يمتلك قدرة مضادة للأكسدة بـ IC50 تقارب بشكل كبير قيم حمض الأسكوربيك.

✓ تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على خمسة سلالات بكتيرية، *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella aboney* باستخدام طريقة انتشار الأقراص. أظهرت كلا المستخلصات تأثيراً ملحوظاً فقط على ستافيلوكوكس أوربوس وسالمونيللا أبوني، ولكن لم يكن هناك أي تأثير على الكائنات المجهرية الأخرى التي تم اختبارها.

أما بالنسبة للنشاط المضاد للفطريات، فقد تم تقييمه باستخدام *Candida albicans* و *Aspergillus brasiliensis* ؛ ومع ذلك، لم يتم ملاحظة أي استجابة أو تأثير على هذه الفطريات المحددة.

من خلال هذه الخطوات المختلفة، تمكنا من فهم أفضل للتركيب الفيتوكيميائي لنبات الأنتيرينوم ماجوس وتقييم الأنشطة البيولوجية المحتملة له.

كلمات مفتاحية: *Antirrhinum majus L*، فلافونويدات، مضاد للأكسدة، بوليفينولات.

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure I.1	Distribution géographique des Plantaginaceae	3
Figure I.2	Le Grand Muflier – <i>Antirrhinum majus</i> L	5
Figure I.3	Structure des antioxydants synthétiques	17
Figure II.1	Les étapes d'extraction solide-liquide (Macération - Filtration - Evaporation).	19
Figure II.2	Schéma de protocole d'extraction solide-liquide	20
Figure II.3	Préparation des extraits	21
Figure II.4	Protocole de dosage des polyphénols totaux	24
Figure II.5	Courbe d'étalonnage d'acide gallique	25
Figure II.6	Courbe d'étalonnage de la quercétine	26
Figure II.7	Protocole de dosage des flavonoïdes totaux	26
Figure II.8	Courbe d'étalonnage de la Catéchine	27
Figure II.9	Protocole de dosage des Tanins	28
Figure II.10	Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire la méthode de DPPH	30
Figure II.11	Courbe d'inhibition % du DPPH en fonction de concentration d'acide ascorbique	30
Figure II.12	Protocole de l'évaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH	31
Figure II.13	Protocole de l'évaluation de l'activité antiradicalaire par le test de blanchissement du β -carotène	32
Figure II.14	Le spectromètre UV-VIS	33
Figure II.15	Préparation du milieu de culture	34
Figure II.16	Ensemencement des bactéries	35
Figure II.17	Dépôt des disques imprégnés par les extraits	35
Figure II.18	Disposition des disques des trois d'extrait Et le témoin (-) et positif (+) Dans la boîte	35
Figure II.19	Schéma de zone d'inhibition dans un test antibactérien	36
Figure II.20	Les étapes de l'activité antifongique	36
Figure III.1	Diagramme à barre représentatif des teneurs en polyphénols des extraits	42

Figure III. 2	Diagramme à barre représentatif des teneurs en flavonoïdes des extraits	43
Figure III.3	Diagramme à barre représentatif des teneurs en tanins dans les extraits.	44
Figure III.4	Taux des polyphénols, flavonoïdes et tanins dans les extraits.	45
Figure III. 5	Courbe d'inhibition % de DPPH en fonction de concentration d'extrait et acide ascorbique.	46
Figure III.6	Diagramme a barre représentatif des valeurs IC50 de l'extrait éthanolique et de référence	46
Figure III.7	Courbe d'absorbance de β -carotène en fonction du temps de l'extrait et la référence	47
Figure III.8	Diagramme à barre représentatif d'activité antioxydante % de l'extrait et de BHA du test β -carotène.	48
Figure III.9	Spectre UV de l'extrait chloroforme	48
Figure III.10	Spectre UV correspond l'extrait Ethanol	48
Figure III.11	Résultats des tests d'activité antibactérienne des extraits chloroformique et éthanolique	50
Figure III.12	Résultats des tests d'activité antifongique des extraits chloroformique et éthanolique	51

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau I.1	Classification botanique du <i>Antirrhinum majus</i>	5
Tableau I.2	Quelque métabolite secondaire isolé de l'espèce <i>Antirrhinum majus</i>	9
Tableau II.1	Rendement de l'extraction de l'espèce <i>Antirrhinum majus</i> L	37
Tableau III.1	Résultats des tests de caractérisation des déférents groupes chimiques.	38
Tableau III.2	Teneurs en polyphénols des extraits de l'espèce <i>Antirrhinum majus</i>	42
Tableau III. 3	Teneurs en flavonoïdes dans les extraits.	43
Tableau III.4	Teneures des tanins dans les extraits	43
Tableau III.5	Zones d'inhibition des extraits dans cinq souches bactériennes.	49
Tableau III.6	Zones d'inhibition des extraits dans deux champignons.	51

Liste des abréviations

µg : microgrammes

mg : milligrammes

ml : millilitres

mm : millimètres

nm : nanomètres

Min : minutes

UV : ultraviolet

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%.

A% : activité antioxydante%

Abs : Absorbance

AlCl₃ : Trichlorure d'Aluminium

BHA : butylhydroxyanisol

DPPH : diphenylpicrylhydrazyl

EAG : équivalent acide gallique

EQ : équivalent quercétine

RL : Radicaux Libres

DMSO : Diméthylsulfoxyde

MH : Mueller Hinton agar

ATCC: American type culture collection

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Recherche bibliographique	
I. Introduction	3
II. Etude de la plante	3
II.1. Famille de Plantaginacea	3
II.1.1. Présentation de la famille	3
II.2. Genre <i>Anthirrhinum</i>	3
II.2.1. Présentation du genre	3
II.2.2. Place dans la systématique	4
II.3. L'espèce <i>Anthirrhinum majus</i>	4
II.3.1. Description botanique	4
II.3.2. Classification taxonomique	5
II.3.3. Utilisations traditionnelles et médicinales	5
II.3.4. Quelques Activités biologiques de <i>l'Anthirrhinum majus</i>	6
II.3.4.1. Activité antioxydante	6
II.3.4.2. Activité antimicrobienne	6
II.3.4.3. Effet sur le système nerveux central et périphérique	7
II.3.4.4. Activité cytotoxique	7
II.3.4.5. Activité insecticide	8
II.3.4.6. Activité anti-inflammatoire et anti-diabétique	8
II.4. Principaux métabolites secondaires	9
III. Les activités biologiques	16
III.1. Généralités	16
III.2. L'Activité antioxydante	16
III.3. Activité antimicrobienne	18
IV. Conclusion	18
Références bibliographiques	

Chapitre II : Partie expérimentale

I. Introduction	19
II. Etude phytochimique	19
II.1. Récolte de matière Végétale	19
II.2. Macération	19
II.3. Screening phytochimique	20
II. 3.1. Préparation des échantillons	21
II.3.2. Tests de caractérisations	21
II.3.2.1. Test de de flavan 3, 4 diols (test bate-smith)	21
II.3.2.2. Test de flavonols et flavanones (test de Wilstater)	21
II.3.2.3. Test des tanins	22
II.3.2.4. Test des alcaloïdes	22
II.3.2.5. Test des quinones	22
II.3.2.6. Test des Anthraquinones	22
II.3.2.7. Test des coumarines	22
II.3.2.8. Test des saponines (indice de mousse)	23
III. Quantification des composés phénoliques	23
III.1. Dosage des polyphénols totaux	23
III.1.1. Principe	23
III.1.2. Procédure	23
III.2. Dosage des flavonoïdes totaux	25
III.2.1. Principe	25
III.2.2. Procédure	25
III.3. Dosage de tanins	27
III.3.1. Principe	27
IV. Evaluation de l'activité antioxydante	28
IV.1. La méthode de piégeage du radical libre DPPH	28
IV.1.1. Principe	28
IV.1.2. Préparation du DPPH	29
IV.2. Méthode de blanchissement du β -carotène	31
IV.2.1. Principe	31

V.3 Caractérisation des extraits	33
V.3.1. Analyse par UV-VIS	33
VI. Evaluation de l'activité antibactérienne	33
VI.1. Préparation des extraits	34
VI.2. Préparation de milieu de culture	34
VI.3. Préparation de la suspension bactérienne	34
VI.4. Ensemencement	34
VI.6. Lecture des résultats	35
VII. Evaluation de L'activité antifongique	36
IX. Conclusion	36
Références bibliographiques	

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Introduction	37
II. Etude phytochimique	37
II.1. Le rendement de macération	37
II.2. Screening phytochimique	37
III. Résultats de l'étude quantitative	41
III.1. Dosage des polyphénols	42
III.2. Dosage des flavonoïdes	42
III.3. Dosage des tanins	43
IV. Activités biologiques in vitro	45
IV. 1. Activité antioxydante	45
IV.1.1. Piégeage de radicale libre DPPH	45
IV.1.2. Test des blanchissements β -carotène	47
V. Caractérisation des extraits	48
V.1.Spectroscopie ultraviolet visible (UV-VIS)	48
VI. Evaluation de l'activité antimicrobienne	49
VI.1. Activité antibactérienne	49
VI.2. Activité antifongique	50
VII. Conclusion	51

Conclusion générale

52

Références bibliographiques

Introduction générale

Depuis de nombreux siècles et dans diverses civilisations, les plantes médicinales ont été utilisées comme remèdes pour traiter les maladies humaines. Elles renferment des composants naturels qui présentent un intérêt thérapeutique. Des études pharmacologiques ont mis en évidence les propriétés biologiques de plus de 1200 plantes utilisées dans la médecine traditionnelle à travers le monde, pour lutter contre différentes maladies [1,2].

Le stress oxydatif est considéré comme une cause majeure de nombreuses maladies. Il est causé par la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui peuvent devenir toxiques pour les principaux composants cellulaires tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques [3]. Ce phénomène peut entraîner un dysfonctionnement cellulaire et est impliqué dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives (comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson) ainsi que le processus de vieillissement [4].

Nous comprenons désormais que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent associés à des métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les alcaloïdes. Ces métabolites sont largement utilisés comme agents préventifs dans divers domaines, notamment anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiseptiques, diurétiques et inhibiteurs enzymatiques. Cependant, leur rôle principal réside dans leur capacité antioxydante, qui les rend efficaces pour lutter contre le stress oxydatif.

Les principes actifs des plantes médicinales constituent une véritable mine pour la recherche scientifique. Ils sont l'objet de nombreuses études visant à développer de nouveaux agents thérapeutiques potentiellement utiles, ainsi qu'à découvrir de nouveaux constituants naturels présentant des propriétés antioxydantes, anti-enzymatique). [5]

Dans ce contexte, nous avons sélectionné une plante médicinale spécifique, l'*Antirrhinum majus* L. Cette plante suscite un grand intérêt en raison de son importance économique, de sa richesse en composés bioactifs et de ses propriétés thérapeutiques.

L'*Antirrhinum majus* L. est étudiée en raison de son potentiel pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques et de ses applications dans la médecine traditionnelle et complémentaire.

Son utilisation répandue en Algérie met en évidence son importance culturelle et son rôle dans les pratiques de santé traditionnelles. Les recherches en cours visent à mieux comprendre les composés actifs présents dans l'*Antirrhinum majus* L et à explorer leurs activités pharmacologiques et leurs bénéfices potentiels pour la santé humaine.

Notre travail a été divisé en trois chapitres, le premier chapitre est consacré à des généralités bibliographiques sur la plante qui est nommée *Antirrhinum majus* L, avec leur composition chimique, leurs classifications botaniques et leur utilisation.

Le deuxième chapitre de l'étude se concentrera sur les travaux expérimentaux effectués sur *Antirrhinum majus* L. Il comprendra les étapes suivantes : screening phytochimique pour identifier les composés présents dans la plante, extraction, dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés, ainsi que l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante en utilisant deux méthodes spécifiques. De plus, l'activité antimicrobienne des extraits sera évaluée contre des souches bactériennes sélectionnées. Les observations et les résultats obtenus seront ensuite discutés dans le dernier chapitre de l'étude. Enfin, une conclusion sera présentée, résumant les principales découvertes et les implications de l'étude.

Références bibliographiques

- [1] Ould YK, Meddah B et Tir touil A. (2016). Proprieties of *Laurus nobilis* from Mascara (Algeria) . International Journal of Multidisciplinary and Current Research, Vol 4, p 2321-3124.
- [2] Kaurinovic B, Popovic M, Vlasisavljevic S. (2010). In vitro and in vivo effects of *Laurus nobilis* L. leaf extracts. Molecules, Vol.15, n° 5, p3378-3390.
- [3] Valko M, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M. et Mazur M. (2006). Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions, vol 160, n°1, p1–40.
- [4] Aruoma OI. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutation Research, p 9 -20.
- [5] Bourgaud F, gravot A, Milesi S, Gontier. (2001). Production of plant secondary metabolites : ahistorical perspective; 7, vol 161, p839-851.

CHAPITRE 1 : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Introduction :

L'Algérie bénéficie d'une diversité florale importante dans différentes zones géographiques telles que les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts plateaux, la steppe et les oasis sahariennes. Cette variété est due à sa situation géographique, son relief et la grande variété de climats et de sols présents sur son territoire. On recense plus de 3000 espèces végétales en Algérie, ce qui en fait une source précieuse de métabolites secondaires possédant des propriétés pharmacologiques intéressantes.

II. Etude de la plante

II.1. Famille de Plantaginacea

II.1.1. Présentation de la famille

Depuis l'Antiquité, la plante herbacée Plantaginaceae a été reconnue et proposée à l'étude grâce à ses avantages médicaux et diététiques. Basant sur nouvelles méthodes d'identification comme la microscopie électronique, cytologie, histologie...etc., la classification botanique APG III, sortie en 2009 [1], a transférée plusieurs genres de la famille Scrophulariaceae à la famille Plantaginaceae. Cette dernière comporte environ 220 genres et 4500 espèces [2]. Les plantes qui la composent se rencontrent abondamment dans les régions tempérées de l'hémisphère nord [3]. La famille des Plantaginacées, celle du plantain, représente des plantes florifères provenant de 90 genres à l'ordre des Lamiales, répartis en 1900 espèces différentes. Ce sont des arbustes et des herbes [4].



Figure I.1 : Distribution géographique des Plantaginaceae [5].

II.1.2. L'intérêt pharmacologique

II.2. Genre *Antirrhinum*

II.2.1. Présentation du genre

Plantaginaceae est une grande famille qui comporte environ 250 genres [6] dont l'un de ses genres les plus connus est *Antirrhinum*, le muflier commun. Le nom de ce genre, du grec "anti"(comme) et

"rhinon" (nez, museau, mufle), fait allusion à la forme des fleurs de ces plantes qui rappelle celle du museau d'un animal. D'ailleurs les anglo-saxons l'appellent "Snapdragon" que l'on pourrait traduire par "tête de dragon", évocation donnée quand on presse latéralement une fleur, ce qui fait ressortir comme une langue de dragon. Le genre *Antirrhinum* est connu également sous le nom de Muflier, et compte environ 120 espèces. Ce genre est largement distribué dans le bassin méditerranéen, en Asie occidentale et en Afrique du nord. Alors qu'en Algérie se trouve généralement dans le Tell [7].

II.2.2. Place dans la systématique

Le genre *Antirrhinum* était initialement répertorié sous la famille des Scrophulariaceae jusqu'en 1995, lorsqu'une étude [8] a décidé de reclasser ce genre sous la famille des Plantaginaceae [9].

II.3. L'espèce *Antirrhinum majus*

Antirrhinum majus est une plante vivace originaire de la Méditerranée, qui a été utilisée historiquement par Charles Darwin pour des études d'hérédité et de mutation en raison de sa facilité de culture, de son héritage diploïde et de sa variation dans la morphologie et les couleurs des fleurs. [10,11] *Antirrhinum majus* est répandu en Afrique (Algérie, Libye, Maroc et Tunisie); en Asie (Palestine, Liban, Syrie, Irak et Turquie) ; en Europe (Albanie, Croatie, Grèce, Italie, Malte, Serbie, France, Portugal et Espagne). Il est désormais largement cultivé dans les régions tempérées dans les jardins, avec de nombreuses variétés de couleurs et de formes [12,13].

II.3.1. Description botanique

Antirrhinum majus, ou Muflier commun, est une plante vivace annuelle et dressée. Les plantes atteignent généralement une hauteur de 2 à 3 pieds (0,6 à 0,9 m) en pots et dans le paysage. Certaines plantes peuvent atteindre une hauteur allant jusqu'à 6 pieds (1,8 m) si elles sont plantées dans le paysage. Les feuilles sont lancéolées à oblong-lancéolées, mesurant jusqu'à 3 pouces (7,6 cm) de long. Il existe de nombreux cultivars fantaisistes avec des noms latins, classés par taille et groupes de couleurs. Les mufliers sont largement utilisés dans les jardins et dans l'industrie des fleurs coupées. Ce sont des plantes faciles à cultiver, que ce soit en pot ou dans le jardin. Les fleurs sont portées en racèmes terminaux et fleurissent dans la plupart des régions de la fin du printemps à l'automne. Dans les régions plus chaudes, elles fleurissent au printemps et à nouveau en automne. Les fleurs individuelles mesurent de 1,5 à 2 pouces (3,8 à 5,1 cm) de long. Lorsqu'elles sont en fleurs, elles sont très spectaculaires [14,15].



Figure I.2 : Le Grand Muflier –*Antirrhinum majus* L [16].

II.3.2. Classification taxonomique

La classification phylogénétique de *Antirrhinum majus* est présentée dans le (Tableau I.1) [17].

Tableau I.1: Classification botanique du *Antirrhinum majus*

Règne	Plantae
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies
Clade	Astéridées
Clade	Lamiidées
Ordre	Lamiales
Famille	Plantaginaceae
Genre	<i>Antirrhinum</i>
Espèce	<i>Antirrhinum majus</i>

II.3.3. Utilisations traditionnelles et médicinales

Antirrhinum majus est utilisé comme plante ornementale dans les jardins pour une exposition en masse, dans des pots et en bordures [18]. Dans la culture et les traditions iraqiennes, la décoction de toute la plante est utilisée comme détergent, astringent, diurétique et pour traiter les affections du foie [19,20] Les feuilles et les fleurs d' *Antirrhinum majus* sont utilisées comme résolutive, stimulantes et anti-inflammatoires [20]. La décoction de toute la plante, y compris la racine, est utilisée pour résoudre l'épiphora (écoulement excessif de larmes) [21]. De plus, les graines d'*Antirrhinum majus*

sont une source riche en huile fixe utilisée comme alternative à l'huile d'olive dans la cuisine et l'alimentation, avec une abondance de lipides neutres, de glycolipides et de phospholipides [22].

Antirrhinum majus, a été utilisé comme modèle pour la génétique biochimique et développementale. Il est devenu un organisme modèle lors des premières études sur l'hérédité et les mutations en raison de son héritage diploïde, de sa facilité de culture et de sa variation dans la morphologie et la couleur des fleurs [23]. Cependant, à des fins médicales, il était traditionnellement utilisé comme diurétique, pour le traitement du scorbut, des troubles hépatiques, des tumeurs, ainsi que comme détergent et astringent. Les feuilles et les fleurs étaient utilisées comme antiphlogistiques, résolutive et stimulantes. Elles étaient également employées en cataplasmes sur les tumeurs et les ulcères. La plante était également utilisée dans le traitement de toutes sortes d'inflammations et d'hémorroïdes [24,25].

II.3.4. Quelques Activités biologiques de l'espèce *Antirrhinum majus*

II.3.4.1. Activité antioxydante

En 2011 l'équipe de Ramadan *et al* [26] ont réalisé des travaux sur l'activité de capture des radicaux libres (RSA) vis-à-vis le :1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) et des radicaux galvinoxyl d'huile d' *Antirrhinum. majus* était plus élevée que celle de l'huile d'olive extra vierge

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Antirrhinum majus* et de ses fractions (*n*-hexane, chloroforme, acetate d'éthyl et *n*-butanol) a été évaluée. La teneur totale en composés phénoliques, la IC₅₀ et le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique ont été évalués. L'activité antioxydante de l'extrait et des fractions a également été étudiée en utilisant de l'huile de tournesol comme substrat d'oxydation. Les valeurs d'indice de peroxyde (PV), d'acides gras libres (FFA), de diènes conjugués (Cd), de triènes conjugués (CT) et d'anisidine para-ont également été déterminées en stabilisant l'huile de tournesol comme substrat d'oxydation. De plus, il a été observé qu'il fournissait un effet protecteur contre les dommages oxydatifs induits par H₂O₂ dans l'ADN plasmidique pBR322, ce qui indique que la plante possède des propriétés antioxydantes. Par conséquent, les auteurs ont révélé que cette espèce peut être considérée comme une bonne source d'antioxydants naturels [27].

II.3.4.2. Activité antimicrobienne

Le test antimicrobien d'extrait méthanolique de cette plante à différentes concentrations a été évalué contre quatre types de bactéries *Pasturella multocida*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* et quatre types de champignons : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata* et *Rhodopes solani*.

Les résultats ont montré que lorsque la concentration de l'extrait augmentait, l'activité antimicrobienne augmentait également. Les échantillons végétaux ont présenté une activité

antimicrobienne considérable contre la plupart des souches bactériennes et fongiques. La méthode de diffusion sur disque mesurée dans la zone d'inhibition (ZI) a indiqué que l'extrait méthanolique présentait une activité inhibitrice significative à la concentration de 10 mg/mL contre les souches bactériennes telles que *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition de 33,60 mm), *Bacillus subtilis* (zone d'inhibition de 31,40 mm), *Pasturella multocida* (zone d'inhibition de 29,40 mm), *Escherichia coli* (zone d'inhibition de 30,50 mm) et contre les souches fongiques telles que *Rhodopes solani* (zone d'inhibition de 31,10 mm), *Aspergillus niger* (zone d'inhibition de 30,30 mm), *Alternaria alternata* (zone d'inhibition de 27,20 mm) et *Aspergillus flavus* (zone d'inhibition de 25,30 mm). L'extrait de *n*-hexane (extraite par Soxhlet) a montré une activité moindre contre toutes les souches bactériennes et fongiques testées. La fraction de *n*-butanol n'a pas pu inhiber la croissance d'*E. coli*. L'extrait chloroforme n'a pas non plus pu inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Alternaria alternata* et *Aspergillus niger*. La fraction d'acétate d'éthyle a montré une activité significative par rapport aux autres fractions [27].

II.3.4.3. Effet sur le système nerveux central et périphérique :

Les auronos appartiennent à la famille des flavonoïdes, des isomères structuraux des flavones, et ont été synthétisés dans *Antirrhinum majus* [28,29]. Ils ont été nommés benzylidènebenzofuran-3(2H)-ones. Les auronos et les extraits les contenant étaient utiles dans le traitement prophylactique et/ou thérapeutique d'un animal (y compris un être humain) atteint d'une maladie ou d'une affection dépendante de la phosphodiesterase (PDE) du système nerveux central. Parmi les maladies et affections du système nerveux à traiter de manière prophylactique ou thérapeutique, on trouve les troubles neurodégénératifs tels que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la démence liée à l'âge ou la démence en général, les traumatismes neurologiques incluant les traumatismes cérébraux ou du système nerveux central, la dépression, l'anxiété, la psychose, les dysfonctionnements cognitifs, les troubles mentaux, les troubles de l'apprentissage et de la mémoire, et l'ischémie du système nerveux central et/ou périphérique [30].

II.3.4.4. Activité cytotoxique

L'effet cytotoxique de l'extrait méthanolique absolu et de ses fractions (*n*-hexane, chloroforme, acétate d'éthyl et *n*-butanol) a été étudié par l'activité hémolytique contre les globules rouges humains (GR) en utilisant le Triton X-100 comme témoin positif (99,78). Le pourcentage de lyse a été évalué en comparant l'absorbance de l'échantillon avec celle du Triton X-100 en tant que témoin positif. Le pourcentage de lyse des globules rouges a été observé après traitement avec l'extrait méthanolique absolu de la Snapdragon et ses fractions, comme suit : extrait méthanolique absolu ($4,89 \pm 0,04$), *n*-butanol ($4,14 \pm 0,05$), chloroforme ($3,18 \pm 0,02$), acétate d'éthyle ($2,23 \pm 0,03$) et extrait *n*-hexane

(extrait par soxhlet) ($2,45 \pm 0,02$). L'étude a montré que le pourcentage de lyse des érythrocytes humains était inférieur à 5,0 % pour tous les échantillons, ce qui indique une cytotoxicité mineure de la plante [27].

II.3.4.5. Activité insecticide :

L'antirrhinoside est un iridoïde glucoside présent dans toute la plante *Antirrhinum majus* L. Son rôle en tant qu'allochimique potentiel a été étudié en relation avec l'herbivorie. Des tests d'alimentation ont été effectués sur deux herbivores généralistes, *Lymantria dispar* L. (chenille arpeuteuse) et *Trichoplusia ni* Hübner (Chenille défoliatrice), en utilisant des feuilles de *Antirrhinum majus* et un régime artificiel. Les chenilles arpeuteuses ont refusé de consommer les feuilles de *Antirrhinum majus*, tandis que les chenilles défoliatrices s'en sont nourries facilement. L'antirrhinoside n'a pas été détecté dans le corps ni les excréments des chenilles défoliatrices. Un autre iridoïde, l'antirrhidé, présent dans les feuilles de *Antirrhinum majus*, a été retrouvé dans les excréments des deux types de chenilles. Les essais d'alimentation avec des extraits de méthanol, des fractions d'iridoïdes et de l'antirrhinoside pur n'ont pas inhibé la croissance des chenilles, mais ont stimulé la croissance des chenilles défoliatrices à faibles concentrations. Cependant, à une concentration plus élevée d'antirrhinoside, la croissance des chenilles arpeuteuses a été réduite, tandis que celle des chenilles défoliatrices a augmenté. En résumé, l'antirrhinoside semble avoir un rôle de défense contre l'herbivorie pour certains insectes, mais peut stimuler la croissance d'autres insectes à faibles concentrations [31].

II.3.4.6. Activité anti-inflammatoire et anti-diabétique

L'équipe de Mi Jang [32] a examiné les effets de l'extrait de *Antirrhinum majus* L sur un modèle de rat obèse induit par un régime riche en graisses. Les résultats ont montré que l'extrait d' *Antirrhinum majus* L avait des effets positifs sur l'amélioration du métabolisme lipidique, la régulation de la glycémie et l'effet anti-inflammatoire. Il a réduit le poids du foie et de la graisse abdominale, ainsi que les niveaux de triglycérides sériques et de cholestérol. De plus, il a amélioré la régulation de la glycémie en réduisant les niveaux de glucose sanguin et en montrant des effets de régulation même en présence d'apport artificiel de glucose et d'insuline. En outre, il a réduit les marqueurs inflammatoires dans le sang et inhibé l'expression de protéines inflammatoires dans les cellules tissulaires. Ces résultats suggèrent que l'extrait de *Antirrhinum majus* L peut être bénéfique pour traiter les problèmes liés à l'obésité tels que l'hyperlipidémie, l'hyperglycémie et l'inflammation.

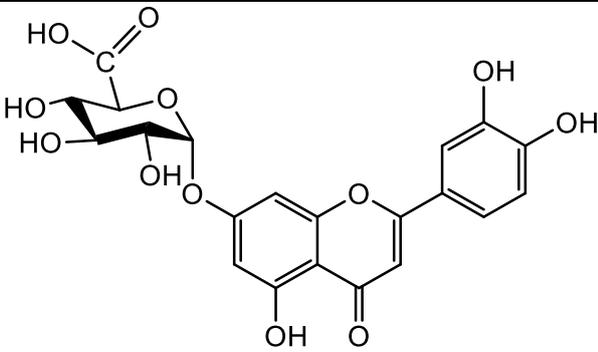
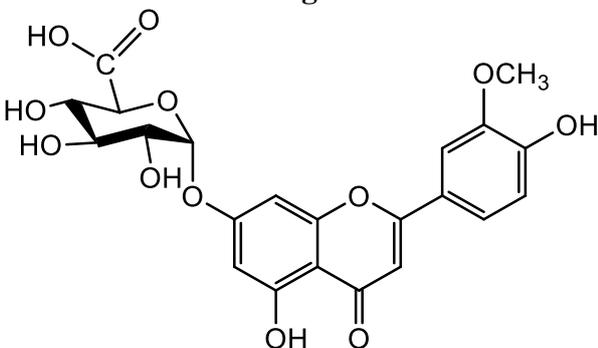
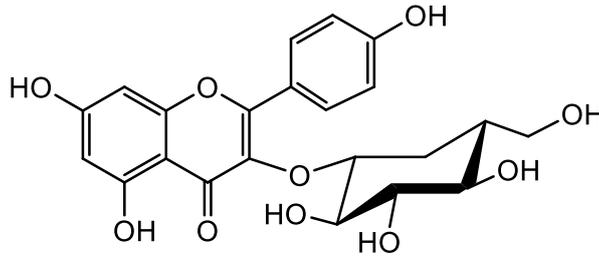
II.4. Principaux métabolites secondaires

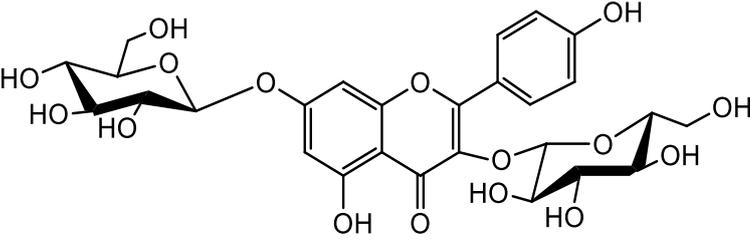
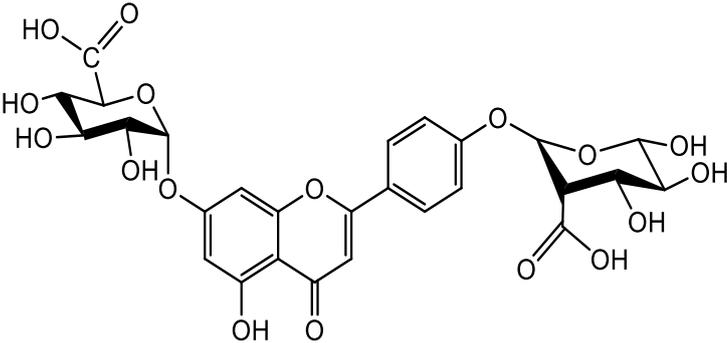
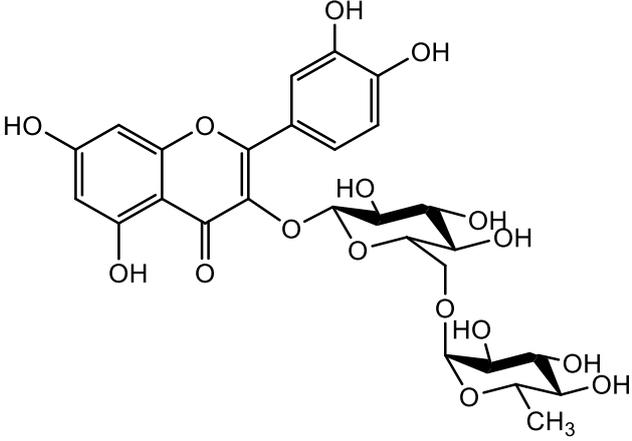
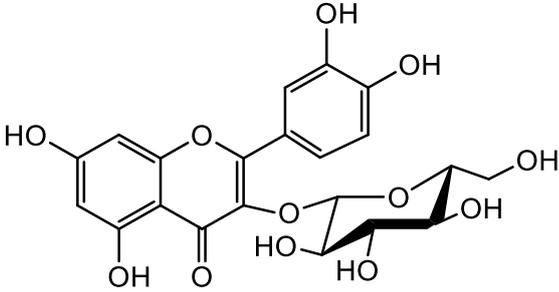
Le genre *Antirrhinum* est réputé pour produire des iridoïdes parmi ses métabolites secondaires., produit également divers métabolites secondaires, dont les flavonoïdes, les benzoxazinones et les terpènes. Les flavonoïdes sont responsables des couleurs vives des fleurs, tandis que les iridoïdes sont

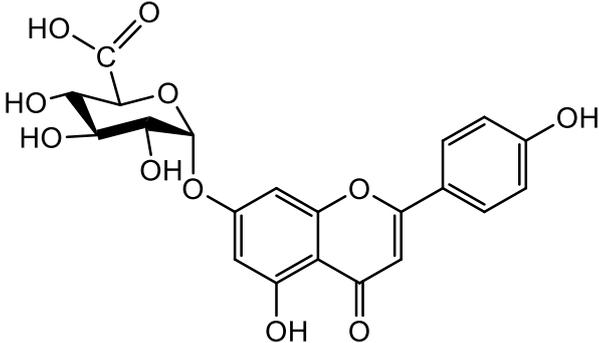
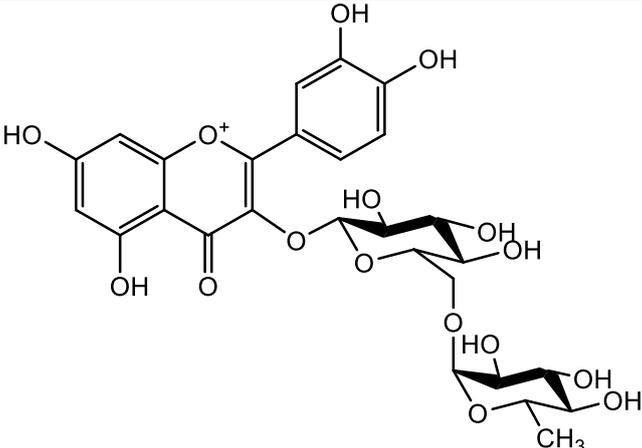
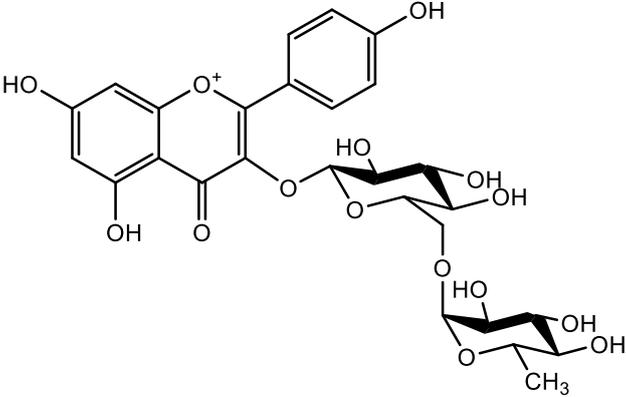
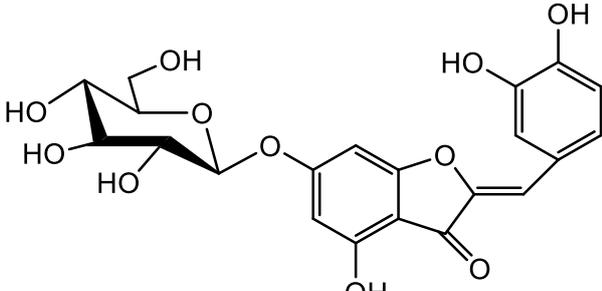
connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes. Les benzoxazinones agissent comme des métabolites défensifs, offrant une protection contre les herbivores et les agents pathogènes. Les terpènes, tels que les monoterpènes et les sesquiterpènes, sont responsables des arômes et des parfums caractéristiques des fleurs du genre *Antirrhinum*.

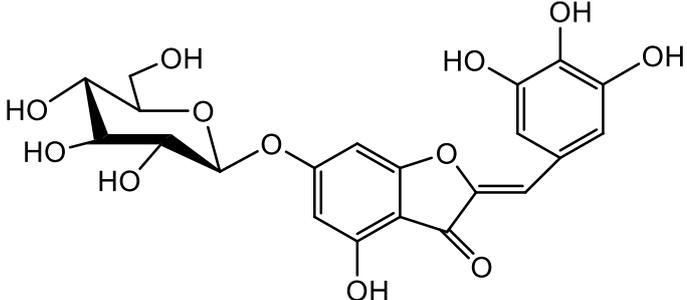
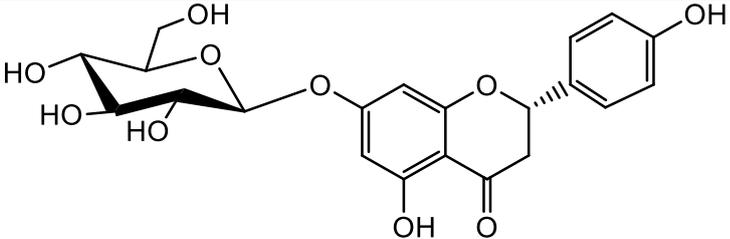
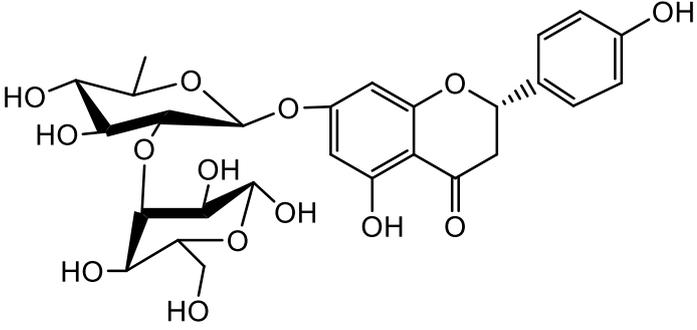
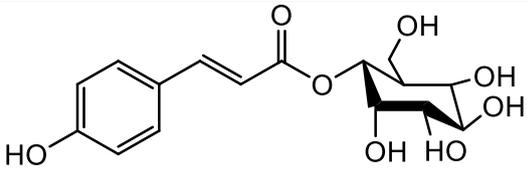
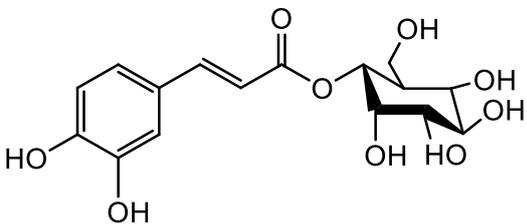
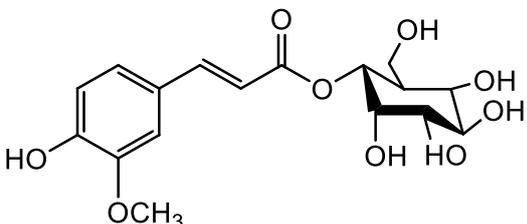
La recherche bibliographique exhaustive réalisée sur l'espèce *Antirrhinum majus* montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Celles-ci ont permis d'isoler et identifier un grand nombre de métabolites secondaires. Les plus rencontrés sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau I.2) :

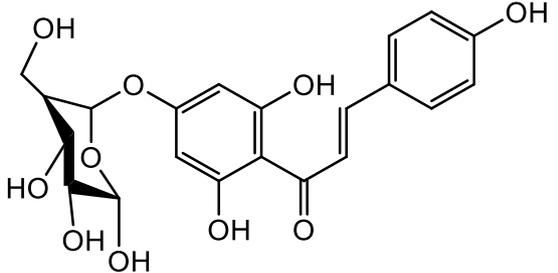
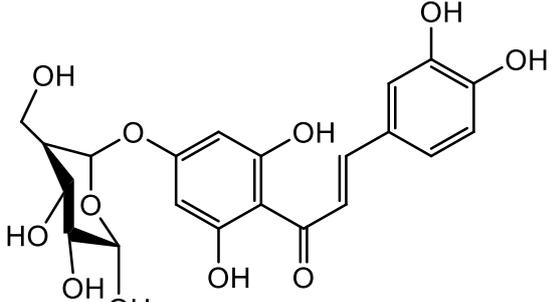
Tableau I.2: Quelques métabolites secondaires isolés de l'espèce *Antirrhinum majus*

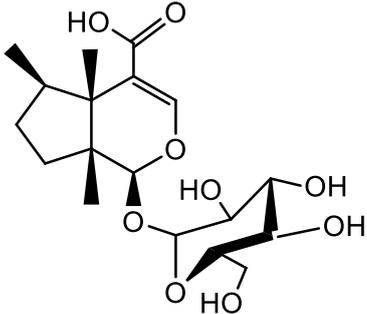
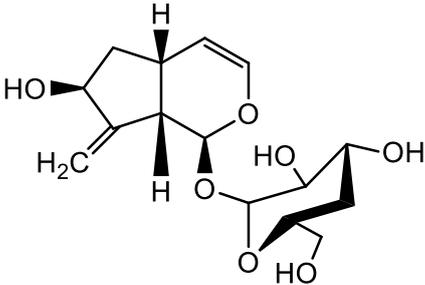
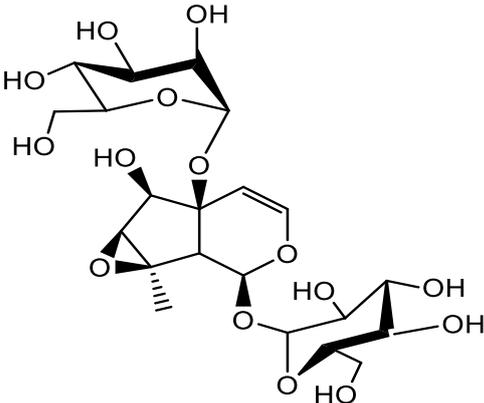
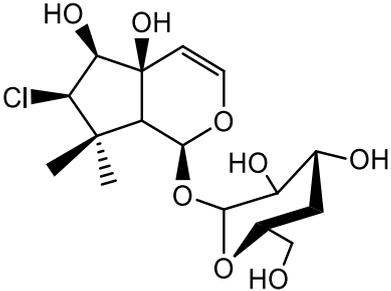
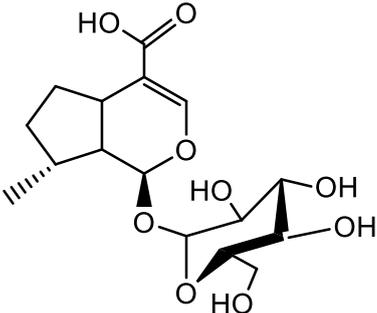
Composé isolé	Référence
<div style="text-align: center;">  <p>Luteoline 7-glucuronide</p>  <p>Chrysoeriol 7-glucuronide</p>  <p>Kampferol 3-glucoside</p> </div>	<p>[33]</p>

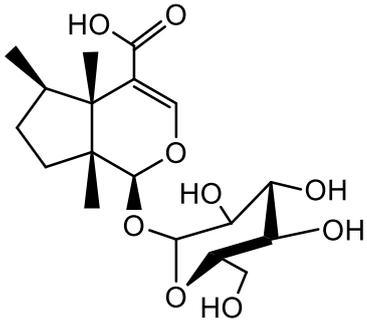
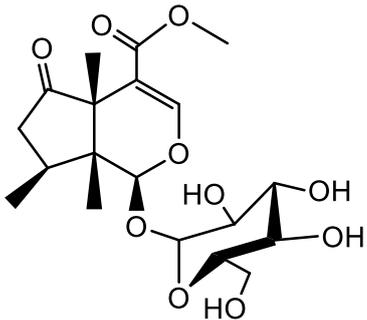
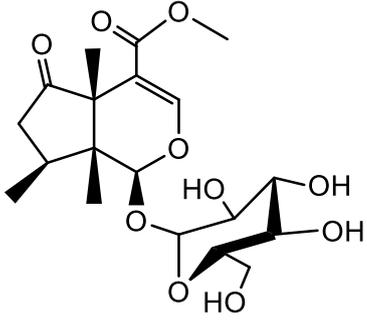
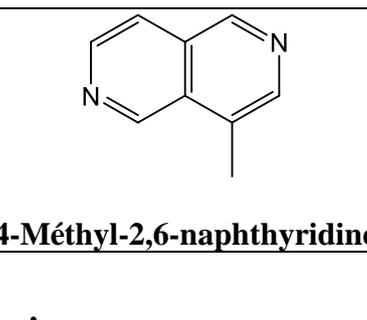
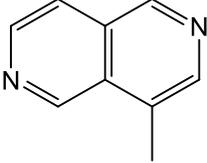
	
<p style="text-align: center;">kaempferol 3,7diglucoside</p>  <p style="text-align: center;">Apigénine 7,4'diglucuronide</p>  <p style="text-align: center;">Qercétine 3-rutinoside</p>	<p>[34]</p>
<p style="text-align: center;">Qercétine 3-glucoside</p> 	<p>[35]</p>

 <p>The structure shows a flavone core (apigenin) with a glucuronic acid moiety attached to the 7-position of the A-ring. The glucuronic acid is in its cyclic form, with a carboxylic acid group at the C6 position and hydroxyl groups at C2, C3, and C4. The apigenin core has hydroxyl groups at the 5 and 7 positions of the A-ring and at the 4 and 7 positions of the C-ring.</p> <p>Apigénine 7-glucuronide</p>	<p>[36]</p>
 <p>The structure shows a cyanidin cation core with a rutinoside moiety attached to the 3-position of the C-ring. The rutinoside consists of a glucose molecule linked to a rhamnose molecule. The glucose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6. The rhamnose has a methyl group at C5 and hydroxyl groups at C2, C3, and C4. The cyanidin core has hydroxyl groups at the 5 and 7 positions of the A-ring and at the 2, 3, and 4 positions of the C-ring.</p> <p>Cyanidine 3-rutinoside</p>	<p>[37]</p>
 <p>The structure shows a pelargonidin cation core with a rutinoside moiety attached to the 3-position of the C-ring. The rutinoside is identical to the one in the previous structure. The pelargonidin core has hydroxyl groups at the 5 and 7 positions of the A-ring and at the 2 and 4 positions of the C-ring.</p> <p>Pelargonidine 3-rutinoside</p>	<p>[38]</p>
 <p>The structure shows an aureusidin core with a glucose moiety attached to the 3-position of the C-ring. The glucose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6. The aureusidin core has hydroxyl groups at the 5 and 7 positions of the A-ring and at the 2 and 4 positions of the C-ring.</p> <p>Aureusidine 3-glucoside</p>	<p>[33]</p>

 <p>Bracteatine 6-O-β-glucoside</p>	
 <p>Naringénine 7-glucoside</p>  <p>Naringénine 7-Rhamnosylglucoside</p>	<p>[36]</p>
 <p>p-Coumaroyl-β-D-glucopyranoside</p>  <p>Caffeoyl β-D-glucopyranoside</p> 	<p>[39]</p>

<p>Feruloyl -β-D-glucopyranoside</p>	
 <p>The structure shows a glucose molecule in its cyclic β-D-glucopyranoside form, attached at the C1 position to the 3-position of a ferulic acid moiety. The ferulic acid moiety consists of a central benzene ring with a hydroxyl group at the 4-position and a propenoic acid side chain at the 1-position. The side chain is further substituted with a 4-hydroxyphenyl group at the 3-position.</p>	<p>[40]</p>
<p>Chalcononaringenine 4'-glucoside</p>	
 <p>The structure shows a glucose molecule in its cyclic β-D-glucopyranoside form, attached at the C1 position to the 4'-position of a chalcononaringenin moiety. The chalcononaringenin moiety consists of a central benzene ring with hydroxyl groups at the 2 and 6 positions and a propenoic acid side chain at the 1 position. The side chain is further substituted with a 3,4-dihydroxyphenyl group at the 3' position.</p>	
<p>3,4,2',6'-pentahydroxychalcone 4'-glucoside</p>	

 <p>Antirrhinoside</p>  <p>Antirrhide</p>  <p>5-glucosyl-antirrhinoside</p>  <p>Linarioside</p>	<p>[41]</p>
	<p>[42]</p>

<p>Acide 8-epi-deoxyloganique</p>  <p>Acide deoxygeniposidique</p>  <p>Antirrhinoside</p>  <p>Cornine</p> 	
 <p>4-Méthyl-2,6-naphthyridine</p>	[43]

III. Les activités biologiques

III.1. Généralités

Les activités biologiques des plantes médicinales sont connues depuis la préhistoire. Cependant, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques débutent à s'y intéresser, ces propriétés sont dues absolument aux métabolites secondaires (composés phénoliques) contenues dans les plantes [44].

Plusieurs études et travaux ont montré que les composés phénoliques jouent un rôle important dans la santé humaine en raison de leurs activités pharmaco-logiques diverses comme antivirales, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antiallergiques, antimicrobiennes, cardioprotectives et vasodilatoires [45].

Ces Actions sont attribuées majoritairement à leur effet antioxydant, où ils peuvent agir par différents mécanismes d'action, tels que le piégeage des radicaux libres, la trempe de l'oxygène singulier, la chélation des métaux de transition et l'inhibition des enzymes oxydatives [46].

❖ **Les polyphénols:** sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes pendant leur développement .Elle est utilisée comme réponse aux conditions de stress tels que ; infections, blessures, radiation UV [47,48].

Ils sont classés en plusieurs groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques de leurs structures et les substituants qui les relie : les flavonoïdes, acides phénoliques, tannins, saponines, stilbènes, lignanes [49].

Il constituant une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes.

Certaines propriétés antioxydantes de ces composés proviennent de leur capacité à perdre un proton, à chélater les métaux et à dismuter les radicaux libres [50].

❖ **Les flavonoïdes** sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Ils regroupent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [51,52].

Ils sont répartis en différentes catégories dont les plus importantes sont les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavanones, et les anthocyanes [53].

Les propriétés antioxydants sont attribuées aux flavonoïdes par les groupes hydroxyles phénoliques attachés aux structures cyclique et ils peuvent agir comme agents réducteurs, donateurs d'hydrogène, piègeurs des radicaux superoxydes et même comme chélateurs de métaux, Ils activent également les enzymes antioxydants, réduisent les radicaux libres et inhibent les oxydases [54].

III.2. L'Activité antioxydante

Les antioxydants sont des agents réducteurs bioactifs qui peuvent prévenir les dommages causés par les espèces réactives oxygénées (ROS), y compris les radicaux anioniques superoxydes, l'hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singlet, retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines, les DNA et les carbohydrates. Ils sont donc protecteurs contre diverses maladies chroniques, dont le cancer, les maladies coronariennes, les maladies cardiaques, les maladies auto-immunes, le diabète, la sclérose, athérosclérose et inflammation chronique [55].

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A),

l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), la quercétine, la rutine et le picnogénol [56].

Les antioxydants de synthèse les plus connus sont les composés phénoliques tels que Hydroxyanisole butylé (BHA), Hydroxytoluène butylé (BHT), tert-butylhydroquinone (THBQ) et Gallate de propyle (GP) (**Figure.I.3**), [57,58].

La plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet) [56,59,60,61].

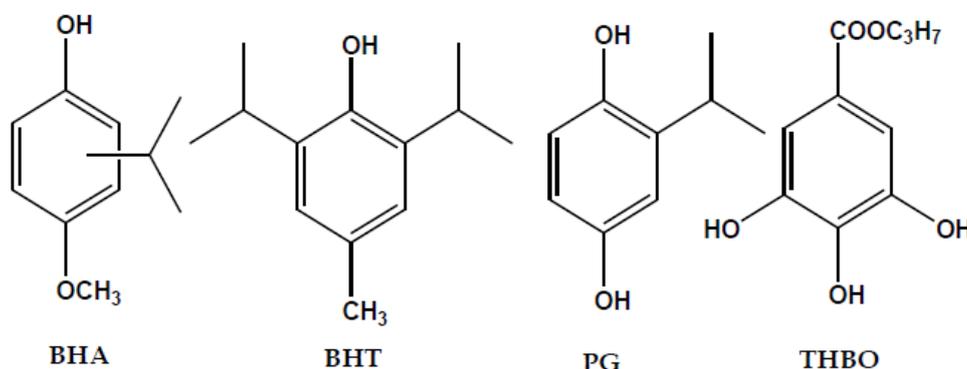


Figure I.3. Structure des antioxydants synthétiques

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée *in vivo* ou *in vitro* sur le vivant organisme, à l'aide de tests qui imitent les phénomènes physiologiques, pour évaluer l'activité antioxydante dans l'extrait naturel, différentes méthodes ont été développées, ces méthodes impliquent des mélanges d'espèces oxydantes, telles que les radicaux ou les complexes métalliques oxydés avec un échantillon qui contient antioxydants qui peuvent inhiber la genèse des radicaux. Ces antioxydants peuvent procéder selon deux mécanismes majeurs soit par transfert d'atomes d'hydrogène soit par transfert d'électrons [62].

Ces techniques sont différentes les unes des autres par les réactifs utilisés, les conditions d'application, leurs protocoles ainsi le mécanisme d'action par lequel l'extrait ou la molécule testée se manifeste dans le milieu [63]. Les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), α -tocophérol (vitamine E) et les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène)

III.3. Activité antimicrobienne

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'Antiquité, mais ce n'est qu'au début du 20^{ème} siècle que les scientifiques ont commencé à s'y intéresser de manière approfondie. De nombreuses plantes aromatiques, épices et autres plantes

possèdent des propriétés biologiques importantes qui ont des applications dans divers domaines tels que la médecine, la pharmacie, la cosmétologie et l'agriculture [64].

Plusieurs constituants présents dans les plantes sont responsables de ces propriétés antimicrobiennes, notamment les phénols, les terpénoïdes, les alcaloïdes, etc.

Le mécanisme d'action de ces composés implique différents processus, tels que la désorganisation de la membrane plasmique des micro-organismes, la formation de complexes avec la paroi cellulaire, l'inhibition des enzymes essentielles à leur survie, l'interaction avec l'ADN, etc. Ces actions peuvent entraîner la mort des micro-organismes ciblés ou inhiber leur croissance et leur reproduction [65].

Il convient de noter que les études scientifiques dans ce domaine sont en constante évolution, et de nouvelles recherches sont menées pour mieux comprendre les mécanismes d'action des composés antimicrobiens des plantes et pour explorer leurs applications potentielles dans divers domaines.

III.4. Activité anticorrosion

La corrosion se réfère à la détérioration des métaux due à une réaction chimique avec leur environnement. C'est un problème persistant et difficile à éliminer complètement. Elle affecte de nombreux secteurs industriels et peut engendrer des coûts considérables chaque année [66]. Par exemple, dans les procédés industriels, les métaux sont souvent exposés à des acides qui agissent comme agents corrosifs. Ces acides sont largement utilisés dans des industries telles que le raffinage du pétrole, le nettoyage industriel et les procédés pétrochimiques [67,68]. L'acide chlorhydrique est l'un des agents les plus couramment utilisés dans l'industrie, et il peut causer la dégradation des métaux par des réactions chimiques ou électrochimiques. Différentes méthodes sont disponibles pour protéger les métaux de la corrosion dans ces milieux, comme l'utilisation de barrières de protection, la galvanisation, la protection cathodique, l'utilisation d'antirouille ou d'inhibiteurs de corrosion.

Les inhibiteurs de corrosion sont des substances ajoutées à faibles concentrations dans des environnements corrosifs pour réduire ou empêcher la réaction du métal avec son environnement. Ils peuvent fonctionner en s'adsorbant à la surface métallique, ce qui réduit la vitesse de corrosion en augmentant la cinétique des réactions anodiques et/ou cathodiques, en réduisant la diffusion des réactifs à la surface des métaux et en diminuant la résistance électrique de la surface métallique. Il existe de nombreux composés synthétiques efficaces en tant qu'inhibiteurs de corrosion, mais beaucoup d'entre eux sont toxiques pour les humains et l'environnement [69]. C'est pourquoi les huiles et extraits de plantes sont de plus en plus considérés comme des sources d'inhibiteurs de corrosion respectueux de l'environnement, utilisés pour remplacer les produits chimiques toxiques [70].

III.4.1 Méthodes d'évaluation de la corrosion :

Il existe de nombreuses méthodes d'évaluation de la corrosion, mais celles couramment utilisées et citées dans la littérature pour l'inhibition de la corrosion des métaux en milieu NaCl sont les suivantes

- La gravimétrie (perte de masse)
- Les techniques de polarisation potentiodynamique
- La voltamétrie cyclique
- La spectroscopie d'impédance électrochimique
- La méthode d'évolution de l'hydrogène
- La méthode thermométrique

Ces techniques sont souvent complétées par d'autres méthodes d'analyse et d'identification des huiles et extraits de plantes utilisés comme inhibiteurs de corrosion, telles que la GC-MS, HPLC et IR-TF. L'état de surface des métaux est également analysé à l'aide de techniques telles que la spectroscopie des photoélectrons (XPS), la microscopie électronique à balayage (MEB) et le Raman.

III.4.2. Les inhibiteurs de corrosion

III.4.2.1. Définition :

Les inhibiteurs de corrosion sont des substances ajoutées à faibles concentrations dans des milieux corrosifs pour réduire ou empêcher la réaction du métal avec son environnement [71].

III.4.2.2. Propriétés :

Les inhibiteurs de corrosion peuvent être utilisés comme moyen unique de protection, soit de manière permanente en permettant l'utilisation de matériaux métalliques résistants à la corrosion, soit de manière temporaire lorsqu'une pièce ou une installation est particulièrement sensible à la corrosion, comme pendant le stockage, le décapage ou le nettoyage [72]. En général, un inhibiteur doit réduire la vitesse de corrosion du métal sans affecter ses caractéristiques physico-chimiques, être stable en présence des autres composants du milieu, résister aux oxydants, supporter les températures d'utilisation, être efficace à faible concentration, respecter les normes de non-toxicité et être économique.

III.4.2.3. Inhibiteurs de corrosion à base d'huiles et d'extraits de plantes :

Les huiles et extraits de plantes sont obtenus à partir de différentes parties des plantes, telles que les feuilles, les graines, les écorces et les racines. Leur composition est complexe, car elles contiennent un mélange de composés appartenant à différentes classes de la chimie organique, tels que les phénols, les hydrocarbures, les alcools, les aldéhydes, les cétones, etc. La composition peut varier en fonction de la localisation géographique, des conditions climatiques, de la période de récolte et de la partie de la plante utilisée. Les propriétés peuvent également varier, d'où la nécessité de travailler dans des conditions similaires pour assurer la reproductibilité des résultats lors de l'analyse et de l'identification des molécules présentes dans une huile ou un extrait. Les extraits de plantes ont été utilisés comme inhibiteurs de corrosion depuis les années 1930, mais leur utilisation a connu des

fluctuations en raison de leur impact sur l'environnement [73]. Des chercheurs ont utilisé différentes techniques, telles que celles mentionnées précédemment, pour étudier le comportement de ces produits naturels dans différents milieux et matériaux, les classifiant en fonction de leur pouvoir inhibiteur de corrosion et de leur impact sur l'environnement.

IV. Conclusion

La compilation des données bibliographiques sur le genre *Antirrhinum* nous incite à entreprendre une étude phytochimique et biologique sur l'espèce *Antirrhinum majus* faisant partie de cette vaste famille.

CHAPITRE II :
PARTIE EXPERIMENTALE

I. Introduction

Cette partie se base sur l'étude de la composition chimique des parties aériennes de l'espèce choisie *Antirrhinum majus L.*, à savoir le screening phytochimique, le dosage de tanins condensés, le dosage des flavonoïdes l'évaluation de l'activité oxydante et antibactérienne des différents extraits de cette plante.

Tout cela a été réalisé au niveau des laboratoires pédagogiques du département de chimie de la faculté des sciences de l'université Saad Dahleb-Blida et Laboratoire d'hygiène-Faroudja-Blida.

II. Etude phytochimique

II.1. Récolte de matière Végétale

La partie aérienne de la plante a été récoltée au mois d'Avril 2022 de la région de CHEFFA (wilaya de BLIDA). Après séchage dans un endroit sec et aéré à l'abri des rayons de solaires. Les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux (on obtient $m = 50$ g).

II.2. Macération

50 g de matière végétale (feuilles, tiges, fleurs) préalablement coupée en petits morceaux ont été placés dans un dessiccateur. La macération a été réalisée pendant 24 heures en utilisant trois solvants de polarités différentes.

Le premier solvant utilisé était le cyclohexane. Après les 24 heures de macération, l'extrait de cyclohexane a été récupéré par filtration. Ensuite, l'extrait a été concentré sous pression réduite dans un évaporateur rotatif jusqu'à obtenir un résidu sec, dont la masse était de 1,19 g.

Après le séchage de la matière végétale, une nouvelle macération a été effectuée en utilisant le chloroforme. La phase de chloroforme a été récupérée et concentrée à sec, donnant un résidu d'une masse de 0,89 g.

Le même processus a été répété avec le troisième solvant, l'éthanol, et l'extrait obtenu a été concentré à sec, donnant un résidu d'une masse de 4 g.



Figure II.1 : Les étapes d'extraction solide-liquide (Macération - Filtration - Evaporation).

Le diagramme suivant (Figure II.2) résume tout ceci

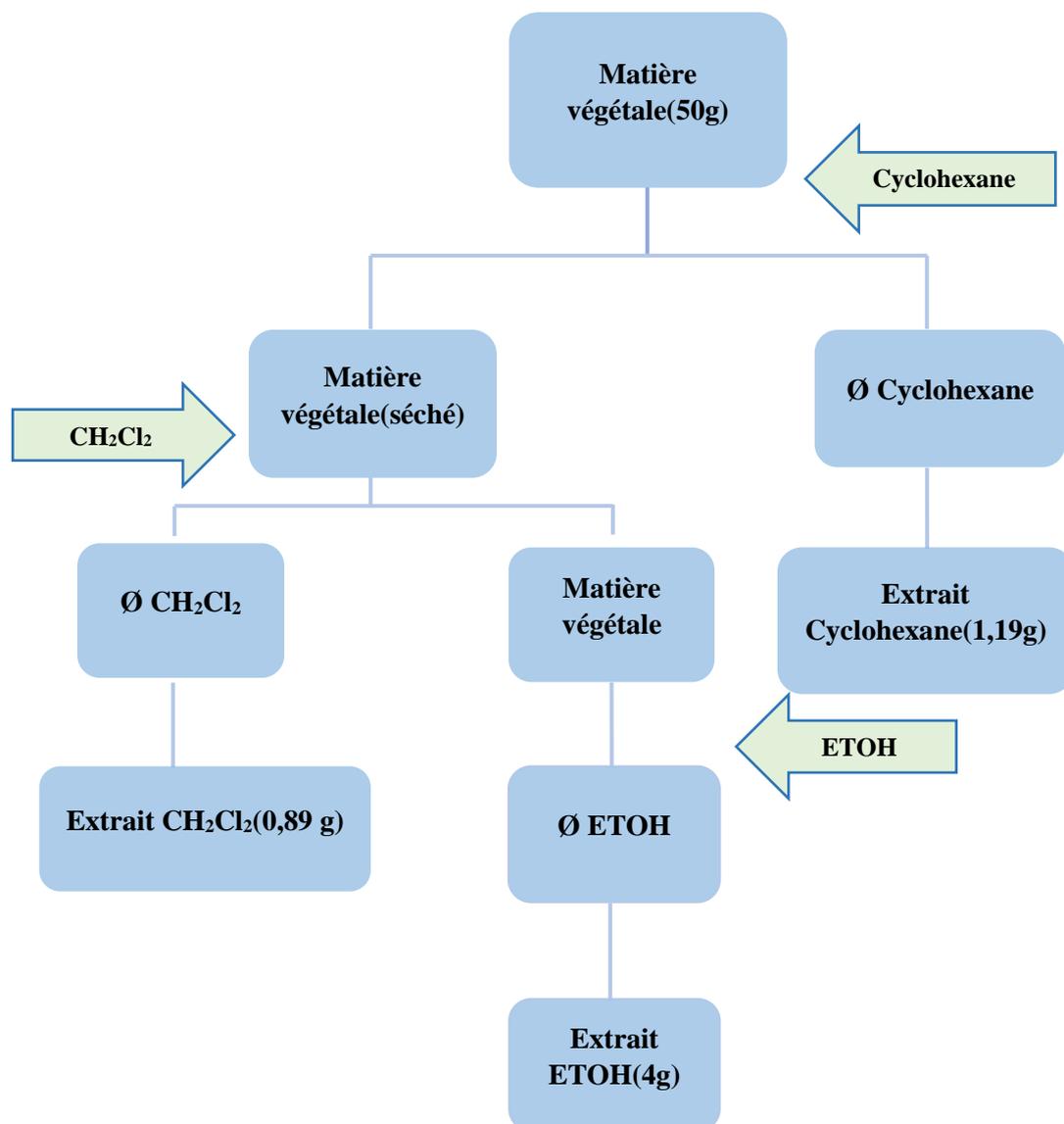


Figure II.2 : Schéma de protocole d'extraction solide-liquide.

II.3. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique est un ensemble de tests qualitatifs permettant de mettre en évidence les différents composés présents dans un produit végétal donné. Tels que les alcaloïdes, les saponines, les polyphénols, les flavonoïdes, les coumarines, les quinones, etc.

La présence de ces substances est mise en évidence par la formation de précipités et/ou une modification de la couleur du milieu [1]. Pour y parvenir, nous utilisons la technique des réactions en solution qui utilise les réactifs spécifiques.

II. 3.1. Préparation des échantillons

Pour préparer les échantillons, une petite quantité de matière végétale est macérée dans trois solvants différents pendant 24 heures.

✓ **Extrait hydroalcoolique** : noté **A**

Dans un Erlenmeyer, on ajoute 7 g de matière végétale à 100 ml d'un mélange de méthanol et d'eau dans un ratio de 70/30. Après agitation, le mélange est laissé en repos pendant 24 heures. Ensuite, le mélange est filtré pour récupérer le filtrat.

✓ **Extrait étherique** : noté **E**

Dans un Erlenmeyer, 7 g de matériel végétal sont ajoutés à 100 ml d'éther de pétrole. Après une période de macération de 24 heures, le mélange est filtré pour obtenir l'extrait étherique.

✓ **Extrait chloroformique** : noté **C**

Dans un Erlenmeyer, 4 g de matériel végétal sont ajoutés à 100 ml de chloroforme. Après une période de macération de 24 heures, le mélange est filtré pour obtenir l'extrait chloroformique.



Figure II.3 : Préparation des extraits.

II.3.2. Tests de caractérisations

II.3.2.1. Test de de flavan 3, 4 diols (test bate-smith)

On prend 2 ml d'extrait hydroalcoolique et on les répartit dans deux éprouvettes distinctes. Dans l'une des éprouvettes, on ajoute 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré, tandis que l'autre éprouvette est conservée en tant que témoin sans ajout d'acide. Les deux éprouvettes sont ensuite placées dans un bain-marie et chauffées pendant 30 minutes..

➔ L'apparition de la couleur rouge indique la présence de leuco anthocyanes, qui sont des dérivés de flavan-3,4-diols [2].

II.3.2.2. Test de flavonols et flavanones (test de Wilstater)

Deux tubes distincts sont utilisés pour répartir 2 ml d'extrait hydroalcoolique. Dans l'un des tubes, 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré est ajouté lentement, tandis que l'autre tube reste sans

modification en tant que témoin, sans ajout d'acide. Par la suite, quelques copeaux de magnésium sont ajoutés lentement dans chaque tube. Les réactions chimiques qui en résultent sont effectuées sous une hotte pour garantir une ventilation adéquate.

- L'apparition d'une couleur qui vire vers le rouge pourpre (flavonols) ou le rouge violacées (flavonones et flavonols) confirme l'existence des flavonoïdes [2].

II.3.2.3. Test des tanins

On répartit 2 ml d'extrait hydroalcoolique dans 3 tubes distincts. Dans le premier tube, on ajoute 4 à 5 gouttes de gélatine à 1 %. Dans le deuxième tube, on ajoute 4 à 5 gouttes de FeCl_3 dans une solution d'éthanol. Le troisième tube est utilisé comme témoin, sans ajout de substance. La présence de tanins galliques provoque un changement de couleur vers le bleu-noir, tandis que la présence de tanins catéchiques conduit à une couleur brun verdâtre avec précipitation lors des tests de gélatine [3].

II.3.2.4. Test des alcaloïdes

Pour chaque extrait, effectuer la procédure suivante : ajouter 5 ml d'HCl % à 1 ml de chaque extrait, chauffer l'ensemble au bain-marie, et diviser chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume a été traité avec le réactif de Mayer et l'autre avec le réactif de Wagner.

Le test a été réalisé avec le réactif de Mayer, qui a été préparé comme suit : 1,358 g de HgCl_2 ont été dissous dans 60 ml d'eau distillée, puis 5 g de KI ont été dissous dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.

- La formation d'un précipité blanc ou brun confirme la présence des alcaloïdes [4].

II.3.2.5. Test des quinones

Ajouter quelques gouttes de solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 10 %) à 2 ml d'extrait d'éther.

- Après agitation, la couleur de la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet indiquant la présence de quinones [5].

II.3.2.6. Test des Anthraquinones

Ajouter quelques gouttes de solution d'hydroxyde de potassium (KOH, 10%) à 2 ml d'extrait de chloroforme.

- Une couleur rouge dans la phase aqueuse indique un test positif [6].

II.3.2.7. Test des coumarines

Un fragment de l'extrait E est dissout dans 2 ml d'eau chaude, après refroidissement la solution est partagée dans deux tubes ; le 1er tube témoin et dans le 2ème tube on ajoute 0,5ml de NH_4OH .

→ L'apparition d'une fluorescence intense du tube 2 sous lumières UV 365 nm montre la présence des coumarines [7].

II.3.2.8. Test des saponines (indice de mousse)

Les saponines sont généralement appelées composés tensioactifs non volatils et sont principalement distribuées dans le règne végétal [8]. Structurellement parlant, les saponines peuvent être divisées en deux catégories : les saponines stéroïdiennes et les saponines triterpéniques selon la nature de leurs saponines [9].

Prenez 5 g de matériel végétal contenant des tiges broyées et placez-le dans un flacon Erlenmeyer. Ajoutez 50 ml d'eau distillée et faites bouillir pendant 30 minutes. Une fois refroidi, filtrez la préparation. Prenez ensuite 5 ml de la décoction obtenue et transférez-les dans un tube à essai. Remuez le contenu du tube à essai

→ L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines [9].

III. Quantification des composés phénoliques

Cette méthode permet de déterminer la quantité des polyphénols totaux, des tanins condensés et des flavonoïdes totaux présents dans un extrait préparé à partir de notre plante.

III.1. Dosage des polyphénols totaux

III.1.1. Principe :

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits de la plante est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par (Talbi *et al.*, 2015) [10] avec quelques modifications.

III.1.2. Procédure

Mode opératoire

Préparation de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5%

7,5 grammes de Na_2CO_3 et sont dissouts dans 100 ml d'eau distillé.

Préparation de l'extrait de plante

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de l'eau distillée (ou éthanol).

Préparation de Folin-Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois

1 mL de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10 ml avec l'eau distillée (9 ml).

• 20 μL d'extrait de plante + 100 μL de FCR dilué (1 :10) + (Après 4 min) 800 μL de carbonate de sodium (7,5%) + mettre le mélange à l'obscurité à température ambiante pendant 2h + lecture à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (éthanol) [11].

Gamme d'étalonnage

L'acide gallique (0 - 75 $\mu\text{g/ml}$) est utilisé comme standard pour établir la courbe d'étalonnage.

Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique

On prend 1mg de l'acide gallique et on le dissout dans 5 ml d'éthanol pour obtenir la solution S1 (0,2 mg/ml). Les dilutions sont préparées comme suite (figure II.4) :

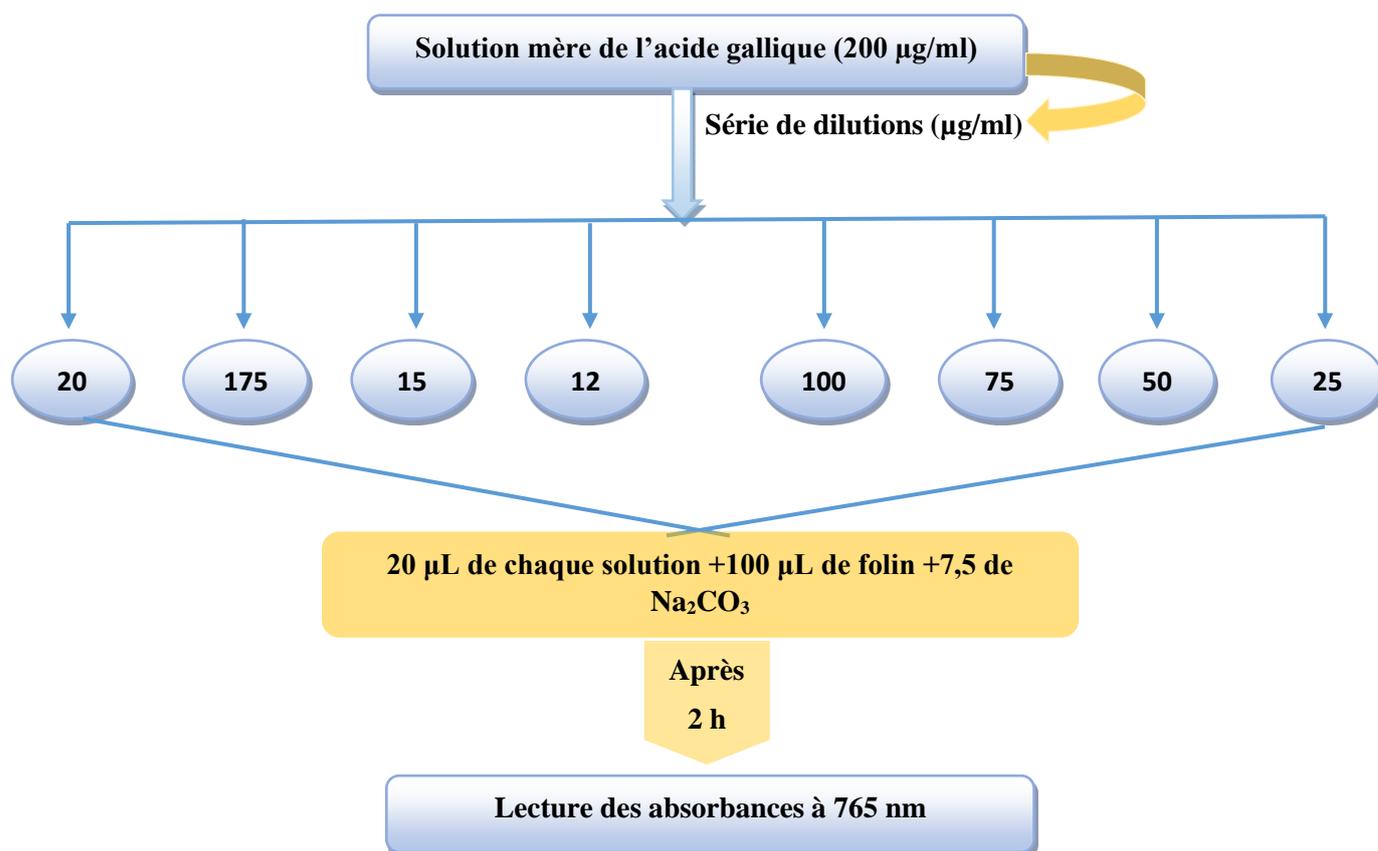


Figure II.4 : Protocole de dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols des trois extraits (Ethanol et Chloroforme) est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (ayant l'équation : $Y = 0.067x - 0,1744 / R^2 = 0,999$) et est exprimée en microgramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait sec PS) .

Les absorbances de courbe d'étalonnage en fonction de leur concentration sont rapportées sur la figure ci-dessous (figure III.5)

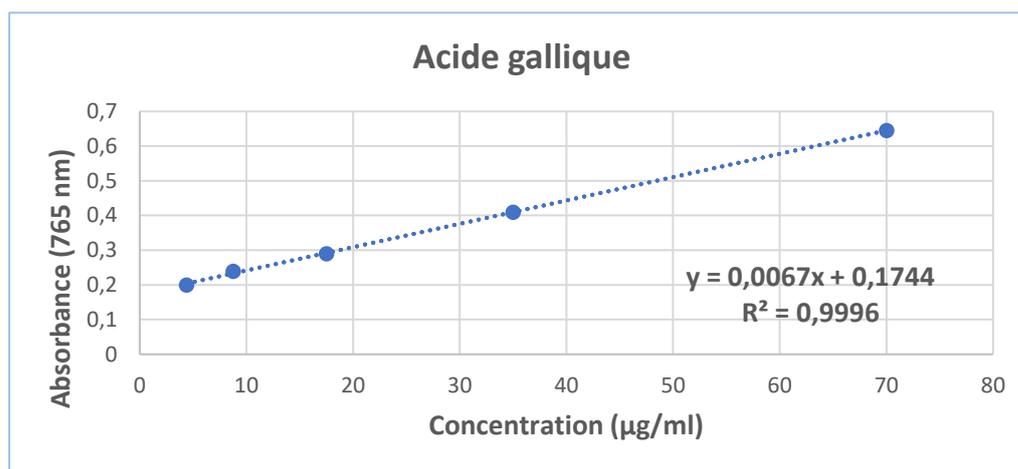


Figure II.5 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

III.2. Dosage des flavonoïdes totaux

III.2.1. Principe

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) a été utilisée pour déterminer la teneur totale en flavonoïdes. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre qui forme une liaison Covalente avec le trichlorure d'aluminium ce qui donne des complexes jaunâtres ceci se traduit par le fait que le métal (Al) a perdu deux électrons pour s'unir à deux oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneurs d'électrons.

Le complexe jaune présente une absorbance maximale à 430 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présents dans l'échantillon [12].

III.2.2. Procédure

• Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée selon la méthode décrite par (Marinova *et al* 2005). [13], avec modification des réactif (remplacé nitrite de sodium par acétate de sodium). Ajouter 0,1 ml de solution d'acétate de sodium et 0,1 ml de solution de chlorure d'aluminium à 2 ml d'extrait ou de solution de fraction. Après 5 min d'incubation, mettre en contact le mélange avec 2,8 ml d'eau distillée. Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 420 nm contre un blanc composé de 0,1 ml de solution d'acétate de sodium, 0,1 ml de solution de chlorure d'aluminium et 2,8 ml d'eau distillée. La quercétine a été utilisée comme étalon de référence pour établir la courbe d'étalonnage et quantifier la teneur totale en flavonoïdes exprimée en milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

• Préparation de la gamme d'étalon de la quercétine

La gamme d'étalon est préparée avec la quercétine à des concentrations variables de (0 -30) µg/ml.

2000 µl de chaque dilution est a été mélange avec 100 µl de trichlorure d'aluminium (10%) et 100µl d'acétate de sodium (1 M) et 2500 µl de l'eau distillée. Après une heure (1h) d'incubation à température ambiante L'absorbance a été mesurée à 420 nm par un spectrophotomètre UV–Visible [13]. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage (Figure III.6), ayant L'équation : ($Y = 0,027x + 0,004 / R^2 = 0,999$) et est exprimée en microgramme d'équivalent de la quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait sec PS).

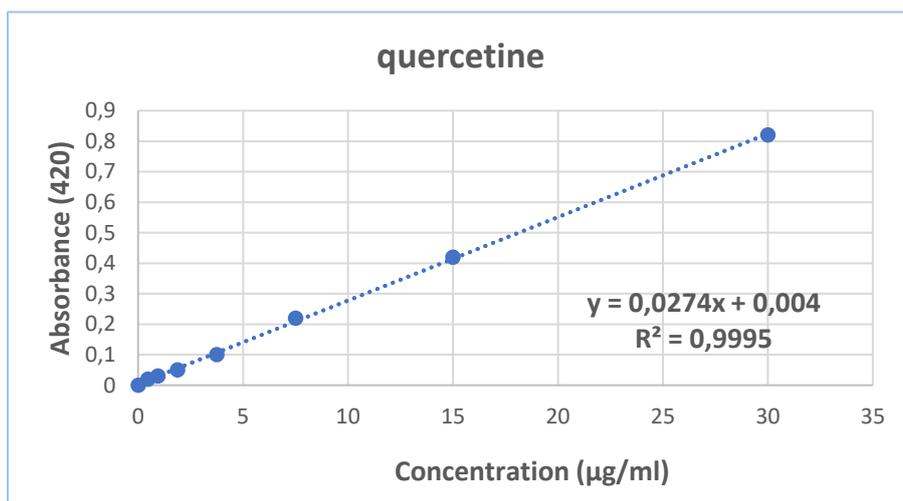


Figure II.6 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

La (figure II.7) résume le protocole de dosage des flavonoïdes totaux.

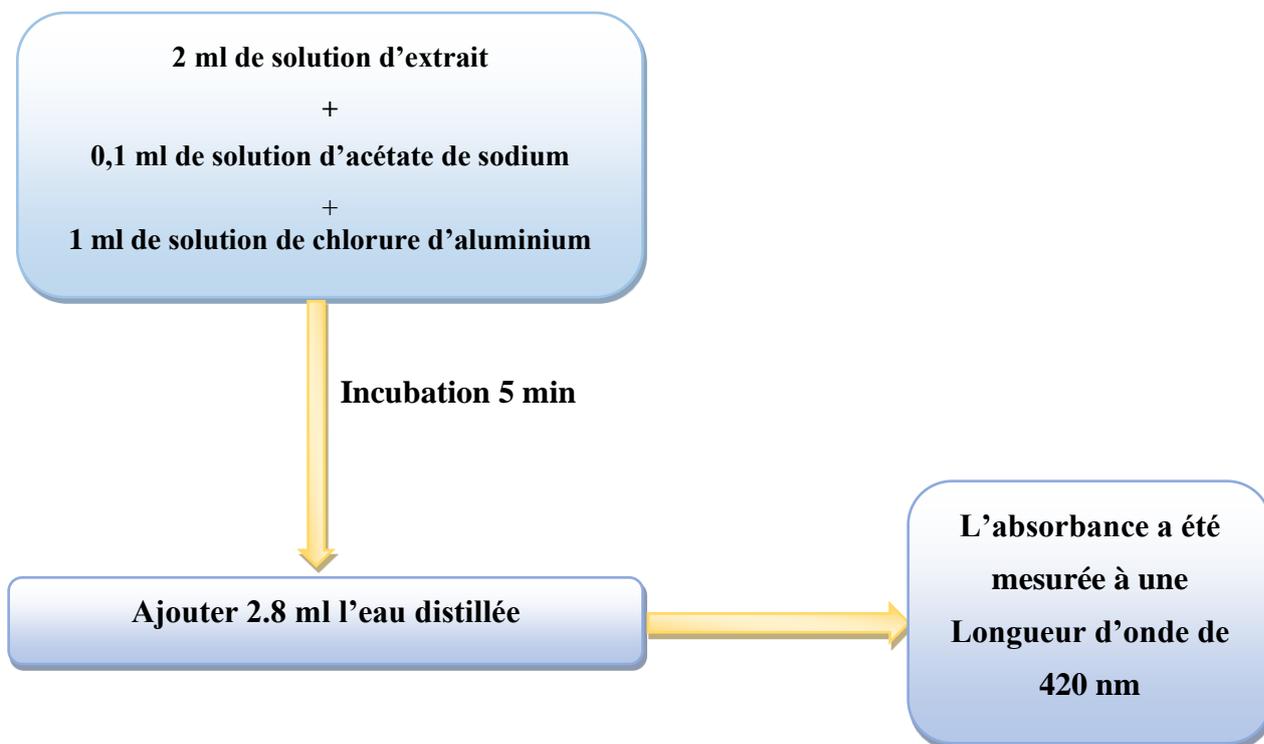


Figure II.7 : Protocole de dosage des flavonoïdes totaux

III.3. Dosage de tanins

III.3.1. Principe

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupe aldéhydique de la vanilline sur le carbone en position 6 du cycle A des tanins condensés qui entraînent une coloration verte de la solution qui absorbe à 500 nm.

Mode opératoire

La teneur en tanins condensés a été déterminée selon la méthode décrite par (Julkunen-Titto,1985) [14]. Une quantité de 400 μL de chaque extrait a été ajoutée à 3000 μL de la solution à 4% de vanilline dans l'éthanol. Le mélange résultant est vigoureusement agité et un volume de 1500 μL d'acide chlorhydrique concentré y a été additionné. Le mélange obtenu est laissé au repos pour réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 500 nm contre un blanc constitué de la solution à 4% de vanilline dans le méthanol. Une solution mère catéchine a été utilisée comme standard de référence pour l'établissement de la courbe d'étalonnage et pour la quantification des teneurs en tanins condensés exprimés en milligramme équivalent de catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g de la matière sèche) [14]. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage (Figure III.8), ayant L'équation : $Y = 0,0316x + 0,01314 / R^2 = 0,996$.

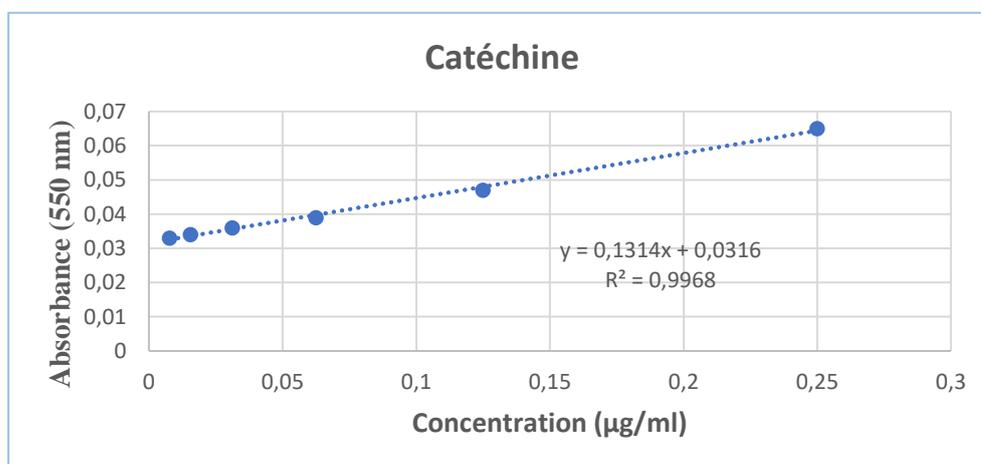


Figure II.8: Courbe d'étalonnage de la Catéchine

La (figure II.9) résume le protocole de dosage des tanins

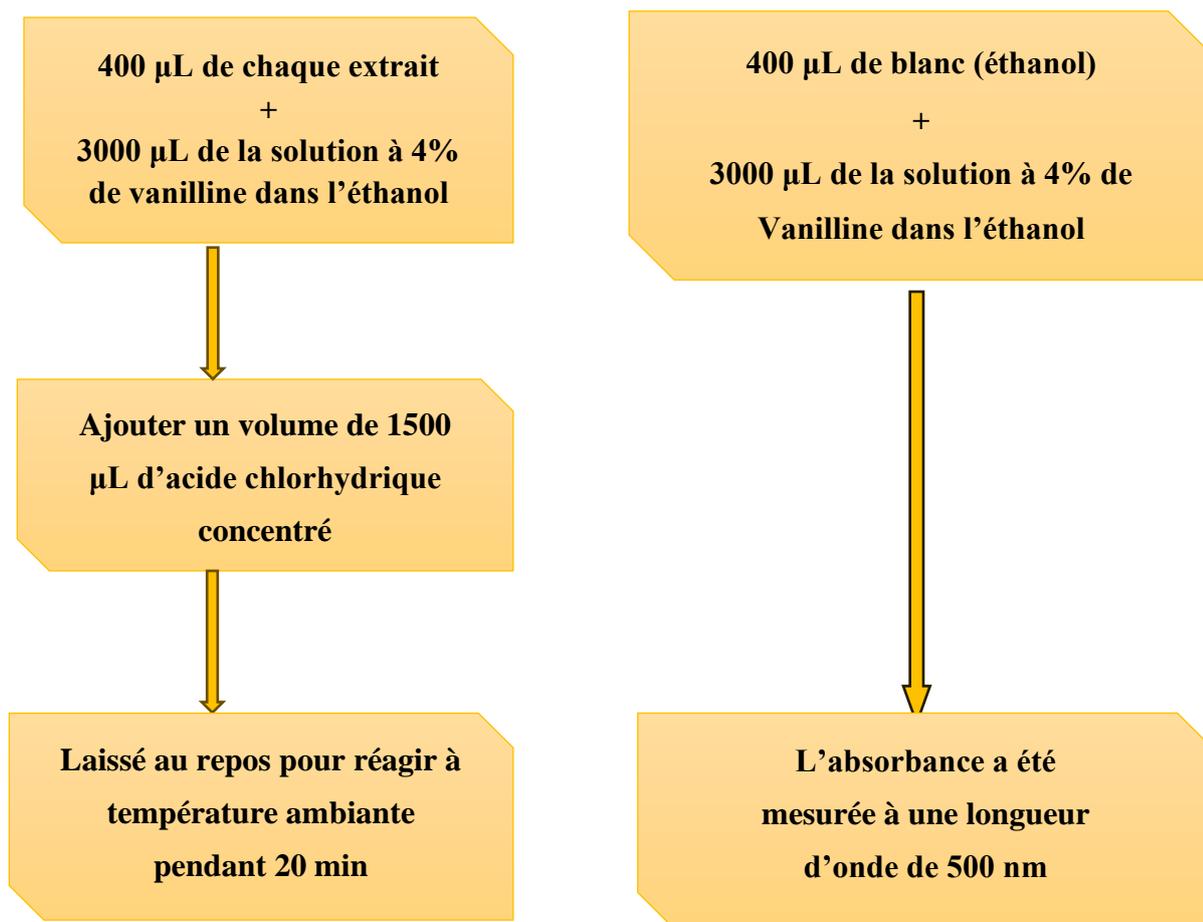


Figure II.9 : Protocole de dosage des Tanins

IV. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée *in vitro* par deux méthodes différentes :

- ✓ La méthode de piégeage du radical libre 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).
- ✓ La méthode de blanchissement de la β -carotène.

IV.1. La méthode de piégeage du radical libre DPPH

IV.1.1. Principe

La réduction de ce radical stable par un agent antioxydant en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) induit une perte de sa couleur violette foncée qui va se transformer en jaune pâle.

Cette réaction qui s'effectue à température ambiante pour éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de son absorbance caractéristique entre 515-518 nm provoquée par les antioxydants.

Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non coûteux [15]. Dans ce test, le substrat est un radical stable, qui peut en fait être neutralisés soit par réduction directe via des transferts d'électrons ou par des transferts d'atome d'hydrogène. En formant le DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine)

avec perte de son ultime absorbance. Une faible absorbance indique une meilleure activité antioxydant [16].

IV.1.2. Préparation du DPPH

Une quantité de 3 mg de DPPH est dissout dans 100 ml d'éthanol avec agitation pendant 30min, à l'abri de la lumière. L'absorbance est de (0,5-0,8) mesurée avec un spectrophotomètre à 517nm.

✚ Mode opératoire

400 µl des solutions d'extraits ont été ajoutés à 1600 µl DPPH (3% préparée dans éthanol).

Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 400 µl de méthanol avec 1600 µl de la solution éthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration, le test est répété 2 fois. L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous [16].

L'activité antiradicalaire est estimée en pourcentage d'inhibition grâce à la formule suivante :

$$\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ échantillon) / Abs\ contrôle] \times 100$$

I% : Pourcentage d'inhibition de DPPH°

Abs Contrôle : Absorbance du contrôle Abs

Echantillon : Absorbance de l'extrait

Les valeurs de l'IC₅₀ ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

Nous avons utilisé différentes concentrations (8, 4, 2, 1,0.5,0.25mg/ml) des échantillons étudiés.

Le protocole d'évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits ainsi que celui des standards est illustré par la (Figure II.10) :

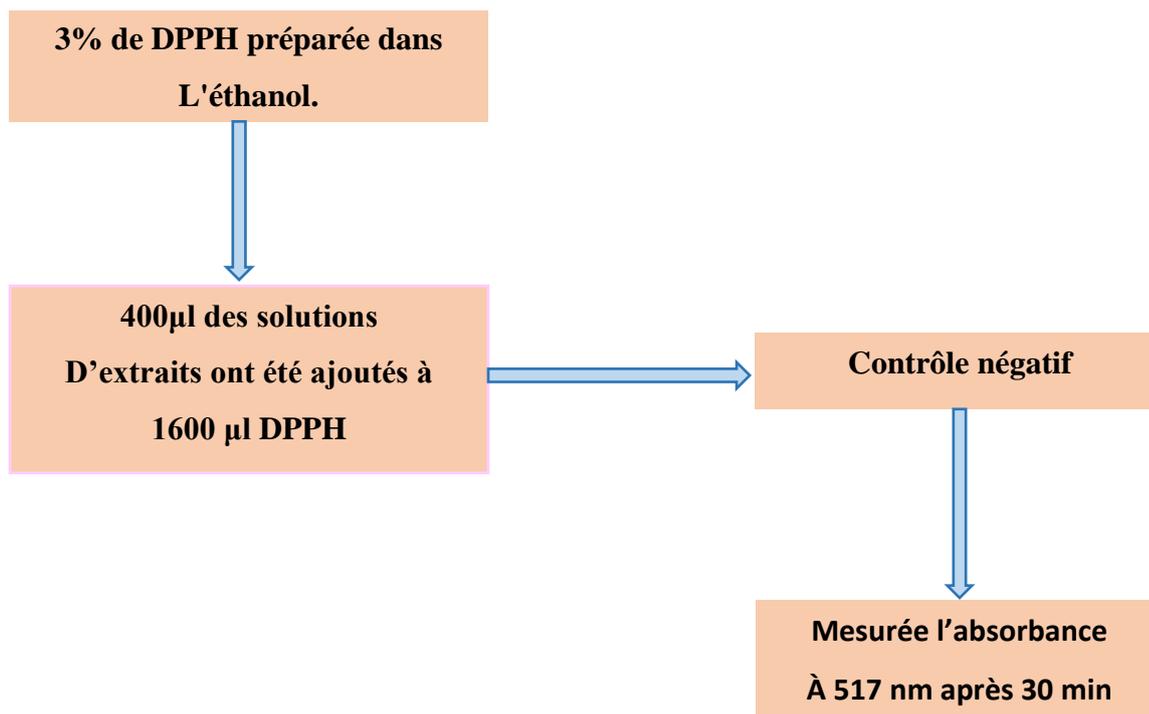


Figure II.10: Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire la méthode de DPPH.

L'expérience a été répétée deux fois et les résultats ont été exprimés en valeurs des IC_{50} (Concentration inhibitrice de 50% des radicaux DPPH^o). Elle a été calculée à partir du graphe de pourcentage d'inhibition (figure II.11) en fonction de la concentration de l'échantillon qui présente l' IC_{50} la plus faible est celui qui présente l'activité anti-radicalaire la plus importante. Les résultats obtenus pour l'extrait testé ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour l'acide ascorbique pris comme antioxydant de référence.

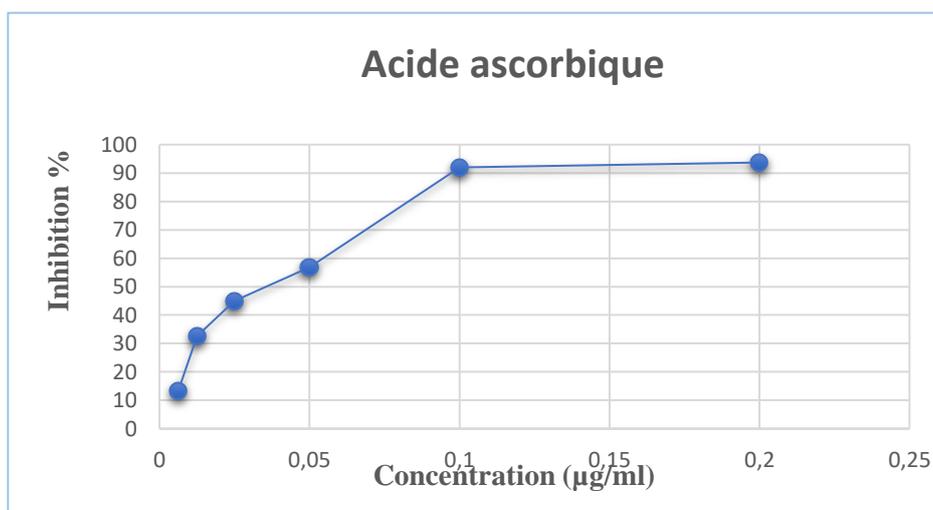


Figure II.11 : Courbe d'inhibition % du DPPH en fonction de concentration d'acide ascorbique

Le protocole d'évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits ainsi que celui des standards est illustré par la (Figure II.12) :

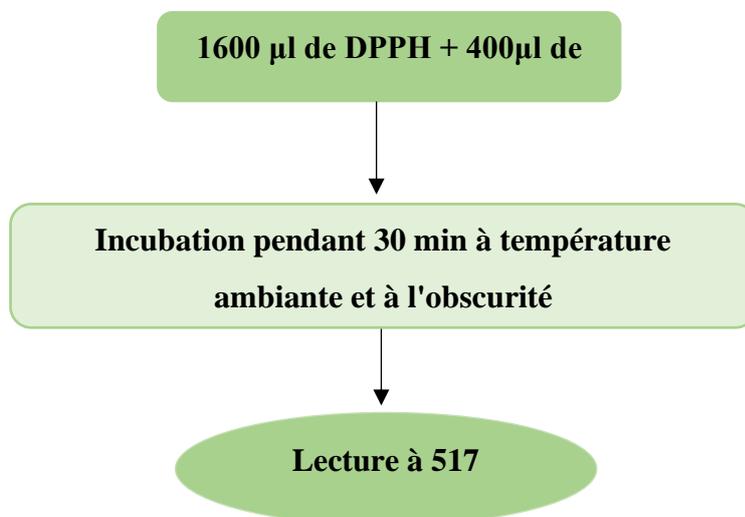


Figure II.12: Protocole de l'évaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH

IV.2. Méthode de blanchissement du β -carotène

IV.2.1. Principe

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par (Marco 1968) [17], puis légèrement modifiée par Miller (1971) [18]. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse Est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50°C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extrait végétal induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible [19]. La capacité antioxydante de nos échantillons a été évaluée selon la méthode décrite par [20].

Mode opératoire

Une quantité de 2 mg de β -carotène a été solubilisée dans 10 ml de chloroforme (CHCl_3), la solution a été transférée dans un ballon contenant préalablement 200 µl d'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Après évaporation totale du chloroforme, 100 ml d'eau distillée ont été additionnées au résidu et l'ensemble a été mélangé vigoureusement jusqu'à obtention d'une émulsion.

Un volume de 4800 µl de cette émulsion a été ajouté dans des tubes contenant chacun 200 µl de chaque extrait (à une concentration finale de 8 mg/ml préparé dans l'Ethanol). Après agitation, les tubes sont placés dans un bain marie à 50 C° pendant 2h, l'absorbance a été mesurée immédiatement

contre un blanc (émulsion sans extrait) à 470 nm pendant des intervalles de temps : 30 min, 1h, 1 :30h et 2h d'incubation à température ambiante [20]. La même procédure a été répétée avec le hydroxy anisole butyle (BHA) (1 mg/ml) comme un contrôle positif et avec l'éthanol comme des contrôles négatifs.

L'activité antioxydante des extraits et du BHA a été calculée par rapport au contrôle négatif en utilisant l'équation suivante [21].

$$AA\% = \left[1 - \frac{Abs \text{ échantillon } t=0 - Abs \text{ échantillon } t=120}{Abs \text{ contrôle } t=0 - Abs \text{ contrôle } t=120} \right] \times 100$$

AA% : activité antioxydante %

Abs échantillon t=0 : Absorbance de l'échantillon à t=0

Abs échantillon t=120 : Absorbance de l'échantillon à t=120 min

Abs contrôle t=0 : Absorbance du blanc à t=0

Abs contrôle t=120 : Absorbance du blanc à t=120 min

La (figure II.13) présente le protocole utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits par la méthode de blanchissement du β -carotène, ainsi que celui des standards.

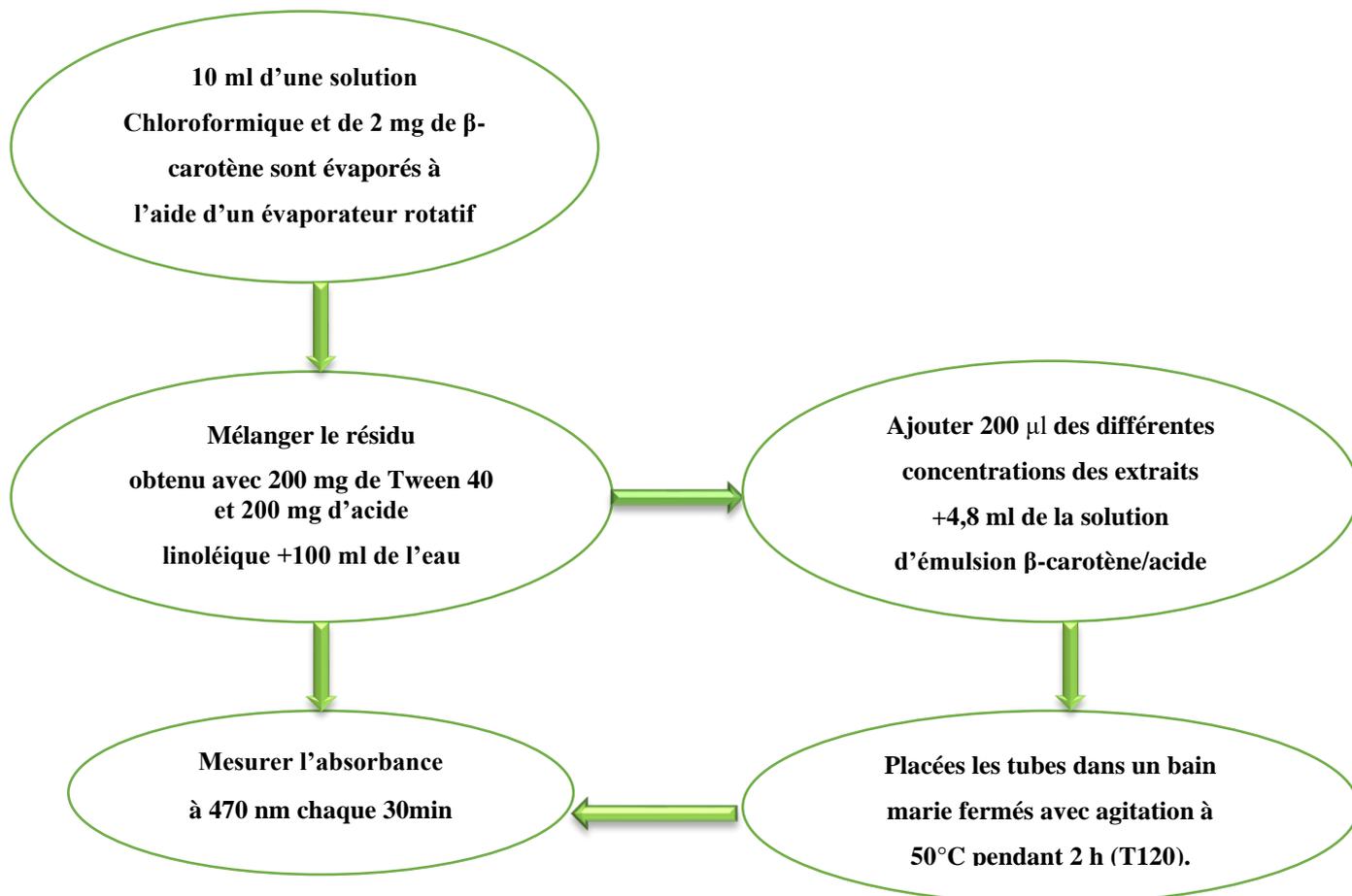


Figure II.13: Protocole de l'évaluation de l'activité antiradicalaire par le test de blanchissement du β -carotène.

V.3 Caractérisation des extraits

V.3.1. Analyse par UV-VIS

La spectroscopie UV-Visible est une méthode d'analyse et d'identification des espèces chimiques ainsi la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon. Elle se réalise à l'aide d'un L'absorption dans le domaine UV-visible est due au passage d'un niveau électronique à un autre d'énergie supérieure avec changement des niveaux de vibration et de rotation ; au cours de ce processus, un électron passe d'une orbitale moléculaire à une autre d'énergie supérieure.

Les spectres dans l'UV-visible donnent l'absorbance de l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde du rayonnement repérés en abscisses. Pour cette analyse, nous avons utilisé un appareil de type « Rayleigh UV 2601 » (figure II.14) et le solvant utilisé pour la dilution des extraits est l'hexane.



Figure II.14 : Le spectromètre UV-VIS.

VI. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits : Cyclohexane, Chloroforme et Ethanol des parties aériennes de l'espèce *Antirrhinum majus* L a été testé, *in vitro*, par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé. Dans cette étude, nous avons utilisés cinq bactéries : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonelle aboney* (NCTC 6017) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Cette étude de l'activité antibactérienne est réalisée au laboratoire d'hygiène au niveau de l'Établissement Hospitalier Public, Ferroudja, Blida.

VI.1. Préparation des extraits

La préparation des solutions a été réalisée en solubilisant 20 mg de chaque extrait (Cyclohexane, Chloroforme, Ethanol dans 1 ml de DMSO. Ces solutions obtenues sont communément appelées "solutions mères" [22].

VI.2. Préparation de milieu de culture

Pour optimiser leur croissance, les souches bactériennes sont ensemencées dans de la gélose nutritive Mueller Hinton et incubées à 37°C pendant 24 heures. Ensuite, quelques colonies bien isolées et identiques de chaque souche bactérienne à tester sont prélevées en raclant à l'aide d'une anse de platine. Les colonies prélevées sont déchargées dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis la suspension bactérienne est homogénéisée de manière approfondie. Si nécessaire, l'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit de la culture bactérienne s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop concentré [23].

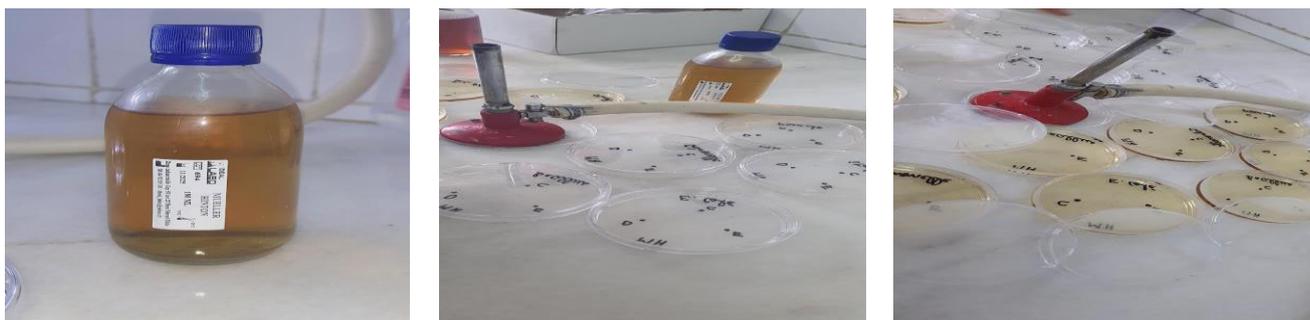


Figure II.15: Préparation du milieu de culture

VI.3. Préparation de la suspension bactérienne

Grattez un petit nombre de colonies bien séparées avec un écouvillon stérile, puis il en est de même pour chaque souche bactérienne à tester. Écouvillon drainé dans 5 ml Homogénéisation de l'eau physiologique avec des suspensions bactériennes.

VI.4. Ensemencement

L'ensemencement et le dépôt des disques ont été effectués de la manière suivante :

Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'excès de liquide est retiré en le pressant fermement contre la paroi interne du tube.

L'écouvillon est frotté sur l'ensemble de la surface gélosée de la boîte de Petri, en réalisant des stries serrées de haut en bas.

Cette opération est répétée deux fois en tournant la boîte de Petri de 60° à chaque fois pour assurer une répartition homogène des bactéries.

L'ensemencement est finalisé en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. Si plusieurs boîtes de Petri sont ensemencées avec la même souche, l'écouvillon est rechargé à chaque fois.



Figure II.16 : Ensemencement des bactéries

Dépôt des disques

Les disques imprégnés d'extraits sont délicatement déposés sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.



Figure II.17 : Dépôt des disques imprégnés par les extraits

De même, des disques contenant l'antibiotique la gentamicine (témoin positif) et DMSO (contrôle négatif) appropriés et prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison des résultats avec les extraits testés. Ensuite, les boîtes de Petri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C



Figure II.18: Disposition des disques des trois d'extrait Et le témoin (-) et positif (+) Dans la boîte.

VI.5. Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition après 24 heures d'incubation, qui sont représentées par un cercle clair formé autour de chaque disque [24].

La zone d'inhibition a été évaluée en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le milieu du disque (y compris le diamètre des disques à l'aide d'une règle).

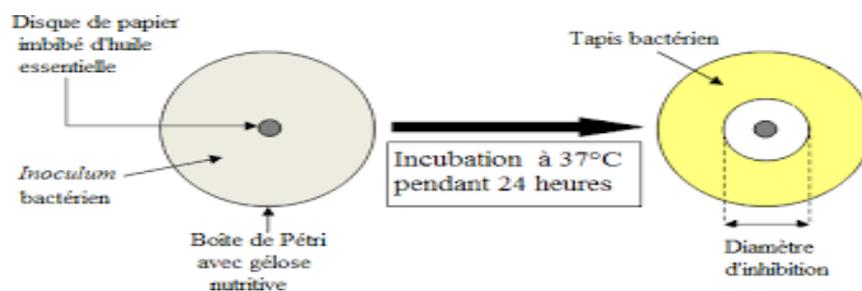


Figure II.19: Schéma de zone d'inhibition dans un test antibactérien

VIII. Evaluation de L'activité antifongique

Le même protocole de l'activité antibactérienne a été suivi en utilisant les deux fungus : *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) et *Candidat albicans* (ATCC 10231), Le milieu de culture est le SABOURAUD. Cette étude de l'activité est réalisée aussi au laboratoire d'hygiène au niveau de l'Établissement Hospitalier Public, Ferroudja, Blida.

Les mêmes étapes que l'activité antifongique sont suivi dans l'ordre (Préparation de milieu de culture SB - Suspension bactérienne - Prélèvement- Ensemencement- Applications des disques d'extrait- Lecture des résultats).



Figure II.20: les étapes de l'activité antifongique.

IX. Conclusion

Nos travaux de screening, de dosages et de l'évaluation des propriétés antioxydantes, antibactériennes, antifongique et anticorrosion, nous ont permis une identification qualitative et quantitative des différents extraits de notre plante Les résultats relatifs à cette partie de nos investigations seront détaillés dans le chapitre III, rassemblant résultats et discussion.

Références bibliographiques

- [1] F. Haddouchi · T.M. Chaouche · N. Halla. Screening phytochimique, activités Antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. December2018, Vol (5), n°2, P : 2.
- [2] bruneton.j., (1993). Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales .2éme édition Tec et Doc (Ed) paris.
- [3] Dohou. N, Yamnik, Gmiran, Idrissi Hassani. LM, (2003). Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro Marocaine, Thymelaea Iychroides. Acta Botanica Malacitana :102.
- [4] Huang, D. J., Chun-Der, L. I. N., Hsien-Jung, C. H. E. N., & Yaw-Huei, L. I. N. (2004). Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (Ipomoea batatas [L.] LamTainong 57') constituents.*Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45.
- [5] Ribérrreau. GP., "Les composés phénoliques des végétaux." Edition Dunod, Paris, (196).
- [6] Rizk. AM., "Constituents of plants growing in Qatar". *Fitoterapia*. (1986).
- [7] Koudougou K ; 2000 ; Etude de la chimie et de l'activité antimycosique des extraits de Biophytum petersianum Klotzsch(Oxalidaceae) ;université de Ouagadougou-DEA ; P.16.
- [8] Vincken, J.-P., Heng, L. DE Groot, A., GRUPPEN, H. *Phytochemistry*, 2007, 68, 275-297.
- [9] Hostettmann, K. et Marston, A. Cambridge University Press, 1995.
- [10] Talbi A, Boumaza, El-mostafa K, Talbi J, Hilal A. " Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L. " *Environ Sci*, V. 6, (2015) , 1111-1117.
- [11] Bentame, A., Benayache S., Creche, J., Petit, G., Bermejo, B. J., Leon, F. and Benayache, F. A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L», (2005). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 1061-1065.
- [12] Topçu G, Ay A, Billici A, Sarihurkucu C, Ozturk M, and Ulubelen A. *Food Chemistry*,2007, 103, 816-822.
- [13] Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3): 255-260.
- [14] Julkunen-Titto R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 33: 213-217.
- [15] Boligon AA, Machado MM, and Athayde ML. Technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal chemistry*. 4, 7, (2014), 517-522.
- [16] P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity, Son Kalamkari *J.Sci, Technol*, 26 (2) (2004) 211-219.
- [17] Marco, Gl.A., "Rapid Method for Evaluation of Antioxidants". *J Am Oil Chem Soc*, (1968), V. 45, 594-8.

- [18] Mille, He. A., "Simplified Method for The Evaluation of Antioxidants". *J Am Oil hem Soc* (1971), 48 - 91.
- [19] Laguerre, M., Giraldo, L.L.J., Lecomte, G., Pina.,M., Villeneuve. ; "Outils D'évaluation In Vitro De La Capacité Antioxydant", *Fondamentale Ocl*, V.14, N°5, (September2007), 273-289.
- [20] Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical analysis*, 2002; 13(1), 8-17.
- [21] Amin Ismail; Tan Siew Hong. Antioxidant Activity of Selected Commercial Seaweeds. *Mal J Nutr* 8(2) : 167-177, September 2002.
- [22] Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargas R., (1987). *Bactériologies médicales : techniques usuelles*. Edition SIMEP (2ème tirage), France
- Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargas R., (1987). *Bactériologies médicales : techniques usuelles*. Edition SIMEP (2ème tirage), France
- [23] Ericsson H.M., Sherris J.C., (1971). Antimicrobial susceptibility testing-Report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B. Suppl* 217, pp 1-90.
- [24] Billing J. and Sherman P. W. 1998; Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.* 73: 3-49.

CHAPITRE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

I. Introduction

Ce chapitre se divise en deux parties distinctes. La première partie concerne l'analyse phytochimique et la quantification des polyphénols et flavonoïdes totaux présents dans les extraits des parties aériennes de la plante *Antirrhinum majus L.* La deuxième partie porte sur l'évaluation des activités antioxydante, antimicrobienne, et anticorrosion de ces extraits.

II. Etude phytochimique

II.1. Le rendement de macération

Les rendements d'extraction des deux macérations sont déterminés en poids de matière végétale sèche et les résultats sont exprimés en pourcentage et répertoriés dans le (tableau II.1).

Tableau II.1: Rendement de l'extraction de l'espèce *Antirrhinum majus L*

Poids Ps	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
50g	Cyclohexane	1.19	2.38
	Chloroforme	0.89	1.78
	Ethanol	4	8
100g	Méthanol	9	10

D'après nos résultats nous avons observé des différences entre les rendements d'extractions consécutives.

- Dans la première macération l'extrait Ethanolique donne le rendement le plus élevé dans cette macération avec un pourcentage de 8% et l'extrait cyclohexane avec pourcentage de 2.38% suivie de l'extrait Chloroformique qui donne le rendement le plus bas 0.89%.
- Dans la deuxième macération l'extrait méthanolique donne un rendement important de 10% qui représente la valeur la plus élevée dans les deux macérations.

Cette différence observée dans les valeurs des rendements d'extraction est due aux différents solvants utilisés, suggérant que le rendement d'extraction des solvants polaires (Méthanol, Ethanol) est plus important que les solvants moyennement polaires (chloroforme) et apolaire (cyclohexane).

Globalement, les rendements des extraits secs peuvent varier en fonction des paramètres d'extraction tels que la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant. Ces extraits sont ensuite utilisés pour évaluer les activités antioxydantes et antimicrobiennes.

II.2. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est basé sur des réactions qualitatives qui permettent d'identifier les substances chimiques existant dans la Plante.

Le principe est basé soit sur la formation de complexes insoluble en utilisons des réactions de Précipitation soit sur la formation de complexes coloré en utilisons les réactions de coloration entre les réactifs et les substances désirés.

Les résultats globaux du criblage chimique de l'espèce sont regroupés dans le (tableau III.1).

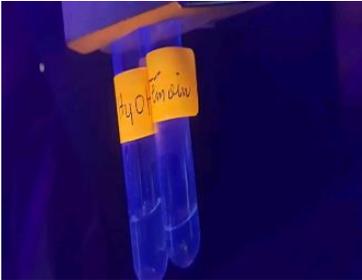
Tableau III.1: Résultats des tests de caractérisation des déférents groupes chimiques.

Groupe chimique	Extrait	Observation	Résultat	
Flavonoïdes (flavan3,4-diol)	A	Changement de couleur (rouge)		+++
Flavonoles	A	Changement de couleur (rouge pourpre)		+++

Tableau III.1: Résultats des tests de caractérisation des différents groupes chimiques(suite).

<p>Tanins (gélatine)</p>	<p>A</p>	<p>Précipitation</p>		<p>+</p>
<p>Tanin (FeCl₃)</p>	<p>A</p>	<p>Changement de couleur (brun verdâtre)</p>		<p>++</p>
<p>Quinones</p>	<p>E</p>	<p>Pas de changement de couleur</p>		<p>-</p>

Tableau III.1: Résultats des tests de caractérisation des différents groupes chimiques(suite).

<p>Anthraquinones</p>	<p>C</p>	<p>Pas de changement de couleur</p>		<p>-</p>
<p>Coumarine</p>	<p>E</p>	<p>Pas de fluorescence</p>		<p>-</p>
<p>Saponoside</p>	<p>Aqueux</p>	<p>Formation d'une mousse</p>		<p>++</p>
<p>Alcaloïde</p>	<p>Extrait éthanolique</p>	<p>Trouble (formation de petite précipitation blanc)</p>		<p>+</p>

Réaction très positive (+++) : présence confirmée. **Réaction positive** (++) : présence modérée

Réaction plus au moins positive (+) : présence en tant que trace. **Réaction négative** (-) : absence

Les résultats de screening phytochimique nous permettent de constater que cette plante renferme les différents composés recherchés avec des présences variables selon les tests de coloration.

- Une forte présence des flavan-3,4-diols et des flavonoles, tanins catéchiques dans l'extrait hydro alcoolique et les saponosides dans l'extrait aqueux donc sont les plus abondants.
- Une faible présence des alcaloïdes en tant que trace dans l'extrait éthanolique.
- L'absence des quinones et coumarines dans l'extrait éthérique et des anthraquinones dans l'extrait chloroformique.

Les résultats obtenus lors de screening nous montrent la présence de diverses classes de métabolismes secondaires connus pour leurs activités biologiques.

III. Résultats de l'étude quantitative

Pour caractériser quantitativement les extraits préparés à partir de plante étudiée, les polyphénols totaux et les flavonoïdes et les tanins ont été dosés.

La détermination du taux des polyphénols totaux, des flavonoïdes et les tanins dans les extraits chloroforme et éthanol de l'espèce *Antirrhinum majus* par la méthode Folin-Ciocalteu et la méthode de chlorure d'aluminium et la méthode Julkunen-Titto, l'acide gallique, la quercitine et la catéchine ont été utilisées comme références pour la détermination des polyphénols et des flavonoïdes, respectivement. Les quantités sont approximées en µg/mg à l'aide de l'équation suivante [1] :

$$Teneur = \frac{C \times V}{M}$$

Où C est la concentration de la référence établie à partir de la courbe d'étalonnage (µg/ml), V le volume de la solution mère d'extrait (ml), M le poids de l'extrait dilué dans la solution mère (mg).

III.1. Dosage des polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols totaux dans les extraits d'*Antirrhinum majus*. Est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu [2].

Le tableau ci-dessous montre les résultats de la teneur en polyphénols des extraits ont été exprimées en µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait sec)

Tableau III.2 : Teneurs en polyphénols des extraits de l'espèce *Antirrhinum majus*

Extrait	Chloroforme	Ethanol
µg EAG/mg PS	30.1± 1.73	41.8± 0.25

Les valeurs sont les moyennes de trois répétitions plus ou moins l'écart-type.

D'après les résultats présentés dans le tableau (Tableau III.3), le test a révélé la présence de polyphénols dans les deux extraits. Nous observons que l'extrait éthanol affiche la teneur la plus élevée ($41.8 \pm 0.25 \mu\text{g EAG/mg PS}$) suivi par l'extrait chloroforme ($30.1 \pm 1.73 \mu\text{g EAG/mg PS}$).

Les résultats de ces études sont cohérents avec une observation récurrente selon laquelle la plus grande proportion des composés phénoliques se trouve dans les extraits polaires. Ces résultats sont résumés dans la figure suivante (Figure III.1) :

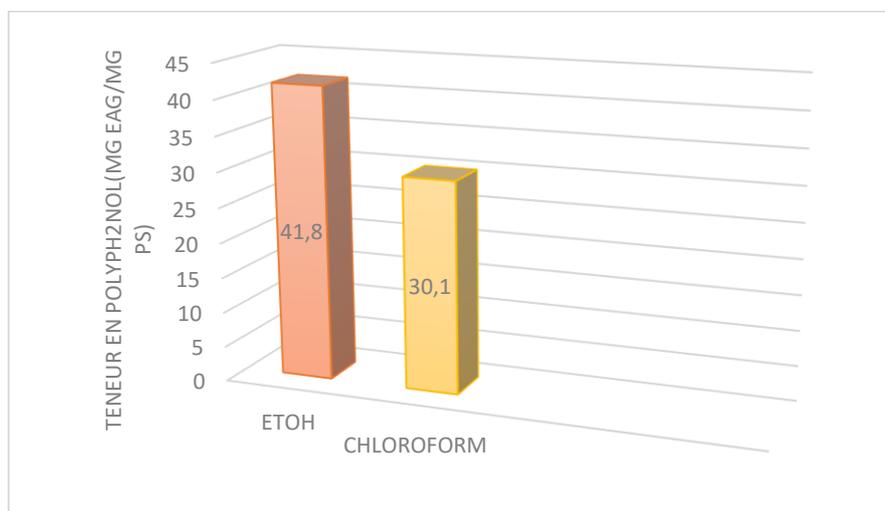


Figure III.1: Diagramme à barre représentatif des teneurs en polyphénols des extraits.

III.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont un groupe hydroxyle libre (OH) en 5^{ème} position et sont capables d'obtenir des complexes jaune pâle en chélatant les ions Al^{+3} en présence de chlorure d'aluminium. La couleur jaune résultante est directement proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents dans l'extrait [3]. Les résultats de dosage des flavonoïdes dans les échantillons des deux extraits sont rapportés dans le (tableau III.3) :

Tableau III. 3 : Teneurs en flavonoïdes dans les extraits.

Extrait	Chloroforme	Ethanol
$\mu\text{g EQ/mg PS}$	19.56 ± 1.62	22.48 ± 0.35

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits. L'extrait Ethanolique enregistre un maximum de flavonoïdes ($22.48 \pm 0.35 \mu\text{g EQ/mg PS}$) ce qui indique la richesse de cet extrait en flavonoïdes par rapport à l'extrait chloroformique qui renferme une teneur plus faible ($19.56 \pm 1.62 \mu\text{g EQ/mg PS}$). Ainsi, la concentration de flavonoïdes dans les extraits de plantes dépend de Solvants utilisés dans la préparation des extraits [4]. Les résultats du dosage des flavonoïdes sont représentés sous forme d'histogramme comme le montre la figure ont résumés dans la (figure III.2) suivant :

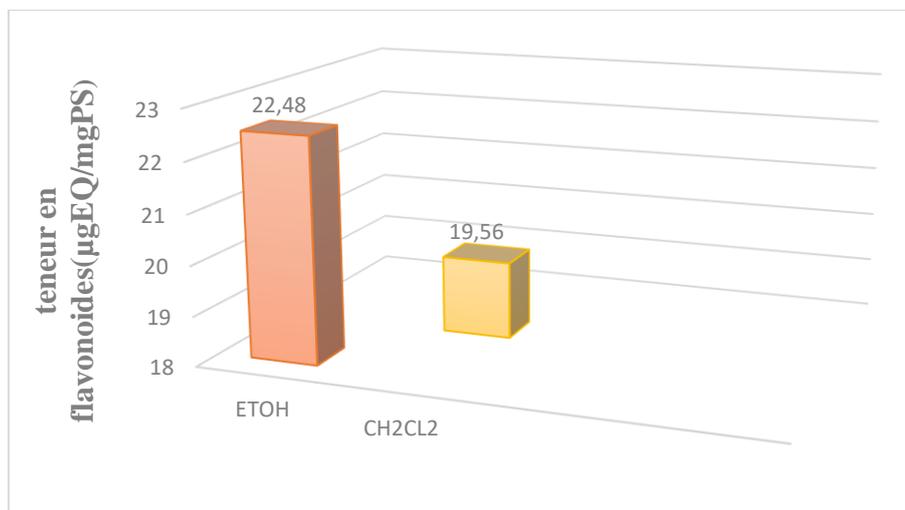


Figure III. 2 : Diagramme à barre représentatif des teneurs en flavonoïdes des extraits.

III.3. Dosage des tanins

Les tanins ont été dosés selon la méthode de Julkunen-Titto en utilisant la catéchine comme standard. Les mesures d'absorbance ont été effectuées à une longueur d'onde de 550 nm. Les résultats du dosage des tanins dans les échantillons des deux extraits sont rapportés dans le (tableau III.4) :

Tableau III.4 : Teneurs des tanins dans les extraits

Extraits	Chloroforme	Ethanol
µg EC/g PS	Non détectable	15.33 ± 0.13

D'après Les résultats de tableau l'extrait Ethanolique contient une teneur en tanins ($15.33 \pm 0.13 \mu\text{gEC/mg PS}$) par contre dans l'extrait chloroforme les tanins sont non détectable, Ce résultat est cohérent avec celui de nombreux chercheurs qui ont noté que les extraits à l'éthanol enregistraient les niveaux les plus élevés de tanins.

On peut alors conclure que l'extraction des tanins dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires. Cependant, la teneur en tanins peut également varier en raison de plusieurs facteurs, tels que : la sensibilité des tanins à de multiples voies de dégradation (oxydation, lumière, etc.), le stade de maturation des fruits, les conditions culturales et climatiques, la pression du sol ou de la prédation [5]. Les résultats du dosage des tanins sont représentés sous forme d'histogramme dans la (figure III.3).

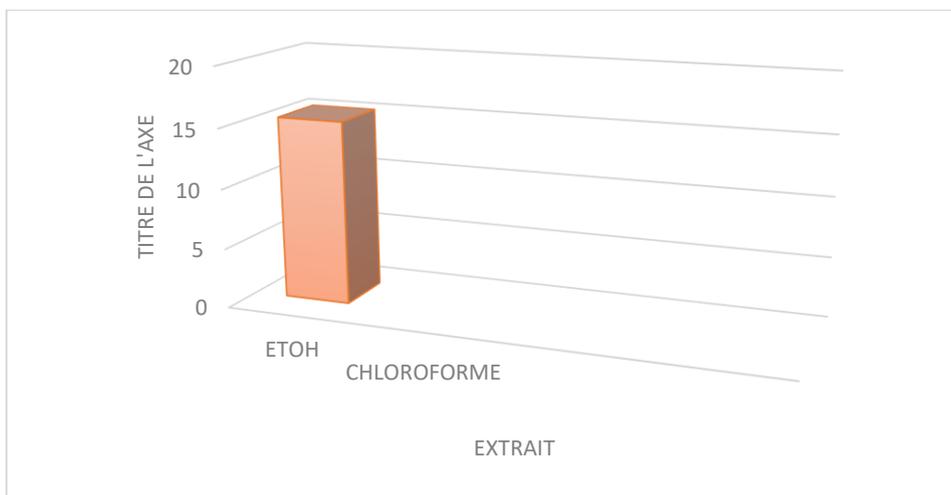


Figure III.3: Diagramme à barre représentatif des teneurs en tanins dans les extraits.

Les résultats du dosage indiquent également que la teneur en polyphénols est supérieure à celle des flavonoïdes et des tanins. Cette disparité dans les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins entre les différents extraits peut s'expliquer par le choix du solvant d'extraction, ainsi que par les conditions expérimentales du dosage.

Il est possible que le solvant d'extraction utilisé dans chaque cas ait une affinité différente pour les différents types de composés polyphénoliques. De plus, les conditions expérimentales du dosage, telles que l'utilisation du réactif de Folin pour les polyphénols, peuvent entraîner des réactions non spécifiques avec des protéines, des sucres et d'autres composés sulfurés, ce qui peut conduire à des résultats inexacts [6,7].

Il convient donc de prendre en compte ces facteurs lors de l'interprétation des résultats et de les considérer comme des sources potentielles de variation dans les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins observées dans les différents extraits.

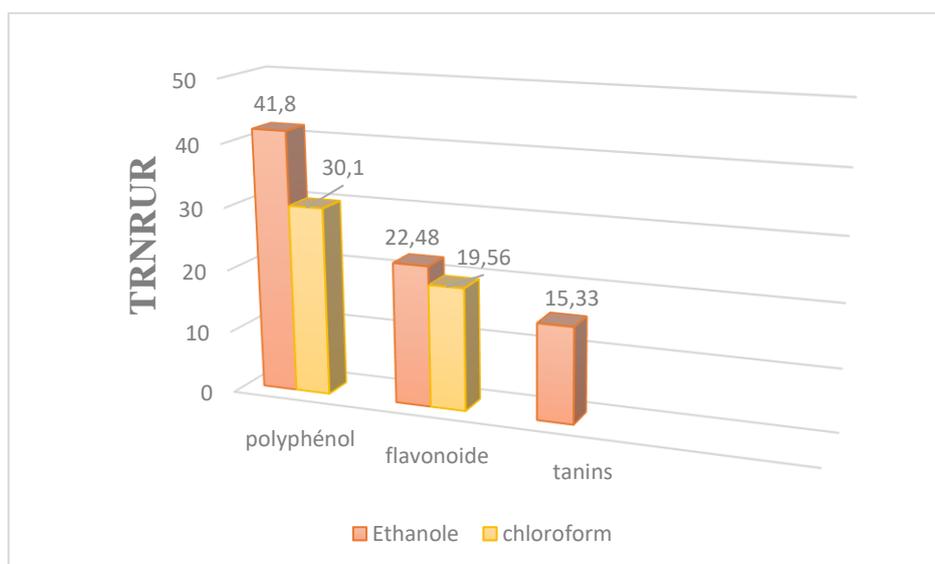


Figure III.4 : Taux des polyphénols, flavonoïdes et tanins dans les extraits.

IV. Activités biologiques *in vitro*

IV. 1. Activité antioxydante

Antirrhinum majus a été analysé pour ses propriétés antioxydantes à travers l'extrait d'éthanol. L'évaluation a été réalisée à l'aide de deux méthodes différentes : le DPPH de piégeage des radicaux libres, le test de blanchiment au β -carotène. Dans chaque méthode, des références ont été utilisées telles que l'acide ascorbique et le BHT.

IV.1.1. Piégeage de radicale libre DPPH

Pour évaluer la capacité antioxydante des extraits et de l'acide ascorbique, le test DPPH a été utilisé. Cela impliquait d'étudier dans quelle mesure ils pouvaient éliminer les radicaux libres. Les résultats obtenus, à une longueur d'onde de 517 nm par spectrophotomètre, ont été utilisés pour tracer les graphes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour l'extrait Ethanol (figure III.5). La courbe montre que notre extrait, ainsi que le standard (Acide ascorbique) (figure II.11), réduisent de manière dépendante de la dose le radical DPPH. En d'autres termes, le pourcentage de réduction augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits jusqu'à un certain seuil, où le pourcentage d'inhibition se stabilise avec l'augmentation de la concentration. Ces résultats ont également permis de déterminer la valeur de l'IC₅₀, qui correspond à la concentration nécessaire pour atteindre 50% d'inhibition. Cette valeur est utilisée pour évaluer l'activité des extraits par rapport au standard.

La valeur de concentration inhibitrice à 50 % a été obtenue en interpolant la courbe de pourcentage d'inhibition pour le DPPH dans le domaine linéaire avec la valeur % d'inhibition = 50, et la capacité antioxydante a augmenté lorsque cette valeur a diminué. Les résultats sont présentés sur la (figure III.5) en mg/ml.

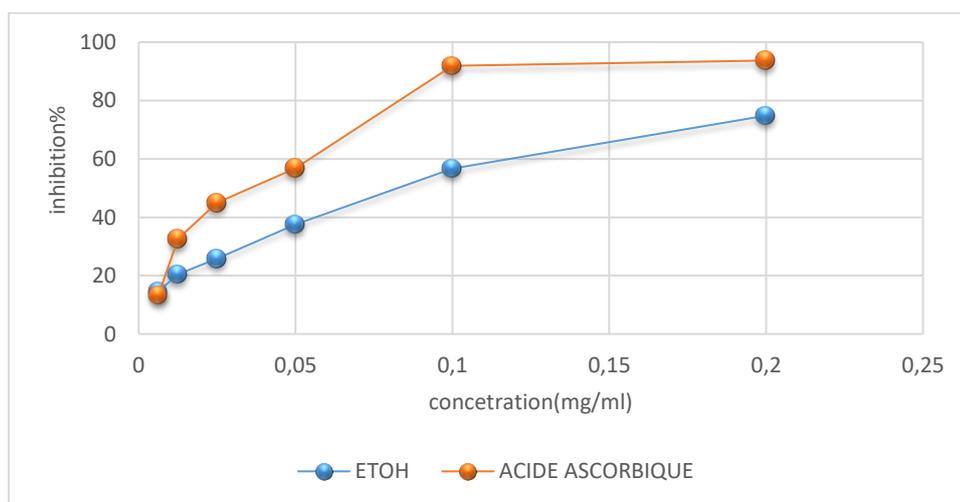


Figure III. 5 : Courbe d'inhibition % de DPPH en fonction de concentration d'extrait et acide ascorbique.

Selon les valeurs IC_{50} obtenues, l'extrait éthanol a montré une grande activité ($IC_{50}=0.08 \pm 0.082$) par rapport à l'acide ascorbique ($IC_{50}=0.04 \pm 0.01$). Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour l'activité antioxydante en raison de la présence d'un grand nombre de groupes hydroxyle qui peuvent réagir avec les radicaux libres [8,9].

De nombreuses études ont établi la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité antioxydante, et l'activité anti-radicalaire de ces molécules est essentiellement déterminée par leur structure ; les flavonoïdes les plus actifs sont ceux contenant des 3',4 flavonoïdes avec des groupements '-dihydroxy et/ou des groupes 3-OH sur le cycle C [10 ,11].

L'extrait de chloroforme n'a pas réussi à obtenir une inhibition de 50 % et a été considéré comme ayant une très faible activité antioxydante en raison de son incapacité à extraire et à dissoudre les composants actifs de la plante et a donc été retiré lors des tests ultérieurs.

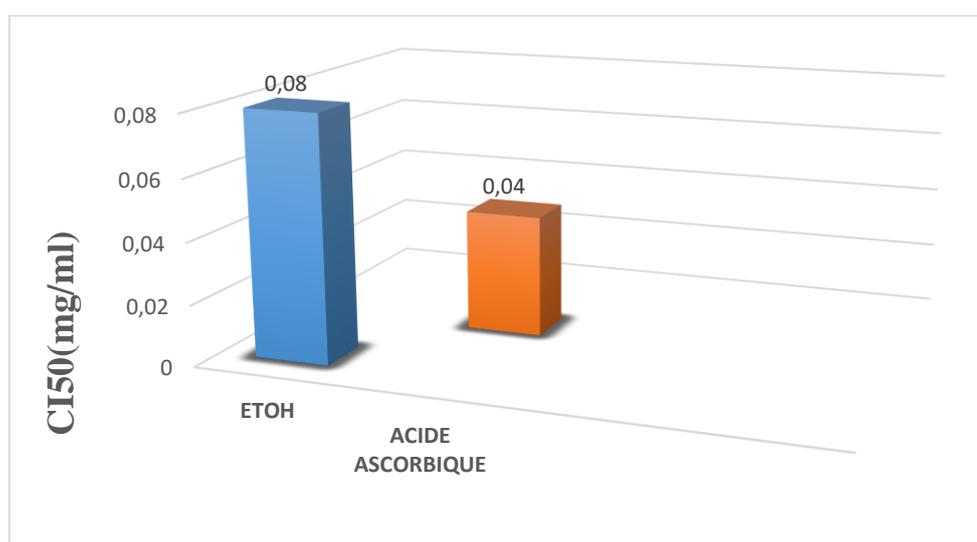


Figure III.6 : diagramme à barre représentatif des valeurs IC_{50} de l'extrait éthanolique et de référence

IV.1.2. Test des blanchissements β -carotène

L'activité antioxydante a été évaluée en suivant l'oxydation du β -carotène dans l'extrait, un contrôle négatif et du BHA comme contrôle positif, en mesurant l'absorbance à 470 nm toutes les 30 min à 2 h, [12] comme indiqué dans la (figure III.7) ci-dessous.

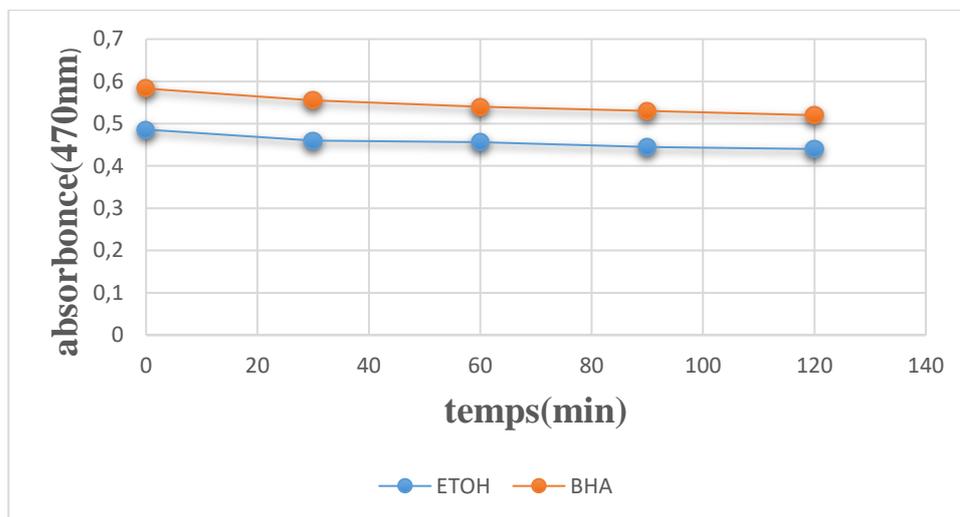


Figure III.7 : Courbe d'absorbance de β -carotène en fonction du temps de l'extrait et la référence.

Les données montrent une nette réduction de l'absorbance au fil du temps, ce qui prouve que le processus d'oxydation du β -carotène est continu et ininterrompu. Par rapport au contrôle négatif (éthanol), les niveaux d'oxydation du β -carotène sont modifiés de manière distincte lors de l'introduction d'extraits ou d'antioxydants conventionnels.

D'après Les résultats de blanchiment du β -carotène l'extraits éthanolique possède une activité antioxydante avec un % d'inhibition de (57,40%) qui représente une valeur inférieure à celle du BHA qui montre un % d'inhibition beaucoup plus important (60,28%).

Les résultats obtenus dans ce test β -carotène peuvent être dus à la solubilité différente des molécules présentes dans l'extrait et à leur répartition entre les phases aqueuse et lipidique, puisque le système utilisé pour mesurer cette activité est que les lipides sont en émulsions dans l'eau [13]. Les résultats d'activités de blanchiment de tous les extraits et du standard sont résumés dans la figure (figure III.8) suivante :

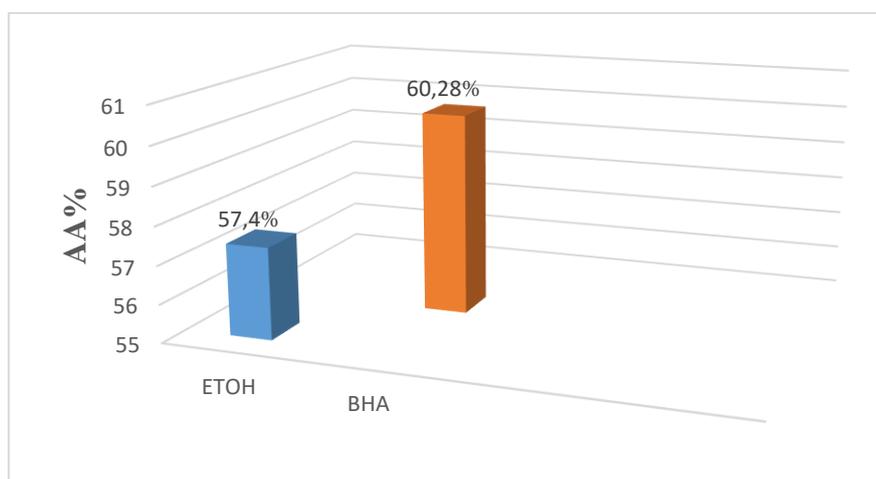


Figure III.8 : Diagramme à barre représentatif d'activité antioxydante % de l'extrait et de BHA du test β -carotène.

V. Caractérisation des extraits

V.1. Spectroscopie ultraviolet visible (UV-VIS)

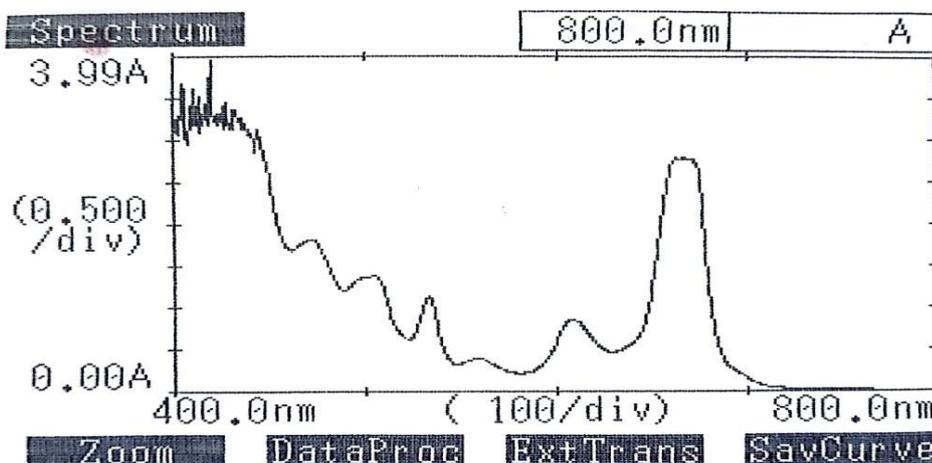


Figure III.9 : Spectre UV de l'extrait chloroforme

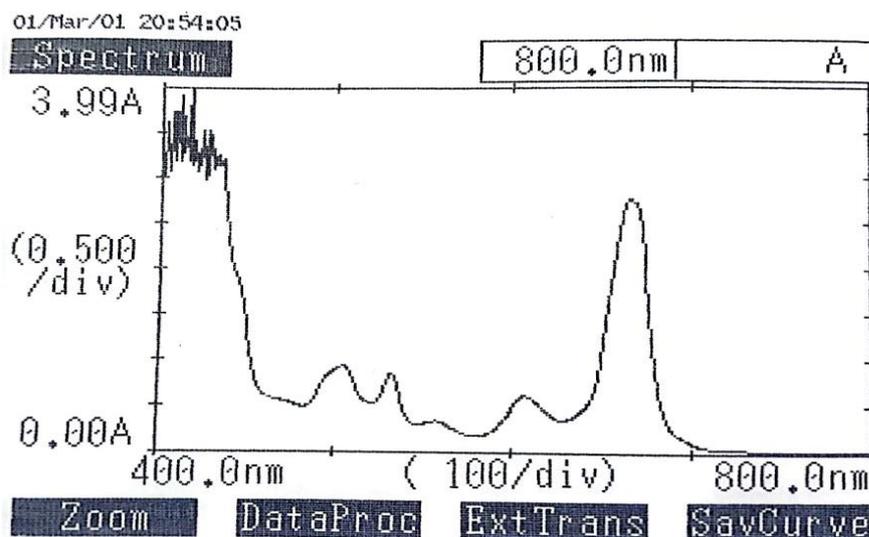


Figure III.10 : Spectre UV correspondant à l'extrait Ethanol.

VI. Evaluation de l'activité antimicrobienne

VI.1. Activité antibactérienne

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les boîtes de culture ont été récupérées afin de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition des extraits de chloroforme et d'éthanol contre les cinq souches bactériennes testées : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella aboney* et *Bacillus subtilis*. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau III.5).

Tableau III.5 : Zones d'inhibition des extraits dans cinq souches bactériennes.

Extrait	Zone d'inhibition (mm)				
	<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	<i>Bacillus cereus</i> ATCC6633	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	<i>Salmonella aboney</i> ATCC6017
Chloroforme	-	-	-	10	9
Ethanol	-	-	-	13	10
Gentamicine (témoin +)	24	27	29	26	25
DMSO (témoin -)	-	-	-	-	-

Les résultats présentés dans le (Tableau III.6) démontrent que les extraits chloroformique et éthanolique ont des activités antibactériennes variables contre les différentes souches de micro-organismes testées.

L'extrait chloroformique montre une activité contre les souches bactériennes *Salmonella aboney* et *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres d'inhibition de 9 mm et 10 mm respectivement. Cependant, il ne présente aucune activité contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*.

L'extrait éthanolique présente une activité antibactérienne contre *Salmonella aboney* et *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres d'inhibition de 10 mm et 13 mm respectivement. Cependant, il n'a pas d'activité contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*. Ces résultats indiquent que les extraits étudiés ont une efficacité variable contre les souches bactériennes testées, suggérant des différences dans leur activité antibactérienne spécifique.

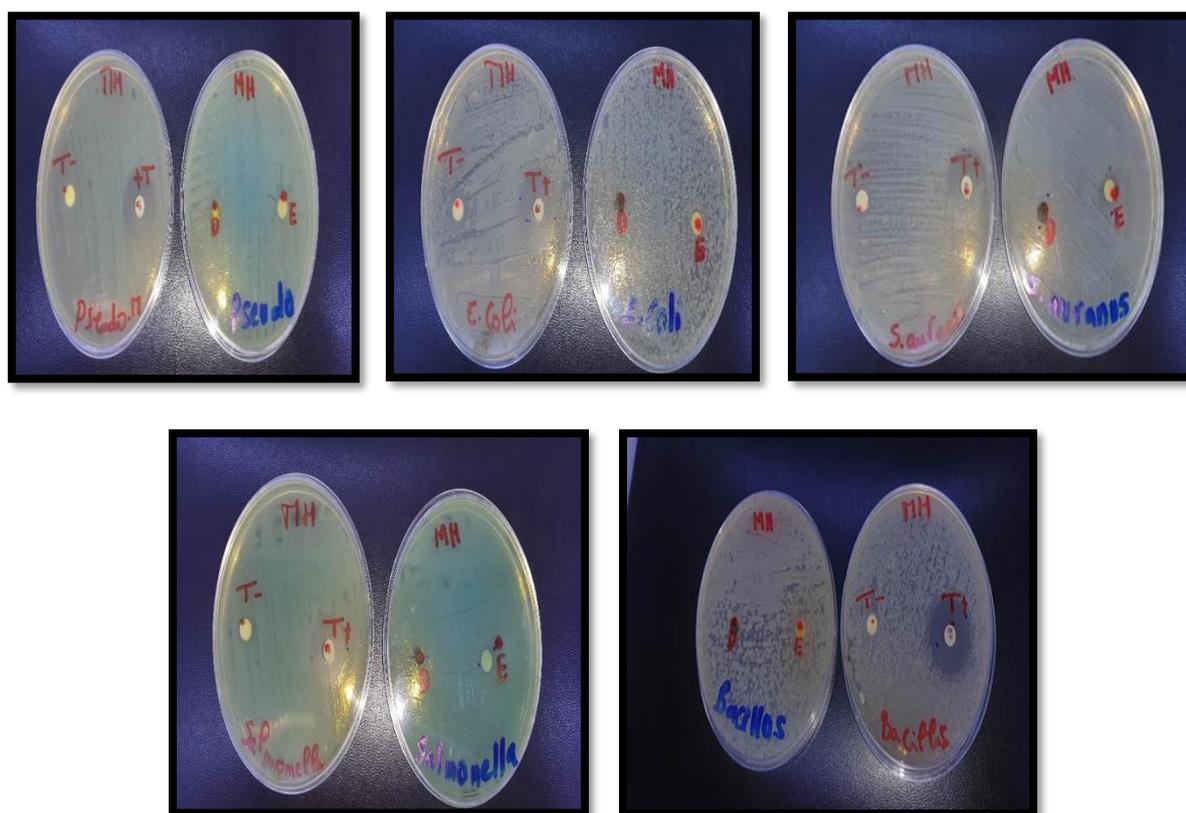


Figure III. 11 : Résultats des tests d'activité antibactérienne des extraits chloroformique et éthanolique.

D'après ces résultats, on peut constater que les souches *Salmonella aboney* et *Staphylococcus aureus* sont sensibles aux extraits testés, comme en témoigne la présence de zones d'inhibition autour des disques contenant les extraits chloroformique et éthanolique.

En revanche, les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* se révèlent être très résistantes, étant donné l'absence de zones d'inhibition autour des disques.

Ces observations suggèrent une sensibilité variable des différentes souches bactériennes aux extraits testés, soulignant la nécessité de considérer leur potentiel antibactérien spécifique pour chaque souche.

VI.2. Activité antifongique

Après 24 heures d'incubation à 25°C, les boîtes de Petri contenant les échantillons malaxés ont été récupérées afin de mesurer les diamètres des zones d'inhibition des extraits chloroformique et éthanolique contre les deux champignons testés : *Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans*. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant (Tableau III.6).

Tableau III.6 : Zones d'inhibition des extraits dans deux champignons.

Extrait	Zone d'inhibition	
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC16404	<i>Candida albicans</i> ATCC10231
Ethanol	-	-
Chloroforme	-	-
Témoin+ (Econazole)	36	29
Témoin-(DMSO)	-	-



Figure III.12 : Résultats des tests d'activité antifongique (extraits chloroformique et éthanolique) Les résultats indiquent une résistance notable des champignons *Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans* aux extraits chloroformiques et éthanoliques, comme le montre l'absence de zones d'inhibition autour des disques, contrairement au témoin.

VII. Conclusion

Les résultats obtenus à partir du dosage des composés phénoliques totaux ne permettent pas de déterminer précisément les concentrations de ces composés dans les extraits, en raison de l'interaction potentielle du réactif de Folin-Ciocalteu avec d'autres composants présents dans les échantillons. Ce réactif peut réagir avec des acides aminés aromatiques, tels que le tryptophane, des glucides réducteurs tels que le glucose et le fructose, ainsi que la vitamine C, ce qui peut entraîner des interférences.

La teneur en molécules bioactives peut varier en fonction de plusieurs facteurs pendant la croissance de la plante, tels que la salinité, la sécheresse et l'exposition solaire, qui peuvent influencer la biosynthèse des métabolites secondaires. De plus, selon une étude menée par Wojdylo et al. [14], la méthode d'extraction peut également affecter la teneur en composés phénoliques. Les résultats obtenus dans cette étude montrent une corrélation significative entre l'activité antiradicalaire et le taux de polyphénols. Des études antérieures ont également démontré que les espèces du genre *Ononis* sont d'importantes sources de composés phénoliques présentant une activité antioxydante significative.

Références bibliographiques

- [1] Nickavar, Bahman, and Naser Esbati. "Evaluation of the Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Three Thymus Species." *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, V. 5, (2012), 119-125.
- [2] Georgé, S., et al., Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 2005. 53(5): p.1370-1373.
- [3] Ribéreau-Gayon, P., *Les composés phénoliques des végétaux*, Dunod, ed. 1968, Paris.
- [4] Stanković MS (2011) Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L extracts. *Kragujevac J Sci* 33: 63–72.
- [5] Mahmoudi, S., M. Khali, and N. Mahmoudi, Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, 2013(9): p.35.
- [6] Singleton V.L., Rossi J.A. "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." *American journal of Enology and Viticulture*, V. 16, (1965), 144-158.
- [7] Musci M., Yao S. "Optimization and validation of Folin–Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea." *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. V. 68, (2017), 913-918.
- [8] Sengul, M., et al., Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009.22(1).
- [9] Zhang, L., et al., Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011. 59(23): p. 12361-12367.
- [10] Marfak, A., *Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides*. 2003, Thèse de Doctorat. Faculté de Pharmacie, Université de Limoges.
- [11] Sokół-Łętowska, A., J. Oszmiański, and A. Wojdyło, Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, 2007. 103(3): p.853-859.
- [12] Ismail, Amin Jr, and Siewhong Tan. "Antioxidant activity of selected commercial seaweeds." *Malaysian journal of nutrition* vol. 8 (2002): 167-177. [14]. Granger M., Eck, P. "Dietary Vitamin C in Human Health." *Advances in food and nutrition research*, V. 83, (2018), 281-310.
- [13] Chedad N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkan, M.C., Bousselsela, H., Mokhtar, S.M., Polyphénols Toutaux, Activités Antioxydant Et Antimicrobienne Des Extraits Des Feuilles De *Marrubium deserti* De Néo, *Phytothérapie*, (2015), V.13,118-129.
- [14] Wojdyło, A., J. Oszmiański, and R. Czemerys, Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 2007. 105(3): p.940-949.

Conclusion générale

Les plantes médicinales continuent d'être une source fiable de principes actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques. Dans ce travail, nous nous sommes concentrés sur l'étude phytochimique et biologique de l'espèce *Antirrhinum majus* appartenant à la famille des Plantaginaceae.

Les résultats de notre screening ont révélé la présence de différentes classes de métabolites secondaires connus pour leurs activités biologiques dans l'espèce étudiée. Parmi ceux-ci, nous avons identifié la présence de flavan-3,4-diols et de flavonols, ainsi que des tanins catéchiques dans l'extrait hydroalcoolique. Dans l'extrait aqueux, les saponosides étaient les métabolites les plus abondants. De plus, des alcaloïdes ont également été détectés. Ces résultats indiquent la richesse de l'espèce étudiée en termes de composés chimiques bénéfiques sur le plan thérapeutique.

Les extraits chloroforme et éthanol ont été analysés pour quantifier les polyphénols totaux et les flavonoïdes. Les résultats ont révélé la présence de polyphénols dans les deux extraits. L'extrait éthanol a montré la teneur la plus élevée en polyphénols ($41.8 \pm 0.25 \mu\text{g EAG/mg PS}$), suivi de près par l'extrait chloroforme ($30.1 \pm 1.73 \mu\text{g EAG/mg PS}$). Les teneurs en flavonoïdes totaux variaient considérablement entre les deux extraits. L'extrait éthanolique présentait la plus grande quantité de flavonoïdes ($22.48 \pm 0.35 \mu\text{g EQ/mg PS}$), indiquant sa richesse en flavonoïdes par rapport à l'extrait chloroformique, qui avait une teneur plus faible ($19.56 \pm 1.62 \mu\text{g EQ/mg PS}$). L'extrait éthanolique contenait également des tanins ($15.33 \pm 0.13 \mu\text{g EC/mg PS}$), tandis que les tanins étaient indétectables dans l'extrait chloroforme. Ce résultat est cohérent avec les études antérieures qui ont montré que les extraits éthanoliques présentaient les niveaux les plus élevés de tanins.

Les résultats ont également indiqué que la teneur en polyphénols était supérieure à celle des flavonoïdes et des tanins. Cette disparité dans les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins entre les deux extraits peut s'expliquer par le choix des solvants d'extraction et les conditions expérimentales utilisées pour le dosage.

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée à l'aide de deux méthodes : le test de réduction du radical libre DPPH et le test de blanchiment du β -carotène. Selon les valeurs d'IC₅₀ obtenues, l'extrait éthanolique a montré une forte activité antioxydante (IC₅₀ = 0.08 ± 0.082), bien que légèrement inférieure à celle de l'acide ascorbique (IC₅₀ = 0.04 ± 0.01). Les composés phénoliques présents dans les extraits semblent être de bons candidats pour l'activité antioxydante en raison de la présence de nombreux groupes hydroxyle capables de réagir avec les radicaux libres. En ce qui concerne le test de blanchiment du β -carotène, l'extrait éthanolique a montré une activité antioxydante avec un pourcentage d'inhibition de 57.40%, qui était inférieur à celui du BHA (60.28%), qui a montré un pourcentage d'inhibition plus élevé.

En ce qui concerne les tests d'activité antimicrobienne, les souches de *Salmonella aboney* et *Staphylococcus aureus* se sont révélées sensibles aux extraits chloroformique et éthanolique, comme en témoigne la présence de zones d'inhibition autour des disques contenant ces extraits. En revanche, les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* se sont révélées très résistantes, car aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des disques. Les champignons *Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans* ont également montré une résistance notable aux extraits chloroformique et éthanolique, comme en témoigne l'absence de zones d'inhibition autour des disques, contrairement au témoin.