

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

Zahi Mohamed Réda

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine Science de la matière
Filière Chimie
Option **Chimie des substances naturelles**

Titre

**Contribution à l'étude chimique de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva*
subsp pseudoiva
Tests d'activités Biologiques**

Soutenue le 08 juin 2011, devant le jury composé de :

Y. DAGHBOUCHE	Pr.	Président	Université de Blida
A. BADIS	MCA.	Examineur	Université de Blida
M. BRADA	MCA.	Examineur	C/U Khemis-Miliana
M. EL HATTAB	MCA.	Promoteur	Université de Blida

REMERCIEMENTS

On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination. Les deux ans de maîtrise m'ont permis de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple. Ce parcours, en effet, ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.

Je tiens d'abord à remercier ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la foi et de m'avoir permis d'en arriver là.

Je voudrais remercier Monsieur le responsable du master de chimie des produits naturels, EL HATTAB MOHAMED, maître de Conférences au département de chimie, Université Saad Dahlab de Blida, d'avoir accepté de m'encadrer, et de me prodiguer des conseils oh ! Oui bien précieux, durant toute la période de ce travail. Qu'il trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.

Je remercie Mme AZROU SIHAM, chef de service du Laboratoire Central de l'Établissement Public Hospitalier de Boufarik et toute son équipe pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire, ainsi que pour ses aides et ses conseils

Mes Sincères remerciements vont aux membres du jury

Mes grands remerciements sont formulés à tous les enseignants de la faculté des sciences.

A Toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je remercie mes collègues et mes amis pour les moments sympatiques qu'on a passés ensemble.

Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes parents. Qu'ils trouvent
ici ma plus profonde gratitude et tout mon
amour pour leur soutien tout au long de mes
études.*

A mes deux sœurs :

Narimane et Mélissa

A mes oncles, tantes, cousins et cousines

Sans oublier mes amis et collègues.

Et toute la promo 2010/2011.

Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Ajuga Iva subsp pseudoiva*, et la détermination de son activité antimicrobienne.

L'extraction de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva Subsp pseudoiva* a été effectuée par entraînement à la vapeur d'eau. L'huile essentielle obtenue a été ensuite analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Vingt quatre constituants ont été identifiés dont les composés majoritaires sont :

le Phytol (16, 96%), le 1-Allyl-2, 3-dimethoxy-4, le 5-methylenedioxybenze (9.98%), le 2-Methoxy-4-vinylphenol (9.96%), le 4-methyl-3-Penten-2-one (6.52%).

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a été également testée sur cinq souches Bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoneae*, *Proteus mirabilis* et la levure *Candida albicans* par la méthode de diffusion sur la Gélose et par détermination des zones d'inhibitions. Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle possède un bon pouvoir antimicrobien vis-à-vis de ces souches.

Mots clés: *Ajuga Iva subsp pseudoiva*, huile essentielle, composition chimique, activité antimicrobienne.

Abstract

The objective of this work is the chemical study of the essential oil of *Ajuga Iva subsp pseudoiva* species, and determination of its antimicrobial activity.

The extraction of essential oil of *Ajuga Iva Subsp pseudoiva* was carried out by steam distillation. The essential oil obtained was then analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS). Twenty-four constituents were identified whose major components are: the phytol (16.96%), the 1-Allyl-2, 3-dimethoxy-4, 5-methylenedioxybenzene (9.98%), the 2-methoxy-4-vinylphenol (9.96%), the 4-methyl-3-penten-2-one (6.52%). The antimicrobial activity of the essential oil was also tested on five bacterial strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and the yeast *Candida albicans* by the diffusion method on gélose and by determining the inhibition zone. The obtained results showed that the essential oil possesses a good antimicrobial power towards these strains.

Keywords: *Ajuga Iva subsp pseudoiva*, Essential oil, antimicrobial activity, Chemical components.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو الدراسة الكيميائية للزيوت الطبيعية للنبته *أجيقا إيفا السلاله بسودو إيفا* ، وتحدد نشاطها المضاد للميكروبات .

تم استخراج الزيت العطري من النبته *أجيقا إيفا السلاله بسودو إيفا* باستعمال طريقة تمرير بخار الماء و تقطيره .

تم تحليل الزيت العطرية المتحصل عن طريق الكروماتوغرافيا الطور الغازي مع مطيافية الكتلة .

أظهر هذا التحليل أن الزيت العطرية تتكون أساسا من الفيتول (16,96 %) ، 1- أليل 3،2 - ديميتوكسي - 4،5 - ميثيلان

ديوكسي بنزين (9,98 %) ، 2- ميتوكسي 4- فينيل فينول (9,96%) و 4- ميثيل 3- بنتن - 2- أون (6,52 %) .

تم إختبار النشاط المضاد للميكروبات للزيت العطرية على 5 سلالات بكتيرية : إيشيريشيا كولي، بسودومونا إيريجينوزا،

ستا فيلوكوكيس أوريوس، كلبيسيلا بنومانيا و بروتئوس ميرابيليس، و الخميرة كونديدا أليبيكا نيس ، من خلال نشرها على

الجيلوز وتحدد مناطق التثبيط .

أثبتت النتائج المتحصل عليها أن الزيت العطرية تملك قوة جيدة تجاه مضادات الميكروبات في مواجهة هذه

السلالات .

الكلمات المفتاحية : *أجيقا إيفا السلاله بسودو إيفا* ، الزيوت الأساسية، المكونات الكيميائية، مضادات الميكروبات .

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection

° C : Degrés Celsius

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

HE : Huile (s) Essentielle (s)

mm : Millimètre

MH : Muller Hinton

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS : Organisation mondiale de la santé

Subsp : Subspecies

PF : Point de fusion

Liste des tableaux

Tableau 1: Espèces appartenant au genre <i>Ajuga</i> et leurs localisations	4
Tableau 2 : Ecdystéroïdes isolés à partir des espèces du genre <i>Ajuga</i> ainsi que leurs propriétés physiques.....	7
Tableau 3: Withanolides isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i> ainsi que leurs propriétés physiques.....	9
Tableau 4 : Diterpènes de type neoclerodane isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i> et leurs propriétés physiques.....	11
Tableau 5 : Iridoïdes glucosidiques isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i>	15
Tableau 6 : Anthcyanines glucosidiques isolés des espèces du genre <i>Ajuga</i>	17
Tableau 7 : Propriétés organoléptiques de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i>	30
Tableau 8 : Produits identifiés dans l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i>	30
Tableau 9 : Les différents micro-organismes pathogènes utilisés dans notre étude.....	34
Tableau 10 : Les souches de références utilisées dans notre étude.....	35
Tableau 11 : Les milieux de cultures utilisés dans notre étude.....	35
Tableau 12 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle sur les souches pathogènes.....	38
Tableau 13 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle sur les souches de références.....	41
Tableau 14 : Activité antifongique de l'huile essentielle sur la souche pathogène <i>Candida albicans</i>	43

Liste des Figures

Figure 1 : Structure de base des ecdystéroïdes.....	5
Figure 2 : Structure de base des Whitanolides	6
Figure 3 : Noyau clerodane	10
Figure 4 : Squelette iridane	14
Figure 5: Structure de l'Ajugaside A	15
Figure 6 : Structure d'anthocyane	16
Figure 7 : Photos d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i>	22
Figure 8 : Situation géographique de la région de récolte (Damous)	23
Figure 9 : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i>	27
Figure 10 : La teneur en humidité de la plante <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i>	29
Figure 11 : Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i>	32
Figure 12 : : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> contre l' <i>Escherichia coli</i>	38
Figure 13 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> contre la <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
Figure 14 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> contre la <i>Proteus mirabilis</i>	39
Figure 15 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> contre la <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Figure 16 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> contre la <i>Klebsiella pneumoneae</i>	39
Figure 17 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> sur les différentes souches bactériennes pathogènes testées.	40
Figure 18 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> contre l' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	42

Figure 19 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> contre la <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	42
Figure 20 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> contre la <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	42
Figure 21 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> sur les différentes souches d'ATCC	43
Figure 22 : Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>ajuga iva subsp pseudoiva</i> contre la <i>Candida albicans</i>	44
Figure 23 : Représentation graphique du diamètre de la zone d'inhibition (en mm) de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> sur la levure pathogène <i>Candida albicans</i>	44

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique	
Introduction	2
I. Systématique et taxonomie du genre <i>Ajuga</i>	3
I.1 Position systématique du genre <i>Ajuga</i>	3
I.2 Localisation et distribution des espèces appartenant au genre <i>Ajuga</i>	4
I.3 Étude chimique des espèces du genre <i>Ajuga</i>	5
I.3.1 Les stéroïdes	5
I.3.1.1 Ecdystéroïdes	5
I.3.1.2 Whitanolides	6
I.3.2 Les terpènes	10
I.3.2.1 Diterpènes neoClerodanes.....	10
I.3.2.2 Les iridoïdes.....	14
I.3.2.3 Diterpènes glucosidiques	15
I.3.3 Les flavonoïdes	16
I.3.3.1 Les anthocyanines.....	16
I.4 Activités Biologiques des espèces du genre <i>Ajuga</i>	18
I.4.1 Activité antimicrobienne et antioxydante	18
I.4.2 Activité insecticide.....	18
I.4.3 Activité hypoglycémique et autres.....	18
I.4.4 Activité anti-inflammatoire.....	18
I.4.5 Activité cytotoxique.....	19
I.4.6 Activité agoniste et antagoniste	19
I.4.7 Activité antifongique	19

I.4.8 Étude de la toxicologie.....	19
I.4.9 Activité anthelminthique.....	19
I.4.10 Activité anti-appétissante.....	19

Chapitre II: Étude chimique de l'espèce *Ajuga Iva subsp pseudoiva*

Introduction.....	20
II. Matériel végétal.....	20
II.1 Choix du matériel végétal.....	20
II.2 Position systématique de l'espèce <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i>	21
II.3 Description botanique.....	21
II.4 Présentation et situation de la zone d'étude.....	23
II.4.1 Localisation géographique.....	23
II.4.2 Milieu physique.....	24
II.4.2.1 La géomorphologie.....	24
II.4.2.2 Données climatiques.....	24
II.4.2.3 L'hydrogéologie.....	24
II.5 Conservation.....	25
II.6 Détermination du taux d'humidité.....	25
II.7 Extraction et analyse de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i>	25
II.7.1 Principe de l'extraction par entrainement à la vapeur d'eau.....	25
II.7.2 Procédé d'extraction.....	25
II.7.2.1 Traitement et récupération de l'huile essentielle.....	26
II.8 Calcul du rendement.....	26
II.9 Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	28
II.9.1 Conditions opératoires.....	28
II.10 Résultats et discussion de l'étude chimique.....	29
II.10.1 Taux d'humidité.....	29

II.10.2 Propriétés caractéristiques de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i>	29
II.10.3 Rendement en huile essentielle.....	30
II.10.4 Identification de la composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i> par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	30
II.10.4.1 Discussion de la composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Ajuga Iva subsp pseudoiva</i>	33

Chpaitre III: Activités antimicrobiennes

III.1 Tests d'activités antimicrobiennes	34
III.1.1 Lieu de travail.....	34
III.1.2. Matériel microbien	34
III.1.2.1 Milieux de cultures.....	35
III.2 Étude qualitative de l'effet antibactérien et antifongique de l'huile essentielle par la méthode de diffusion sur milieu solide « méthode de Vincent »	36
III.2.1 Principe.....	36
III.2.2 Technique.....	36
III.3 Résultats et discussion des tests d'activités antibactérienne et antifongique	38
III.3.1 Résultats	38
III.3.2 Discussion	45
Conclusion.....	46

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Introduction

Les huiles essentielles ont, à toute époque, occupé une place importante dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes.

La vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle [1].

Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes se sont développés, notamment par les civilisations arabe et égyptienne, qui leur attribuent, avant tout, un usage religieux [2]. Progressivement, ces huiles essentielles se sont faites connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants des médecines traditionnelles.

L'Algérie est riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes ou encore pouvant être utilisées comme source d'isolats pour les hémi-synthèses [3]. Ces plantes aromatiques sont donc à l'origine des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines...) qui se présentent presque toujours comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation. Les techniques d'analyse à la disposition de l'expérimentateur d'aujourd'hui, permettent, dans la grande majorité des cas, de réaliser ce travail de routine. Cependant, l'identification de certains constituants, est parfois délicate et l'utilisation de plusieurs méthodes d'analyse complémentaires s'avère non seulement utile mais nécessaire. Les huiles essentielles, préparées par hydro distillation du matériel végétal, en sont une bonne illustration. [4].

Le genre *Ajuga* appartient à l'une des familles les plus importantes du règne végétal, qui est la famille des lamiacées. Il a fait l'objet de plusieurs études à cause des propriétés thérapeutiques de la majorité des espèces appartenant à ce genre.

Notre travail entre dans ce cadre et porte sur l'étude chimique de l'HE d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* issue de la région de Damous (wilaya de tipaza), il est réparti en trois chapitres:

- Synthèse bibliographique sur les espèces appartenant au genre *Ajuga*.
- Étude chimique de l'espèce *Ajuga Iva subsp pseudoiva*.
- Tests d'activités antimicrobiennes.

Chapitre I:

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Introduction

Ajuga dérive du mot latin : *a* (privatif) et *jugum*, joug = corolle sans lèvre supérieure développée. En allemand : Günsel, en anglais : bugle, en italien : bugula.

Les plantes du genre *Ajuga* ont fait l'objet d'intérêt pour de nombreuses raisons et spécialement pour leurs vertus médicinales. Ces dernières sont utilisées en médecine populaire africaine et asiatique [5], elles trouvent divers utilisations médicinales dans le système autochtone de la médecine [6], elles sont très répandues à travers le monde [7], ce qui explique les nombreuses études qui leur sont consacrées.

Ces espèces présentent une importance médicinale et économique [8], elles sont utilisées comme agents diurétiques [5,9], anthelminthique [10], anti-tumorale [8,10], comme remède contre la fièvre [5, 9, 11, 12], contre les maux de dents et contre la dysenterie et l'hypertension [5, 9, 12], comme astringent pour les plaies gonflées [13], comme fébrifuge pour le mal d'estomac [13], la diarrhée [8, 11, 13], la fièvre rhumatismale [8, 13], les piqûres d'insectes [11, 13], les troubles oculaires [11, 13] ainsi que les maladies de la vessie [11, 13], elles sont aussi utilisées comme analgésique, pour dissoudre les caillots de sang [11], ainsi que pour le traitement des maux de gorge, l'inflammation et les maladies infectieuses, le diabète, et la gastrologie [12]. Dans la médecine populaire, elles sont employées dans le traitement de l'asthme et la malaria [8].

Les feuilles, les tiges et les graines sont officinales. Le jus de feuilles fraîches est enduit sur les brûlures, les coupures et des tumeurs, et appliqué comme des fomentations chaudes contre les cancers [11].

Le genre *Ajuga* a montré un large spectre des activités biologiques et pharmacologique, il présente des activités antifongique [5,10], antibactérienne [5,8], antimicrobienne [5,10], antihypertenseur [5], anti-plasmodial [5], hypoglycémique [5, 10] et anti-appétissant pour les larves et les insectes [5, 12].

Beaucoup d'études sur les espèces du genre *Ajuga* ont montré la présence de composés actifs tels que les stérols glucosidiques qui sont anti-leucémiques, des ecdystéroïdes qui présentent un effet hypoglycémique, des diterpènes néo-clerodanes qui sont antibactériens [5] et d'autres composés qui ont un effet cardiotonique, stimulant, et/ou utilisés comme antidote pour les toxicités hépatiques [5].

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I. Systématique et taxonomie du genre *Ajuga*

Le genre *Ajuga* appartient à l'ordre des *Lamiales*. Il est constitué de plantes dicotylédones. Il comprend environ 20 familles et plus de 17800 espèces [14]. Parmi ses principales familles, on distingue les *Lamiacées* (du genre *Lanium*, Lamier).

Ces dernières sont des plantes herbacées, des sous-arbrisseaux [15], très rarement des arbres (*Hyptis*) [16], cosmopolites [14]. Elles présentent une grande diversité. On peut distinguer de nombreuses espèces économiques importantes par leurs huiles essentielles ou par leur usage condimentaire. Cette famille se caractérise par une structure bilabiée de la fleur (d'où le nom donné par les premiers botanistes *Labiée*) [15] et une section carrée de la tige qui en font d'elle une famille homogène (une labiée est extrêmement facile à reconnaître) [14].

La famille des *Lamiacées* compte plus de 7200 espèces à travers environ 240 genres, qui sont classées en sept sous-familles: *Ajugoideae* Kostel, *Lamioideae* Harley, *Nepetoideae* (Dumort.) Luerss., *Prostantheroideae* Luerss., *Scutellarioideae* (Dumort.) Caruel, *Symphorematoideae* Briq et *Viticoideae* Briq. [17].

Parmi ces sous-familles, on distingue les *Ajugoideae* qui sont considérées comme monophylétiques en raison de leurs drupes à quatre noyaux, de leur style caduc et des grains de pollen à columelles de l'exine ramifiées à granulaires. Ce clade renferme : *Clerdendrum*, *Teucrium*, *Trichostema*, *Ajuga* et les genres apparentés [15].

Les plantes de ce genre sont surtout caractérisées par la corolle dont la lèvre supérieure est à peine développée, très courte et plus ou moins échancrée au sommet : la lèvre inférieure de la corolle est assez allongée et divisée en trois lobes dont le médian est en forme de cœur renversé. Le calice est à 5 dents. Le tube de la corolle est pourvu en dedans d'un anneau en poils. Les 4 étamines ont leurs filets parallèles et font saillie au dessous de la courte lèvre supérieure ; les anthères ont leurs deux loges écartées l'une de l'autre à angle droit. Les 4 parties du fruit sont arrondies au sommet, sans poils, à surface ridée en réseau. Ce sont des plantes plus ou moins poilues, à fleurs bleues, bleuâtres, purpurines, rosées, jaunes, rarement blanches [18].

I.1 Position systématique du genre *Ajuga*

Phylum : Plantae

Embranchement : spermaphyte

Sous/ Embranchement : angiospermes

Ordre: lamiales

Famille: *lamiaceae*

Genre: *Ajuga*

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I.2 Localisation et distribution des espèces appartenant au genre *Ajuga*

Plus de 100 espèces, incluant 50 variétés et sous espèces du genre *Ajuga*, sont inégalement distribuées dans le monde entier [7]. À travers notre recherche bibliographique, nous avons répertorié les espèces citées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Espèces appartenant au genre *Ajuga* et leurs localisations

Ordre	Famille	Genre	Espèces	Localisation	Référence
Lamiales	Lamiaceae	<i>Ajuga</i>	<i>A. bracteosa</i>	Pakistan, inde	[11, 37]
			<i>A. chamaepitys</i>	Turquie (Anatolie), sud de la Bretagne, autres partie de l'Europe (France), Afrique, Moyen-Orient, Asie de l'Est, Hawaï, Espagne.	[26, 27]
			<i>A. chia</i>	Liban, Jordanie, Amman, Eurasie	[42, 27, 30]
			<i>A. decumbens</i>	Chine, Japon	[20, 43, 44]
			<i>A. iva</i>	Région méditerranéenne, Nord de l'Afrique (Algérie, Maroc)	[18, 5, 9, 36, 19, 34, 45, 31, 46, 35]
			<i>A. lupulina</i>	Chine,	[62,47]
			<i>A. macrosperma</i>	Inde	[41]
			<i>A. nipponsis makkino</i>	Chine, Japon, Corée, Taiwan	[48,27]
			<i>A. parviflora</i>	Pakistan,	[6, 10, 49, 50]
			<i>A. pseudoiva</i>	Tunisie,	[51, 52]
			<i>A. pyramidalis</i>	USA	[53, 54]
			<i>A. relictata</i>	Turquie	[55]
			<i>A. remota</i>	Kenya	[56, 57, 32, 40]
			<i>A. reptans</i>	Europe (Grande-Bretagne, Pays de Galles, Espagne, République tchèque, le nord de l'Amérique, l'ouest de l'Asie, le nord africain, Europe Méditerranée, la Turquie, l'Asie Mineure, l'Afrique du l'Iran, Hawaï, la Corée	[27, 28, 58, 59]
			<i>A. salicifolia</i>	Turquie	[7]
<i>A. turkestanica</i>	Ouzbékistan,	[21]			

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I.3 Étude chimique des espèces du genre *Ajuga*

Plusieurs travaux de recherche ont été menés sur de nombreuses espèces du genre *Ajuga*. Elles portent sur l'étude chimique et celle de l'activité biologique.

L'étude chimique des espèces du genre *Ajuga* a permis l'isolement des diterpènes neo-clerodane [19, 20], des ecdystéroïdes [20], des iridoïdes glucosilés [19,20] et des withanolides [19]. Les trois premières classes sont potentiellement bioactives. Elles ont montré une activité chemo-préventive contre le cancer [21]. Concernant les huiles essentielles nous avons constaté à travers notre recherche bibliographique l'absence de travaux dans ce sens.

Les principaux métabolites concernent : les stéroïdes, les terpénoïdes, les flavonoïdes, les dérivés de la quinone et les composés glucosidiques.

I.3.1 Les stéroïdes

Les stéroïdes sont des composés qui contiennent le noyau perhydrocyclopentanophénanthrène. Ils comprennent une grande variété de composés naturels parmi lesquels se trouvent les stérols proprement dits, les acides biliaires, les hormones sexuelles, les hormones corticosurrénales, les glucosides cardiotoniques, les sapogénines, quelques alcaloïdes et d'autres groupes mineurs.

Dans le genre *Ajuga*, nous avons noté que les stéroïdes se trouvent sous forme de deux classes :

I.3.1.1 Ecdystéroïdes

Les ecdystéroïdes sont une classe de stéroïdes biologiquement actifs [22]. Ces composés apparentés à l'ecdysone (=2 β ,3 β , 14 α , 22R,25-pentahydroxy-5 β -cholest-7-ène-6-one) sont caractérisés par un enchaînement 6-céto-7,8-déhydro et une polyhydroxylation [23].

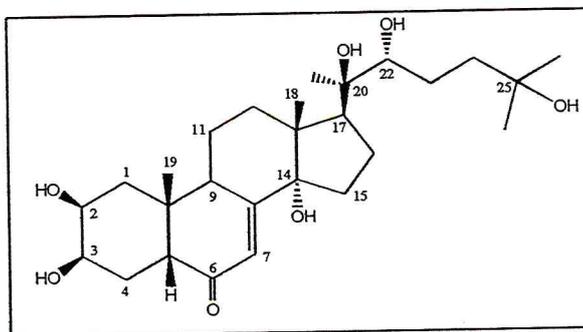


Figure 1 : Structure de base des ecdystéroïdes

Le squelette carboné des ecdystéroïdes ressemble à celui du cholestérol : quatre cycles caractéristiques A, B, C et D et une chaîne latérale en position C-17. La différence est que le noyau de la molécule ecdystéroïde comporte un chromophore 7-ène-6-one et un OH en position α sur le C-14.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

De nombreuses et différentes variations peuvent être remarquées ; en ce qui concerne les phytoecdystéroïdes isolés du genre *Ajuga*, on distingue:

- La présence d'un hydroxyle en position β sur le C-2
- Rare présence d'un groupement hydroxyle sur le noyau stéroïde en C-5 et C-11, et d'un groupement OXO en C-1.
- Une conjugaison avec des sucres est fortement observée.
- Le nombre d'atomes de carbone varie entre 29 et 41.
- Une variation dans la chaîne latérale (chaîne latérale linéaire ramifiée, présence d'un cycle tétrahydrofurane, chaîne latérale osidique, chaîne complexe ...)

Les principaux ecdystéroïdes isolés des espèces d'*Ajuga* sont regroupés dans le tableau 2. Leurs structures sont présentées dans la planche 1, (voir annexe).

I.3.1.2 Les withanolides

Les withanolides sont des composés appartenant à la classe des stéroïdes. Ils sont considérés comme un monopole des plantes de la famille des *Solanaceae*; il n'y a que quelques rapports sur leur isolement des organismes marins et des membres des *Taccaceae* et des *Leguminosae* [6]. Deux composés withanolides isolés à partir des espèces du genre *Ajuga* ont montré un bon docking vis-à-vis de l'inhibiteur cholinestérase [24].

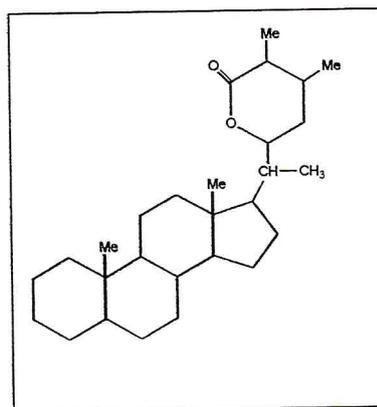
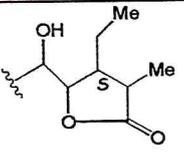
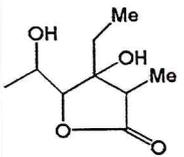
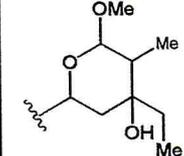
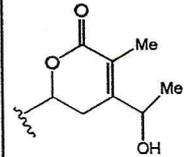


Figure 2 : structure de base des withanolides

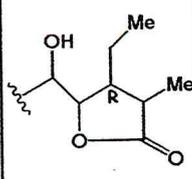
Les composés withanolides isolés des espèces du genre *Ajuga* sont regroupés dans le tableau 03. Leurs structures sont rassemblées dans la planche 2, (Voir annexe).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Tableau 2 : Ecdystéroïdes isolés à partir des espèces du genre *Ajuga* ainsi que leurs propriétés physiques.

Numéro de référence	Composés					Espèces
	Numéro de la Structure	R	R1	Nom Des produits isolés	Propriétés physiques	
[48]	1	OH	-	<i>20-hydrox ecdysone, 20E</i>	-	<i>A. nipponsis Makino</i>
		H	-	<i>Ajugasterone C</i>	-	
	2	OH	H	<i>cyasterone</i>	-	
		Oac	H	<i>cyasterone 22-acétate</i>	-	
		O	O	<i>22-dehydrocyasterone</i>	-	
	3	-	-	<i>22-Dehydrocyasterone 2-glucoside</i>	-	
	4	-	-	<i>Ajugacetalsterone A</i>	-	
5	-	-	<i>Ajugacetalsterone B</i>	-		
[22]	6		-	<i>Reptanslactone A</i>	$[\alpha]_D^{25} +17$	<i>A. reptans</i>
			-	<i>Reptanslactone B</i>	$[\alpha]_D^{25} +3$	
			-	<i>sendreisterone</i>	$[\alpha]_D^{28} +22$	
			-	<i>24- dehydroprecyasterone</i>	PF 275-277 $[\alpha]_D^{25} +7$	

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

			-	Breviflorasterone	PF 268-270 [α] _D ²⁵ +15	
[7]	7	H		Ajugasaliciosides A	[α] _D ²⁰ +8.4	A. <i>salicifolia</i>
		beta-D glycosyl		Ajugasaliciosides B	[α] _D ²⁰ +16.5	
	8	H		Ajugasaliciosides C	[α] _D ²⁰ -13.6	
		beta-D glycosyl		Ajugasaliciosides D	[α] _D ²⁰ -16.6	
	9	-	-	Ajugasaliciosides E	[α] _D ²⁰ -13.5	
[7]	10	H		ajugasalicigenin I	PF 192 [α] _D ²⁰ +5.7	A. <i>salicifolia</i>
		Beta glucose		ajugasalicioside F	PF 243 [α] _D ²⁰ -3	
	11	-	-	ajugasalicioside G	PF 187 [α] _D ²⁰ -8	
	12	-	-	ajugasalicioside H	PF 154 [α] _D ²⁰ -13.2	
[55]	13	-	-	(24S)-24-ethylcholesta-5,25-diene-11α-hydroxy-1-one	-	A. <i>relicta</i>
	14	-	-	(24S)-24-ethylcholesta-5,25-diene-7α-hydroxy-3-one	-	
[41]	15			Ajugacetalsterone C		A. <i>macrosp erma</i> var. <i>breviflora</i>
	16			Breviflorasterone		
	17			Ajugacetalsterone D		

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Tableau 3 : Withanolides isolés des espèces du genre *Ajuga* ainsi que leurs propriétés physiques.

Numéro de référence	Composés				Espèce
	Numéro de la structure	Radicaux	Nom du composé	Propriétés physique	
		R			
[6]	19	OH	ajugin	$[\alpha]_D^{+70.5^\circ}$ $C_{28}H_{38}O_6$	<i>A. parviflora</i>
[49]	20	H	ajugin A	$[\alpha]_D^{25} +120^\circ$ $C_{28}H_{38}O_6$	<i>A. parviflora</i>
	21	H	ajugin B	$[\alpha]_D^{25} +64^\circ$ $C_{28}H_{40}O_6$	
[50]	22	H	ajugin C	$[\alpha]_D^{25} +123^\circ$ $C_{28}H_{38}O_7$ $R_f = 0.45$	<i>A. parviflora</i>
	23	H	ajugin D	$[\alpha]_D^{25} +74^\circ$ $C_{28}H_{40}O_8$ $R_f=0.33$	
[10]	24	OH	Ajugin E	$[\alpha]_D^{21} +125^\circ$ $C_{28}H_{39}O_7$	<i>A. parviflora</i>
	25	OH	Ajugin F	$[\alpha]_D^{21} +57^\circ$ $C_{28}H_{41}O_6$	
[11]	26	Me	Bracteosin A	$[\alpha]_D^{31} +37^\circ$ $C_{29}H_{42}O_7$	<i>A. bracteosa</i>
		COOH	Bracteosin B	$[\alpha]_D^{31} +14.5^\circ$ $C_{29}H_{40}O_9$	
	27	-	Bracteosin C	$[\alpha]_D^{31} +29$ $C_{29}H_{44}O_7$	

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I.3.2 Les terpènes

Les terpénoïdes sont la classe la plus répandue et la plus importante des métabolites secondaires isolés des organismes végétaux [25]. Dans la famille des *Lamiaceae*, les terpénoïdes et spécialement les diterpénoïdes sont les plus dominants des métabolites secondaires, ces derniers sont isolés spécialement à partir des extraits de dichlorométhane ou d'acétone [26]. Les diterpènes dérivent de leur précurseur aliphatique qui est le géranyl-géraniol.

I.3.2.1 Diterpènes neoclerodanes

Les diterpènes rencontrés dans ce genre sont principalement des diterpènes lactoniques de la série du neoclerodane, leur identification s'est faite sur la base des méthodes d'analyses, principalement la RMN mono- et bidimensionnelle, ainsi que la spectrométrie de masse et l'infrarouge.

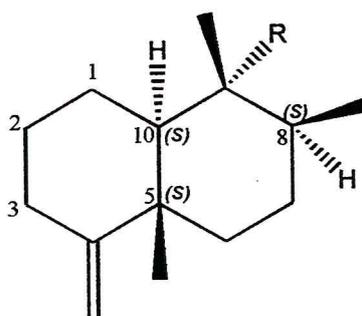


Figure 3 : noyau clerodane

Beaucoup de ces composés possèdent un ester 2-méthylbutyrique sur le C-3, un hydroxyle sur le C-2 et un groupement $\text{CH}_2\text{-OAc}$ sur le C-5; la stéréochimie au niveau du H2, H3 et H5 a été déterminée par comparaison avec quelques diterpènes neo-clerodanes déjà isolés à partir des espèces d'*Ajuga* comme le Ajugapitin et le 15-ethoxy-14-hydroajugapitin, et en tenant compte de la grande constante de couplage ($J=9.8\text{Hz}$) entre le H2 et le H3 ; de ce fait, les groupements en C2 et C3 seront orientés respectivement en α et β [23].

La présence d'un cycle oxirane en (C-4)-(C-17) au lieu d'une double liaison en C-4, est très remarquée. Elle a été élucidée par méthodes spectroscopiques [19].

Une étude par cristallographie des RX a confirmé que les deux cycles à six chaînons sont dans des conformations chaise. Ceci a été confirmé en prenant compte de leurs valeurs des angles de valences qui sont proches de ceux de la forme chaise du cyclohexane [20].

On note également une variation dans le radical R. La plus observée est la présence d'un cycle hexahydrofurofurane sur le carbone 9. Sa présence a été confirmée par RMN- H^1 [19]. Ce groupement cyclique présente des conformations enveloppe et plane [20]. Les diterpéniques de type neo-clerodane isolés des espèces d'*Ajuga* et quelques propriétés physiques, sont regroupés dans le tableau 4. Leurs structures sont rassemblées dans la planche 3, (Voir annexe).

Tableau 4 : diterpènes de type neoclerodane isolés des espèces du genre *Ajuga* et leurs propriétés physiques

Numéro de référence	Composé										Espèce
	Numéro de structure	Radicaux			Nom du composé			Propriétés physiques			
		R	R1	R2	R3						
[61]	28	-	-	-	-	-	Lupulins A	C ₃₀ H ₄₆ O ₁₁	<i>A. lupulina</i>		
	29	-	-	-	-	-	Lupulins B	C ₃₀ H ₄₆ O ₁₀			
	30	-	-	-	-	-	Lupulins C	C ₂₄ H ₃₆ O ₆			
[62]	35	-	-	-	-	-	Areptins A	-	<i>A. reptans</i>		
	36	-	-	-	-	-	Areptins B	-			
[52]	37	H	OH	OMe	H	H	Havitene A	[α] _D ²⁰ -12.1° C ₂₉ H ₄₄ O ₁₁	<i>A. pseudoiva</i>		
		H	OH	H	OMe	OMe	Havitene B	[α] _D ²⁰ -2.8° C ₂₉ H ₄₄ O ₁₁			
		OH	H	H	OMe	OMe	Havitene C	C ₂₉ H ₄₄ O ₁₁			
		-	OH	H	-	-	Ivain IV	C ₂₉ H ₄₄ O ₁₁			
[45]	38	-	H	OH	-	-	14,15-dihydroajugapitin	[α] _D -39°	<i>A. iva</i>		
[63]	33	H2	H	OMeBu	-	-	Ajugamarin F4	-	<i>A. reptans</i>		
		Alpha-H, Beta-OH	Beta-OMeBu	H	-	-	Ajugatanin A1	-			
		H2	Beta-OH	OMeBu	-	-	Ajugatanin B1	-			
		H2	Alpha-OH	OMeBu	-	-	3α-hydroxyajugamarin F4	-			
		O	Beta-OMeBu	H	-	-	Ajugareptansone A	-			
		H	H	H	-	-	Clerodin	-			

Suite tableau 4 : diterpènes de type neoclerodane isolés des espèces du genre *Ajuga* et leurs propriétés physiques

[44]	43	-	H	-	-	6-O-deacetylajugamarin	$[\alpha]_D^{20} +10^\circ$ C ₂₇ H ₃₈ O ⁺ ₉	A. decumbens
		-	Ac	-	-	ajugamarin	-	
	44	-	-	-	-	ajugadecumbenin A	$[\alpha]_D^{20} 0^\circ$ C ₂₄ H ₃₄ O ⁺ ₈	
[44]	45	Tig	-	-	-	Ajugadecumbenin B	$[\alpha]_D^{20} +6^\circ$ C ₂₇ H ₃₈ O ⁺ ₈	A. turkestanica
		MeBu	-	-	-	Ajugamarin F ₃	-	
[21]	46	H, H	OAc	-	-	14,15-dihydroajugachin B	$[\alpha]_D^{20} -28^\circ$ C ₃₁ H ₄₆ O ₁₂	A. turkestanica
		H, OCH ₃	OAc	-	-	14-hydro-15-methoxyajugachin B	C ₃₂ H ₄₈ O ₁₃	
		H, OH	OAc	-	-	chamaepitin	C ₃₁ H ₄₆ O ₁₃	
		OCH ₃	H	-	-	lupulin A	-	
		-	OAc	-	-	ajugachin B	-	
47	-	H	-	-	ajugapitin	-		

I.3.2.2 Les iridoïdes

Ce sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopenta [c] pyranique, parfois désigné par le terme d'iridane (cis-2-oxabicyclo-[4,3,0]-nonane). Certains auteurs limitent même leur définition à la seule notion de « méthylcyclopentane » ; ils tirent leur nom de celui des fourmis du genre *Iridomirmex* à partir desquelles furent isolés des composés impliqués dans les mécanismes de défense propres à ces insectes [23]. Ils sont produits et utilisés par les plantes comme un moyen de défense contre les herbivores ou contre l'infection par des micro-organismes. Pour les humains et autres mammifères, les iridoïdes sont souvent caractérisés par un goût amer, ils sont toxiques pour les herbivores, sont des mono-terpènes bio-synthétisés de l'isoprène et sont souvent intermédiaires dans la biosynthèse des alcaloïdes [27]. La stéréochimie au niveau du carbone chiral C-8 a été déterminée du point de vue biosynthétique [60]. Les iridoïdes ont généralement dix atomes de carbone. Dans la majorité des cas, le carbone C-11 est absent. Cependant on trouve une exception où il est inclu dans un groupement carboxylique.

Les variations structurales observées sont nombreuses. On note que le méthyle, normalement porté par le carbone C-8, peut être plus ou moins oxydé : hydroxy-méthyle, époxyde.

Certains d'entre eux présentent un hydroxyle porté par le carbone C-1. Ce dernier peut être engagé dans une liaison hétérosidique avec l'hydroxyle porté par le carbone anomérique du D-glucose de la majorité des iridoïdes glucosides. Ces derniers isolés jusqu'à présent, ont un groupe 8 α -méthyle et un 9 β -hydrogène en commun [28].

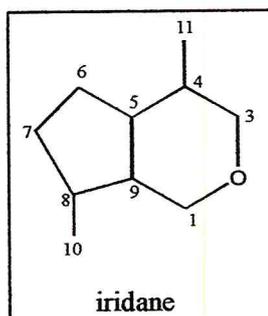


Figure 4 : Squelette iridane

Le tableau 5 regroupe les iridoïdes glucosidiques isolés des espèces d'*Ajuga*. Leurs structures sont données dans la planche 4, (Voir annexe).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau 5 : Iridoïdes glucosidiques isolés des espèces du genre *Ajuga*.

Numéro de référence	Composé					Espèce
	Numéro de structure	Radicaux		Nom du composé	Propriétés physique	
		R	RI			
[28]	48	-	-	Ajureptoside	-	<i>A. reptans</i>
[43, 28]	49	AC	H	Reptoside	-	<i>A. reptans</i> <i>A. decumbens</i>
		H	OH	Harpagide	-	
[43, 65, 60,28]	49	AC	OH	8-acetylharpagide	-	<i>A. reptans</i> <i>A. remota</i> <i>A. decumbens</i>
[51]	50	H	-	7-O-6'-O-malonylcachinesidic acid	-	<i>A. pseudoiva</i>
[56]	51	-	-	6,8-diacetylharpagide	-	<i>A. remota</i>
	52	-	-	6,8-diacetylharpagide 1-O-(2 β ,3 β -diacetyl- β -glucoside)	-	

I.3.2.3 Diterpènes glucosidiques

Un diterpène glucosidique (Ajugaside A) a été isolé à partir d'*Ajuga decumbens*. Sa structure établie par RMN a été confirmée par hydrolyse acide [20].

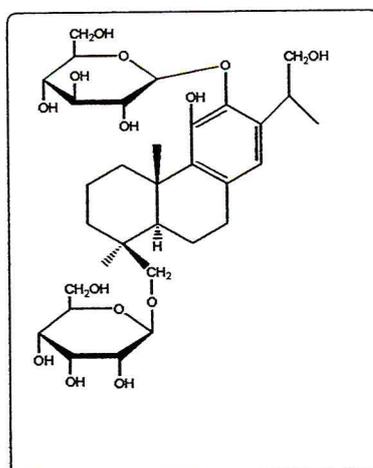


Figure 5 : structure de l'Ajugaside A

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau 6: Anthocyanines glucosidiques isolés des espèces du genre *Ajuga*.

Numéro de référence	Composé					Espèce	
	Numéro de structure	Radicaux					Nom du composé
		R1	R2	R3	R4		
[58]	53	OH	H	OCH3	malonyl	delphinidin 3-(p-coumaroylferuloyl) sophoroside-5-malonylglucoside	<i>A. reptans</i>
		OH	OCH3	OCH3	malonyl	delphinidin 3-(diferuloyl)sophoroside-5-malonylglucoside	
		OH	OCH3	OCH3	H	delphinidin 3-(diferuloyl)sophoroside-5-glucoside	
		H	H	H	H	cyanidin 3-(di-p-coumaroyl) sophoroside-5-glucoside	
[58, 53]	53	H	H	OCH3	malonyl	cyanidin 3-(feruloyl-p-coumaroyl) sophoroside-5-malonylglucoside	<i>A. reptans</i> <i>A. pyramidalis</i>

I.4 Activités biologiques des espèces du genre *Ajuga*

I.4.1 Activité antimicrobienne et antioxydante

L'activité antioxydante et la capacité de piégeage des radicaux libres ont été étudiées pour la première fois sur l'extrait aqueux, du méthanol et du chloroforme de l'espèce *Ajuga chamepitys*.

Les résultats de cette étude montrent que ces extraits peuvent être utilisés comme source d'antioxydants naturels ainsi que pour la stabilisation des aliments contre la dégradation par oxydation. Du point de vue de l'activité antimicrobienne, les trois extraits ont montré des activités contre les bactéries Gram négatif mais aucune activité n'est apparue contre celles des Gram positif. Les résultats obtenus indiquent que l'*Ajuga chamepitys* est une source potentielle d'antioxydants [8]. Par contre aucune activité microbienne de l'espèce *Ajuga chia* n'a été apportée [30]. L'extrait d'*Ajuga iva* a développé une importante activité antioxydante [31]. Des tests d'activité antibactérienne sur l'extrait méthanolique d'*Ajuga remota* ont été effectués par des essais de diffusion de disques et ont montré de résultats positifs [32].

I.4.2 Activité insecticide

Une activité insecticide a été constatée sur les extraits méthanoliques bruts d'espèces *Ajuga reptans* récoltées dans différents stades de croissance végétale avant et après floraison. Les extraits ont montré une grande efficacité insecticide [12]. L'extrait acétonique d'*Ajuga pseudoiva* a montré une forte inhibition contre *S. littoralis* [33]. L'extrait éthanolique brut d'*Ajuga iva* et *Ajuga pseudoiva* a une activité insecticide contre quelques *Lepidoptera* [34].

I.4.3 Activité hypoglycémique et autres

L'administration par voie orale de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* à des rats diabétiques a montré une diminution des niveaux de glucose dans leur plasma, ce qui se traduit par une activité hypoglycémique [19, 31, 35]. Le traitement par *Ajuga iva* a montré aussi une diminution du taux de cholestérol [31, 36], des triacylglycérols, ainsi qu'un abaissement des concentrations de l'oxyde nitrique, des carbonyles, et des caroténoïdes chez les rats [31].

I.4.4 Activité anti-inflammatoire

Les tests d'activité anti-inflammatoire d'*Ajuga remota* et *Ajuga bracteosa* ont été effectués en utilisant les essais COX1 et ont donné des résultats positifs [32, 37].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.4.5 Activité cytotoxique

Quelques stérols glucosidiques isolés de l'extrait méthanolique des parties aériennes d'*Ajuga salsifolia* ont montré des activités cytotoxiques contre quelques cellules humaines leucémiques qui sont évaluées comme des cellules cancéreuses [38], et contre des cellules sanguines humaines (PMBC) [7]. Les mêmes tests ont été effectués sur quelques stérols stigmastanes. Il n'y a qu'un parmi ces derniers, qui a montré une activité contre ces cellules leucémiques [38].

I.4.6 Activité agoniste et antagoniste

Il y a un intérêt considérable dans l'identification de nouveaux récepteurs d'ecdystéroïdes agoniste et antagoniste. ELbrecht et al(1996) ont reporté que le 8-O-acetylharpagide isolé à partir d'*Ajuga reptans*, est un faible ecdysoïde agoniste. Cependant le 8-O-acetylharpagide a montré une activité agoniste dans les cellules d'essais biologiques de la *D. melanogaster* B11 [39].

I.4.7 Activité antifongique

Cette activité a été effectuée par des essais de diffusion de disques [40]. Les extraits d'éther de pétrole et méthanolique d'*Ajuga remota* ont montré une activité antifongique contre les champignons dermatophytes [40], ce qui confirme son utilisation traditionnelle pour les traitements des maladies de la peau [40].

I.4.8 Étude de la toxicologie

Le résultat de l'étude de toxicité de l'espèce *Ajuga Iva* sur des souris et des rats, a montré qu'elle est sans danger [5].

I.4.9 Activité anthelminthique

L'extrait d'*Ajuga macrosperma* var. *breviflora* possède une activité anthelminthique contre *Ascaridia galli*, un ver rond de volaille [41].

I.4.10 Activité anti-appétissante

L'activité anti-appétissante a été étudiée sur l'extrait acétonique obtenu à partir des feuilles de l'espèce *Ajuga pseudoiva*. Les résultats obtenus étaient positifs et l'extrait a montré une grande activité anti-appétissante [33].

Chapitre II:

Etude chimique de l'espèce *Ajuga Reva* subsp *pseudoiva*

Introduction

Cette partie est consacrée à l'étude chimique et antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva*, elle comporte trois parties :

- 1- L'extraction de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* par entraînement à la vapeur d'eau.
- 2- L'étude de la composition chimique de l'huile conventionnelle par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- 3- L'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée au laboratoire du (département de Chimie de l'Université Saad Dahlab de Blida). L'analyse de l'HE a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse au sein du laboratoire de l'Université du sud de Toulon Var.

Les tests d'activités microbiologiques ont été réalisés au sein de l'unité bactériologique du laboratoire centrale de l'Établissement Public Hospitalier de BOUFARIK sur quelques germes pathogènes.

II. Matériel Végétal

II.1 Choix du matériel Végétal

Les critères qui nous ont conduits à choisir cette espèce pour l'étude sont :

- Sa place dans la systématique, d'où elle appartient à la famille des *lamiacées* qui est l'une des plus importantes familles du règne végétal.
- L'endémicité de l'espèce nous a incité à découvrir la composition de son huile essentielle.
- Les activités biologiques assignées aux plantes de la famille des *lamiacées* et particulièrement le genre *Ajuga*.
- En Algérie, peu de travaux ont été consacrés à cette plante et sont limités à l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits lipidiques.
- Les résultats des études phytochimiques obtenus des autres espèces du même genre *Ajuga* ; richesse en métabolites secondaires stéroïdes, terpénoïdes, et flavonoïdes.

II.2 Position systématique de l'espèce *Ajuga Iva subsp pseudoiva*

Phylum: Plantae

Division: Spermatophyta (Angiospermae)

Classe: Dicotyledones

Ordre: Tubiflorae

Famille: Lamiaceae / Labiatae

Genre: *Ajuga*

Espèce: *Iva*

Sous Espèce : *pseudoiva*

Auteurs : Robill & Castagne

II.3 Description botanique

Nom commun (Arabe): Chendgoura, (Berber): Taftelba, (Français): fausse Ivette.

Bugle, (Anglais): Herb ivy.

Ajuga iva subsp pseudoiva (chendgoura) est une petite plante vivace de 8 à 20 cm à tiges vertes rampantes et velues, florifère pratiquement dès la base [65].

Les feuilles sont vertes, de longueurs 14 à 25 mm, denses et couvertes de duvets. Ces dernières sont linéaires, lancéolées, entières ou finement dentelées, très hispides.

Les fleurs sont jaunâtres à l'intérieur de la fleur, il existe quatre étamines liées à quatre carpelles noirs. Les graines sont marrons [65].



(A)



(B)



(C)

- (A) La plante entière,
- (B) Les feuilles et les fleurs,
- (C) La fleur.

Figure 7 : Photos d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva*.

II.4 Présentation et situation de la zone d'étude

II.4.1 Localisation géographique

La commune de Damous se situe dans la périphérie Ouest de la wilaya de Tipaza. Couvrant une superficie de 112 km. L'altitude varie entre zéro (niveau de la mer) et 909 m (Sud de la commune). Elle est limitée :

- Au Nord par la mer Méditerranée ;
- Au Sud par les wilayas de Ain Defla et Blida ;
- A l'Est par la wilaya d'Alger, caractérisée par une forte pression d'urbanisation ;
- A l'Ouest par la wilaya de Chlef.

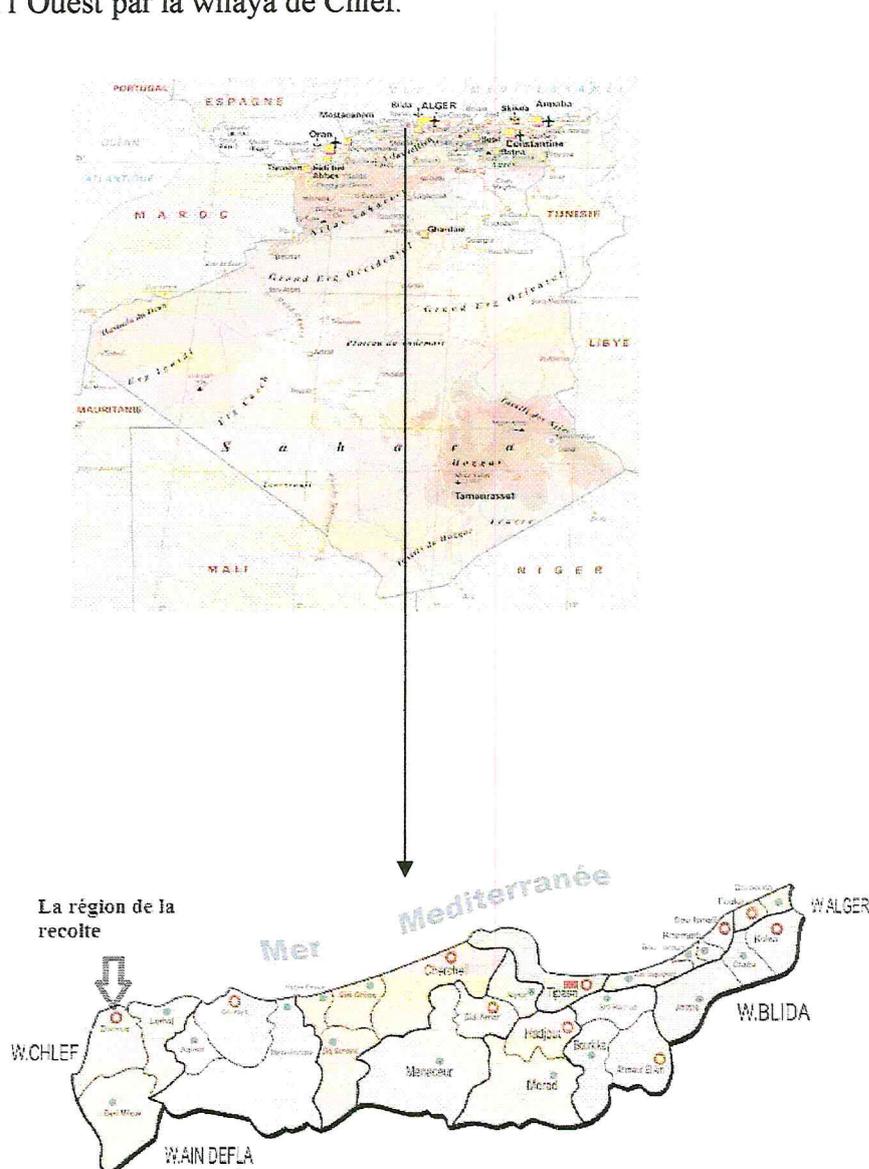


Figure 8 : Situation géographique de la région de récolte (Damous)

II.4.2 Milieu physique

II.4.2.1 Géomorphologie

La ville de Damous est située au pied de la montagne. Nous sommes là, dans la zone montagneuse constituée de plusieurs Djebels parmi lesquels nous citerons :

- Le djebel Nador qui culmine à 905m à Sidi Moulay Abdelkader.
- Le djebel Er Rof qui atteint 851m à Koudiat Lawa. il ya également d'autres djebels tels que le djebel Boukerdous et Taksebt.

II.4.2.2 Données climatiques

Le climat qui domine dans cette région est du type méditerranéen c'est-à-dire tempère sec et assez chaud en été, doux et humide en période hivernale.

- L'amplitude thermique, soumise à l'influence de la mer, est faible.
- La température moyenne mensuelle est d'environ 12°C.
- Les périodes d'enneigement et de gel sont très rare vu la proximité de l'influence maritime.
- Les vents les plus fréquents sont orientés Nord-Est et Ouest.

II.4.2.3 L'hydrogéologie

Du point de vue hydrogéologique, la région de Damous a une pluviométrie assez séquente entre 400 et 600 mm par an de ce fait, la constitution géologique des sols de la commune peut être divisé en deux zones :

- **Zone perméable** : composée essentiellement de crétaé supérieur (argiles schisteuses, du cénomanien calcaires béchiques et poudingues), d'alluvions d'oueds, (galets, graviers sableux). Cette zone est située au Sud et l'Est de l'agglomération chef lieu, au centre de la commune et au sud (djbel Boukerdes). Les lits d'oueds (Damous et Harbil) renferment également des potentialités aquifères.
- **Zone imperméable** : se sont des sols du crétaé supérieur (marnes et clac marneux) et de l'albien (argiles schisteuses et schistes noir très compacts). Cette zone est située au centre de la commune (douar Roff au Sud Ouest et s'étant jusqu'au Nord Est du territoire communal (douar beni Zioui en passant par Tahanout).

II.5 Conservation

La plante fraîchement récoltée, est soumise à un tri manuel a fin d'éliminer les organismes nuisibles capables de contaminer la nature chimique de l'huile essentielle. On effectue ensuite un rinçage à l'eau douce et un séchage à l'ombre dans un endroit propre, sec et aéré. A l'état sec, les feuilles et les tiges sont conservées dans des sacs propres. Il faut noter qu'avant le lavage, une quantité de la plante à été utilisée pour la mesure du taux d'humidité.

II.6 Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité de la plante a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve [66]

Soit :

- m_f : le poids de la matière végétale fraîche
- m_s : le poids de la matière végétale sèche.
- H% : le taux d'humidité exprimé en pourcentage

$$H\% = (m_f - m_s) / m_f \times 100$$

II.7 Extraction et analyse de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* :

II.7.1 Principe de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La technique d'extraction de l'huile essentielle utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau, est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un hétéro azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures [67].

II.7.2 Procédé d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par entraînement à la vapeur d'eau.

Une masse de 60 g de la matière végétale sèche (feuilles et tiges découpées en petits fragments) est mise dans une ampoule placée au dessus d'un ballon rempli au (2/3) d'eau distillée. Les vapeurs formées traversent la plante et font éclater les cellules, les poches et les poils sécréteurs, entraînant avec elles l'huile. Après condensation et liquéfaction, l'huile surnage l'eau par la différence de densité.

II.7.2.1 Traitement et récupération de l'huile essentielle

Le traitement de l'hydrolat obtenu lors de l'entraînement à la vapeur d'eau (l'huile et l'eau) est réalisé dans une ampoule à décanter en utilisant l'éther diéthylique. Le mélange se sépare en deux phases, une phase organique qui contient l'huile essentielle solubilisée dans l'éther diéthylique et une phase aqueuse contenant l'eau et quelques traces d'HE. Cette dernière subit à nouveau une extraction avec l'éther diéthylique dans le but de récupérer le maximum d'huile essentielle. L'extraction liquide-liquide est réalisée trois fois. Les phases organiques obtenues sont mélangées en une seule phase, cette dernière est filtrée sur le sulfate de sodium anhydre utilisé alors comme desséchant. La phase organique filtrée subit une distillation au rotavapeur à une température de 35°C afin d'éliminer l'éther diéthylique. L'huile essentielle obtenue est mise dans un flacon propre et conservé au frais. Le flacon est pesé au préalable avant d'introduire l'HE afin de calculer le rendement en HE.

II.8 Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle extraite et la masse de la plante utilisée. Le rendement est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = m_{HE} / m_V \times 100$$

Considérons :

- m_{HE} : la masse de l'huile essentielle en gramme.
- m_V : la masse de la matière végétale en gramme.
- R : le rendement de l'huile essentielle en pourcentage.



- 1 : Bain marie.
- 2 : Ballon de 1000 ml.
- 3 : Ampoule à décanter de 1000 ml
- 4 : Réfrigérant.
- 5 : Élevateur.
- 6 : Bêcher de récupération

Figure 9 : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva*.

II.9 Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

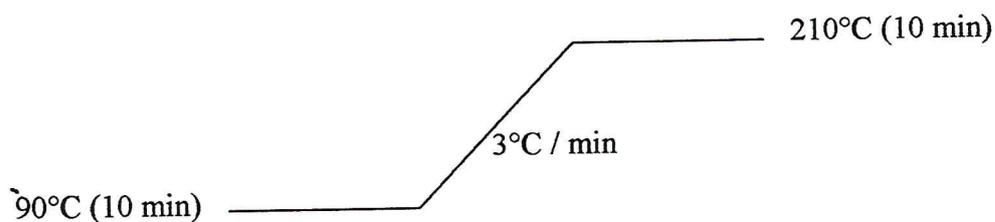
L'analyse de la composition chimique de notre huile essentielle a été réalisée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'identification des différents composés de l'huile essentielle est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n.1 et NBS 75k.1 avec un taux de similitude égale à 90%.

Nous tenons à rappeler que la NBS 75k.1 est une banque comprenant les spectres de masse de 75000 molécules. Celle de Wiley 7n.1 comprend 250000 molécules.

II.9.1 Conditions opératoires

L'analyse est effectuée sur un chromatographe HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972, dans les conditions suivantes :

- Une colonne capillaire de type HP1 (polydiméthylsiloxane 100%), de longueur 30m d'un diamètre de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25 μm .
- Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale a 70 eV.
- Le programme de température du four est :



- Gaz vecteur He.
- Injection en mode Split : 1/90.
- Les échantillons de l'huile essentielle sont dilués dans l'AcOEt à 1%.

II.10 Résultats et discussion de l'étude chimique

II.10.1 Taux d'humidité

Les plantes terrestres sont connues pour leur richesse en eau. Le taux d'humidité moyen obtenu dans cette analyse est de 68.67%. C'est un taux d'humidité qui représente les 2/3 de la masse de la plante d'*Ajuga Iva subsp Pseudoiva*.

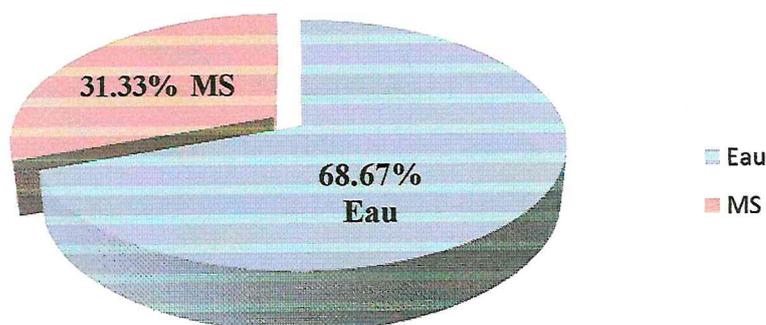


Figure 10 : La teneur en humidité de la plante *Ajuga Iva subsp pseudoiva*

II.10.2 Propriétés caractéristiques de l'HE d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva*

L'évaluation des propriétés organoleptiques constitue généralement une partie des études visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'huile essentielle. L'analyse a été effectuée en observant et en inhalant directement l'huile essentielle.

Dans cette étude, trois critères sont considérés pour évaluer la qualité organoleptique de l'huile essentielle :

- L'odeur
- La couleur
- L'aspect

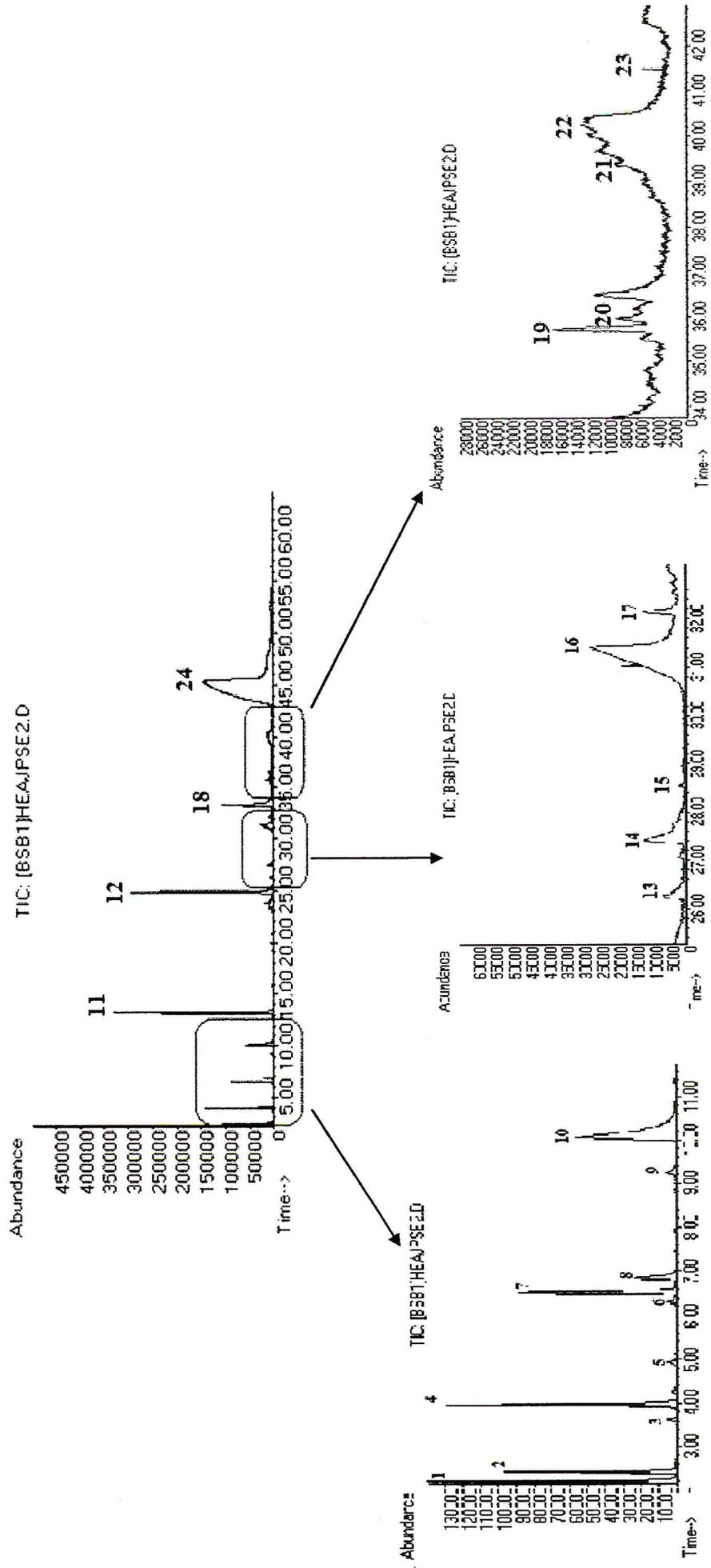
Les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle d'*Ajuga iva subsp pseudoiva* obtenu par entraînement à la vapeur d'eau, sont données par le tableau 7.

*Chapitre II : Étude chimique de l'espèce *Ajuga Iva subsp pseudoiva**

8	6.86	3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one	C ₉ H ₁₄ O	0.47
9	9.24	(+) α - terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.11
10	10.07	2,3-dihydro-benzofurane	C ₈ H ₈ O	2.92
11	13.28	2-Methoxy-4-vinylphenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	9.96
12	24.87	1-Allyl-2,3-dimethoxy-4,5-methylenedioxybenzene	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	9.98
13	26.26	β . Tumerone	C ₁₅ H ₂₂ O	0.21
14	27.41	α .bisabolol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.46
15	28.54	6-Hydroxy-7-methyl-9-oxabicyclo[3.3.1]nonan-2-one	C ₉ H ₁₄ O ₃	0.01
16	31.42	Acide tétradécanoïque	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1.86
17	32.14	Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	0.27
18	33.28	6,10,14-trimethyl -2-Pentadecanone	C ₁₈ H ₃₆ O	4.46
19	35.71	1-chloro-octadecane	C ₁₈ H ₃₇ Cl	0.45
20	35.95	1,2,3-trimethyl-Cyclohexane	C ₉ H ₁₈	0.25
21	39.37	acide tridécanoïque	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	0.12
22	40.05	acide n-Hexadécanoïque	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.02
23	41.46	Tetrahydro-3-furanmethanol	C ₅ H ₁₀ O ₂	0.01
24	45.31	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	16.96

Le profil chromatographique est présenté dans la figure 11.

Figure 11: Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva*



II.10.4.1 Discussion de la composition chimique de l'HE d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* :

L'examen du tableau 7 montre que la composition de l'HE est dominée par des composés oxygénés et leurs dérivés (37.71%), tel que :

- 4-methyl-3-Penten-2-one.
- Benzaldéhyde.
- 1-octen-3-ol.
- 2-Methoxy-4-vinylphenol.
- 1-Allyl-2,3-dimethoxy-4,5-methylenedioxybenzene.

Les terpènes sous forme de mono, sesqui et diterpènes représentent plus de (17.75%), il s'agit notamment du :

- Linalol.
- α -terpineol.
- α -bisabolol.
- β -Tumerone.
- Phytol.

La composition de l'huile essentielle révèle également la présence d'une série d'acides gras saturés allant de l'acide tridécanoïque à l'acide hexadécanoïque avec une fraction représentant (2.007%). Les acides gras identifiés sont :

- L'acide tridécanoïque.
- L'acide tétradécanoïque.
- L'acide n-Hexadécanoïque.

Chapitre III:
Activités antimicrobiennes

III.1 Tests d'activités antimicrobiennes

III.1.1 Lieu de travail

Notre travail est réalisé au niveau de l'unité de bactériologie du laboratoire central de l'Établissement Public Hospitalier de BOUFARIK.

III.1.2 Matériel microbien

Des souches bactériennes de références (ATCC) et pathogènes ainsi que les levures, ont fait l'objet de notre étude.

Les bactéries pathogènes et les levures ont été isolées à partir de produits pathogéniques, au sein de l'unité de bactériologie clinique du laboratoire centrale de l'Établissement Public Hospitalier de BOUFARIK (Tableau 9).

Les souches de références sont fournies par le laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS (Tableau 10).

Tableau 9: Les différents micro-organismes pathogènes utilisés dans notre étude

	Souches
Les Bactéries Gram -	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Klebsiella pneumoneae</i>
La Bactérie Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>
Les Levures	<i>Candida albicans</i>

Tableau 10: Les souches de références utilisées dans notre étude

Souches	Gram	ATCC
<i>Escherichia coli</i> ATCC DES GRAM -	-	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 25923

Remarque : Par faute de moyens nous n'avons pas pu faire le test ATCC sur la levure *Candida albicans*.

III.1.2.1 Milieux de cultures

Les milieux de cultures utilisées au cours de la réalisation de ce travail sont présentés dans (Le tableau 11).

Tableau 11 : Les milieux de cultures utilisés dans notre étude.

Milieux de cultures	Milieu utilisé pour les tests antibactérien et anti fongique
<ul style="list-style-type: none">- Gélose nutritive- Gélose Hektoen- Gélose au sang frais- Gélose au sans cuit- Milieu Sabouraud-choramphénicol	<ul style="list-style-type: none">- Milieu de Muller Hinton

III.2 Étude qualitative de l'effet antibactérien et antifongique de l'huile essentielle par la méthode de diffusion sur milieu solide « Méthode de Vincent »

III.2.1 Principe

Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne de l'huile essentielle *d'ajuga iva subsp pseudoiva*, en la mettant en présence des germes testés.

Des disques absorbants stériles sont imprégnés d'une quantité d'huile essentielle, et déposés sur une gélose inoculée avec les souches testées. La diffusion de cette huile essentielle dans la gélose, va permettre l'inhibition de la croissance des germes, tout au tour des disques, dans le cas d'une éventuelle activité antimicrobienne positive, qui se traduira par une auréole claire et distincte autour du disque appelée : halo ou zone d'inhibition.

La lecture des résultats après incubation, est faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues pour chacune des souches.

La méthode est validée par le fascicule de Standardisation de L'antibiogramme a L'échelle nationale Selon les recommandations de L'OMS, fournis par NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards. Son principe est tiré du titrage des antibiotiques (test d'antibiogramme).

III.2.2 Technique

La méthode que nous avons utilisée, est l'ensemencement par écouvillonnage préconisé par NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) et recommandé par l'OMS.

Milieu

- Gélose Muller-Hinton (MH) (bactéries non exigeantes) ; coulée en boite de pétri sur une épaisseur de 4 mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

Inoculum

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile a 0.9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

Chapitre III : activités antimicrobiennes

Ensemencement

- tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger en maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries séries.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Dépôts des disques

- A l'aide d'une pince stérile, prélever à chaque fois un disque stérile (de 06 mm de diamètre). Ce dernier est imbibé de l'huile essentielle d'*Ajuga iva subsp pseudoiva*, en mettant seulement en contact le bout du disque, celle-ci va être absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale du disque.
- Déposer les disques sur la surface de la gélose.
- Laisser diffuser sur paillasse pendant 30 min.

Incubation

- 24 heures à 37°C pour les bactéries.
- 48 heures à 25°C pour les levures.

Lecture

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer ces résultats aux valeurs critiques des ATCC.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

III.3 Résultats et discussion des tests d'activités antibactérienne et antifongique

III.3.1 Résultats

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* a été effectuée par la méthode de disque absorbant ou méthode de diffusion sur la gélose « méthode de Vincent». La mesure du diamètre des zones d'inhibition permet de déterminer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle in vitro.

Les résultats qualitatifs de l'huile essentielle conventionnelle sur les bactéries pathogènes sont donnés dans le (tableau 12)

Tableau 12 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle sur les souches pathogènes

Souches	Gram	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i>	-	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	15
<i>Proteus mirabilis</i>	-	22
<i>Klebsiella pneumoneae</i>	-	19

Les résultats qualitatifs du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* sur les souches pathogènes étudiées, sont présentés dans les figures (12-13-14-15-16)

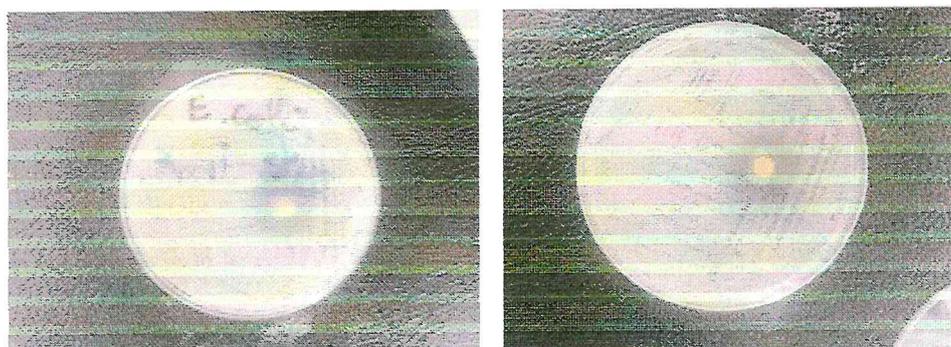


Figure 12 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* contre l'*Escherichia coli*



Figure 13 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* contre la *Pseudomonas aeruginosa*



Figure 14 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* contre la *Proteus mirabilis*



Figure 15 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* contre la *Staphylococcus aureus*

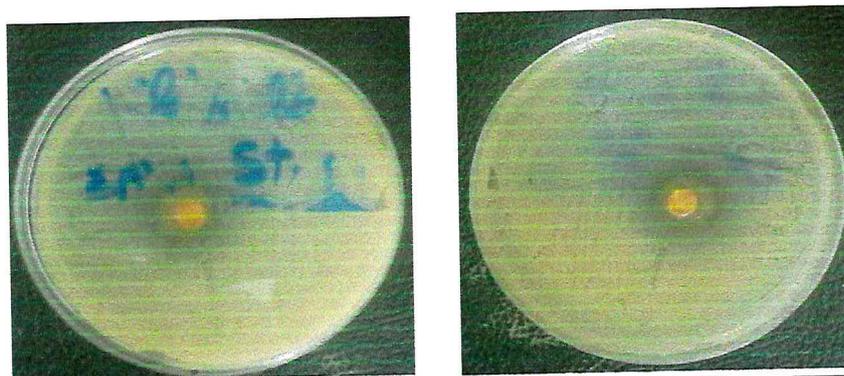


Figure 16 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* contre la *Klebsiella pneumoniae*

Chapitre III : Résultats des activités antimicrobiennes

Les résultats des diamètres obtenus dans le tableau sont représentés sous forme d'histogramme.

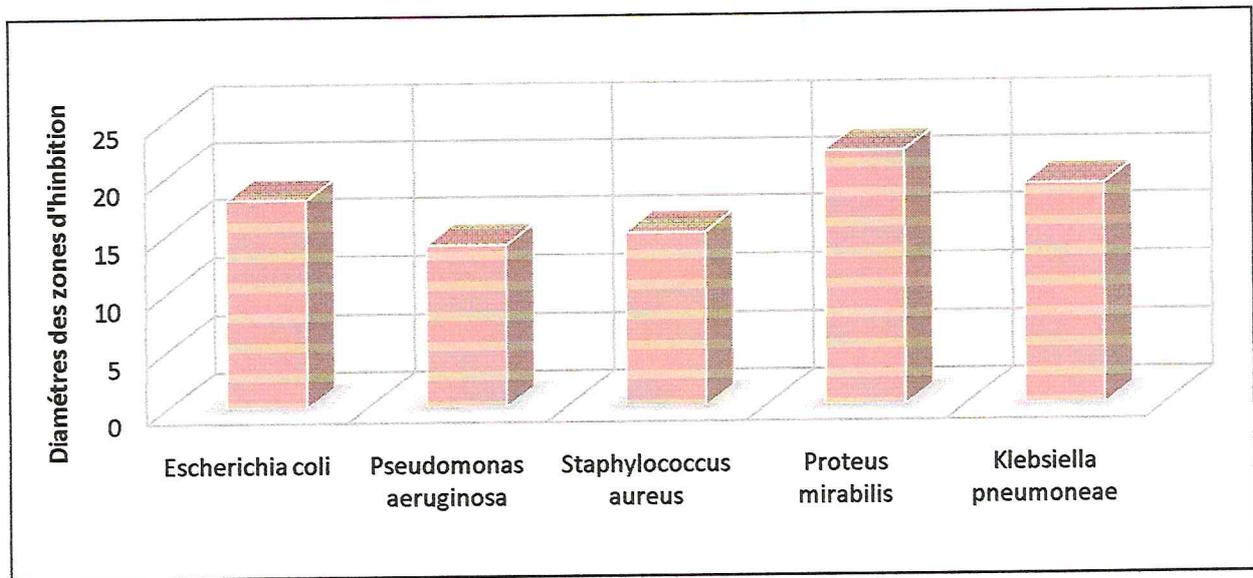


Figure 17 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* sur les différentes souches bactériennes pathogènes testées.

Selon la disponibilité des souches bactériennes de référence au sein de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Établissement Public Hospitalier de BOUFARIK on a comparé trois souches, Deux à Gram (-) qui sont l'*Escherichia coli* et la *Pseudomonas aeruginosa* et l'autre à Gram(+) qui est la *Staphylococcus aureus* dans le but de faire une étude comparative entre les diamètres d'inhibition obtenus avec les souches pathogènes et ceux obtenus avec les souches ATCC.

Les résultats qualitatifs de l'huile essentielle conventionnelle sur les bactéries de Référence ATCC sont présentés dans le (tableau 13).

Chapitre III : Résultats des activités antimicrobiennes

Tableau 13 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle sur les bactéries de référence ATCC.

Souches	Gram	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC	-	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	-	18
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	+	23

Les résultats qualitatifs du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* sur les souches référence ATCC étudiées sont présentés dans les figures (18-19-20).

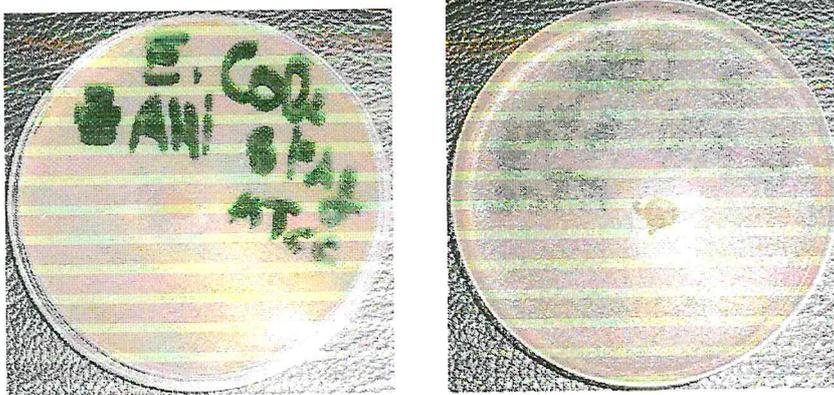


Figure 18 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* contre l'*Escherichia coli* ATCC 25922



Figure 19 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* contre la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Figure 20 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* contre la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

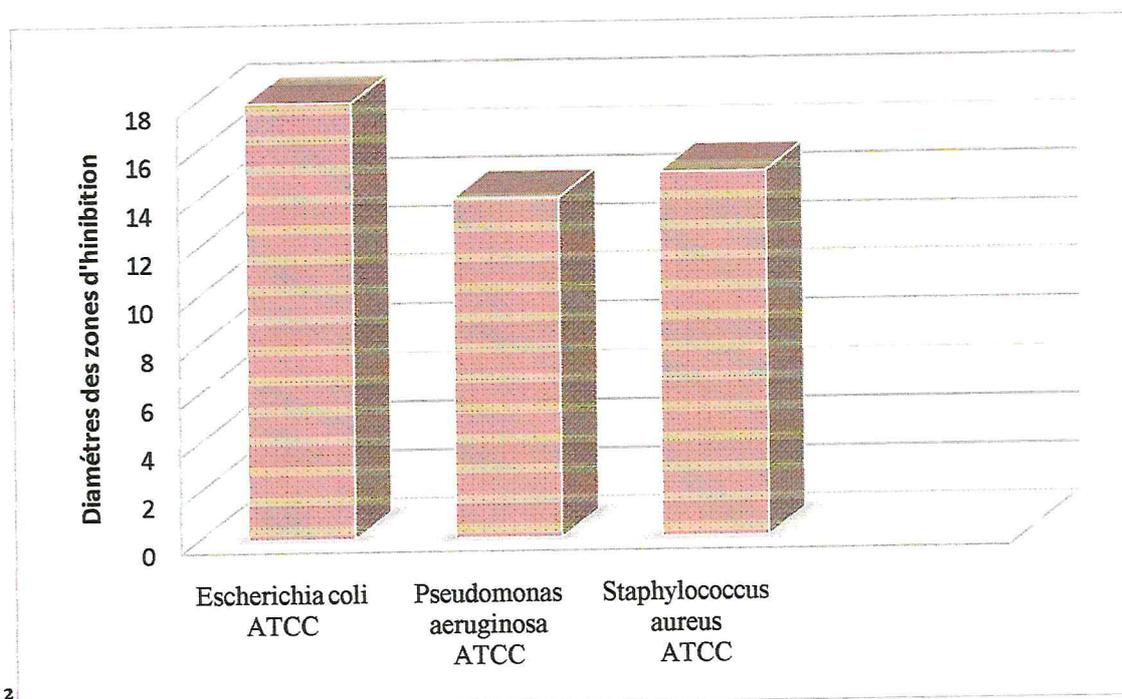


Figure 21 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de l'huile essentielle *Ajuga Iva subsp pseudoiva* sur les différentes souches ATCC

L'interprétation des deux histogrammes présentés dans les figures (17 et 21) nous a amenés à constater que :

- Les souches *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoneae* et *Proteus mirabilis* : la valeur du diamètre mesuré est supérieure à celle de l'ATCC *Escherichia coli* 25922.
- Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* : la valeur du diamètre mesuré est inférieure à celles de l'ATCC *Pseudomonas aeruginosa* 27853 et de *Staphylococcus aureus* 25923.

Concernant l'activité antifongique, une seule levure a été testée qui est *Candida albicans*

Tableau 14 : Activité antifongique de l'huile essentielle sur la souche pathogène *Candida albicans*

Levure	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Candida albicans</i>	27

III.3.2 Discussion

On constate un effet inhibiteur de l'huile essentielle sur le développement des bactéries et des levures. Cet effet antimicrobien est important pour les souches de *Proteus* (22 mm > 17 mm de l'ATCC).

Nous avons remarqué l'absence d'une zone appelée « couronne de résistance » qui se développe généralement autour du disque dans le cas où les colonies continuent à se multiplier. On peut attribuer le caractère « assez sensible » à ces souches vis-à-vis de l'huile essentielle étudiée. De ce fait, on peut conclure que l'huile semble exercer une activité « bactéricide » et « fongicide ». En admettant que le diamètre d'inhibition est un bon indicateur de l'activité bactéricide.

On peut expliquer cette activité antimicrobienne, par la présence de molécules chimiques telles que :

- Les alcools incluant les phénols.
- Les terpènes qui sont des anti-inflammatoires, dont font partie les sesquiterpènes qui sont d'excellents antibactériens, et fongicides à large spectre d'action.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Ce travail est consacré à l'étude chimique et aux activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de l'espèce végétale *Ajuga Iva subsp pseudoiva*. Le choix de cette espèce est basé sur de nombreux critères essentiels, parmi lesquels : l'endémicité de la plante et la rareté des travaux consacrés à cette espèce qui portaient notamment sur l'étude chimique et les activités biologiques des extraits lipidiques.

Nous avons constaté que l'entraînement à la vapeur d'eau fournit un rendement très faible par rapport à d'autres espèces ; Ceci est probablement dû à sa nature (faibles métabolites secondaires), le lieu et la période de la récolte.

L'analyse de l'huile essentielle par le couplage CG/SM nous a permis d'identifier la composition chimique de cette dernière. Elle est constituée principalement de composés oxygénés, terpènes, d'acides gras et d'autres produits.

Les résultats des tests d'activités antimicrobiennes de l'huile essentielle vis-à-vis des souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et la souche fongique : *Candida albicans*, nous ont permis de constater que l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* possède un pouvoir antimicrobien vis-à-vis de ces souches. Ce résultat montre clairement que l'huile essentielle d'*Ajuga Iva subsp pseudoiva* est dotée d'un large spectre d'activité inhibitrice sur les micro-organismes testés.

Cette activité antimicrobienne pourrait être due à la composition chimique de l'HE qui contient des alcools, des phénols, ainsi que des sesquiterpènes qui sont d'excellents antibactériens et fongicides et possédant un large spectre d'action.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

- [1] G. Robert., Les Sens du Parfum. Osman Eroylls Multimedia. Paris. (2000), 224.
- [2] C.S. Sell., The Chemistry of Fragrance from Perfumer to Consumer, 2nd edition, The Royal Society of Chemistry. Cambridge. (2006), 329.
- [3] M. bouheroum., Étude phytochimique des plantes médicinales algériennes, Thèse de Doctorat d'État, Département des sciences exactes, Université Mentouri, Algérie (2007).
- [4] J. paolini., caractérisation des huiles essentielles par cpg/ir, cpg/sm-(ie et ic) et rmn du carbone-13 de *cistus albidus* et de deux asteraceae endémiques de corse : *eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *doronicum corsicum*, Thèse Doctorat d'état, Faculté des sciences et techniques, Université de Corse Pascal Paoli, France (2005).
- [5] J. El Hilaly., Z.H. Israili., B. Lyoussi., Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals, Journal of Ethnopharmacology, 91, 43–50, (2004).
- [6] P.M. Khan., A. Saeed., H. Rubnawaz., A. Malik., The first report of a withanolide from the family Labiatae, Phytochemistry, 51, 669-671, (1999).
- [7] P. Akbaya., J'rg .Gertscha., I. fialisb., J'rg. Heilmanna., O. Zerbea., O. Stichera., Novel Antileukemic Sterol Glycosides from *Ajuga salicifolia*, HELVETICA CHEMICA ACTA , 85, 462-465, (2002).
- [8] S. Turkoglu., I. Turkoglu., M. Kahyaoglu and S. Celik., Determination of antimicrobial and antioxidant activities of Turkish endemic *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *euphratica* P.H. Davis (Lamiaceae), Journal of Medicinal Plants Research, 4, (13), 1260-1268, (2010).
- [9] J. El-Hilaly ., B. Lyoussi., M. Wibo., N. Morel., Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta, Journal of Ethnopharmacology, 93, 69–74, (2004).
- [10] H.R. Nawaz., A. Malik., P.M. Khan., S. Ahmed., Ajujin E and F: Two withanolides from *Ajuga parviflora*, Phytochemistry, 52, 1357-1360, (1999).
- [11] N. Riaz., A. Malik., A.U. Rehman., S.A. Nawaz., P.M., M.I. Choudhary., Cholinesterase-Inhibiting Withanolides from *Ajuga bracteosa*, Chemistry & biodiversity, 1, (2004).
- [12] B. Darvas., C. Defu., L.A. Polgar., C. Kormendy., E. Vidal., L. Pap & J. Coll., Effects of some Materials Extracted from *Ajuga reptans* var. *reptans* on *Aedes aegypti* and *Dysdercus cingulatus* Larvae. Pestic, Sci, 49, 392-395. (1997).
- [13] M. Pir., S. Ahmad., H.R. Nawaz., N. Ullah., A. Malik., New acetylated quinols from *Ajuga parviflora*, Fitoterapia, 70, 229-232, (1999).
- [14] H. Herrmann et V. Wunsch., le règne végétal, Edition SGED, (1998), 400.

[15] W.S. Judd., C.S. Campbell., E.A. Kellg., P.F. Stevens., Botanique systématique, Édition de BOECK UNIVERSITÉ, (2002), 447.

[16] URL: www.botanique.org

[17] C. Brauchler., H. Meimberg., G. Heub., Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) – Taxonomy, biogeography and conflicts, Molecular Phylogenetics and Evolution, 55, 501–523, (2010).

[18] G. Bonnier., R. Dowin., La grande flore en couleurs, 4ème édition Belin, (2004), 669.

[19] J. El Hilaly., B. Lyoussi., Hypoglycemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga* in normal and streptozotocin diabetic rats, Journal of Ethnopharmacology, 80, 109–113, (2002).

[20] M. Takasaki., I. Yamauchi., M. Haruna., T. Konoshima., New Glycosides from *Ajuga decumbens*, J. Nat. Prod, 61, 1105-1109, (1998).

[21] M.H. Grace., D.M. Cheng., Ilya Raskin., Mary Ann Lila., Neo-clerodane diterpenes from *Ajuga turkestanica*, Phytochemistry Letters, 1, 81–84, (2008).

[22] A. Vanyolos and all. C-29 Ecdysteroids from *Ajuga reptans* var. *reptans*, J. Nat. Prod, 72, 929–932, (2009).

[23] J. Bruneton., Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales, 3ème édition TEC et Doc, (1999), 618.

[24] M.I. Choudhary and all., Withanolides, a new class of natural cholinesterase inhibitors with calcium antagonistic properties Biochemical and Biophysical, Research Communications, 334, 276–287, (2005).

[25] M. El- Hattab., Contribution à l'étude chimique des extraits lipidiques et huiles essentielles d'algues méditerranéennes et de l'océan atlantique isolement, détermination, détermination structurelle de nouveaux métabolites et modélisation mathématique des procédés d'extraction, Thèse Doctorat d'état, Faculté des sciences de l'ingénieur, Université Saad Dahlab Blida, (2005).

[26] G. Topcu., A. Ulubelen., Structure elucidation of organic compounds from natural sources using 1D and 2D NMR techniques, Journal of Molecular Structure, 834–836, 57–73, (2007).

[27] Z. H. Israili, B. Lyoussi., Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*, Pak. J. Pharm. Sci, 22, 4, 425-462, (2009).

[28] N. Shoji., A. Umeyama., N. Sunahara., S. Arihara., Ajureptoside a novel C₉ iridoid glucoside from *ajuga reptans*., Journal of Natural Products, 55, (7), 1004-1006, (1992).

[29] N.A. Nyman., J.T. Kumpulainen., Determination of anthocyanidins in berries and red wine by High-Performance Liquid Chromatography, J. Agric. Food Chem, 49, 9, 4183-4187, (2001).

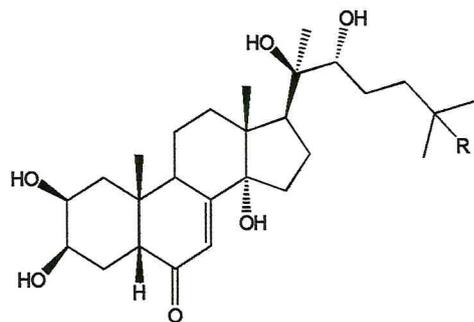
- [30] A.G. Al-Bakri., F.U. Afifi., Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration, *Journal of Microbiological Methods*, 68, 19–25, (2007).
- [31] D.T. Senouci., H. Ghomari., D. Krouf., S. Bouderbala., J. Prost., M.A. Lacaille-Dubois., M. Bouchenak., Antioxidant effect of *Ajuga Iva* aqueous extract instreptozotocin-induced diabetic rats, *Phytomedicine*, 16, 623–631, (2009).
- [32] E.N. Matu., J. van Staden., Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya, *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 35–41, (2003).
- [33] H. Ben Jannet., F. H. Skhiri., Z. Mighri., M.S.J. Simmonds ., W.M. Blaney , Antifeedant activity of plant extracts and of new natural diglyceride compounds isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves against *Spodoptera littoralis* larvae, *Industrial Crops and Products*, 14, 213–222, (2001).
- [34] R. Jbilou., H. Amri., N. Bouayad., N. Ghailani ., A. Ennabili ., F. Sayah ., Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development, α -amylase activity and offspring production of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae), *Bioresource Technology*, 99, 959–964, (2008).
- [35] J. El-Hilaly., A. Tahraoui., Z.H. Israili., B. Lyoussi., Hypolipidemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L, whole plant in normal and diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 441–448 , (2006).
- [36] A. Chenni., D. Ait Yahia., F.O. Boukortt ., J. Prost., M.A. Lacaille-Dubois., M. Bouchenak., Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet, *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 207–213, (2007).
- [37] R. Gautam., S.M. Jachak., A. Saklani., Anti-inflammatory effect of *Ajuga bracteosa* Wall Ex Benth Mediated through cyclooxygenase (COX) inhibition , *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 928-930, (2010).
- [38] P. Akbay., I. Calis., J. Heilmann., O. Sticher., New Stigmastane Sterols from *Ajuga salicifolia*, *Journal of Natural Products*, 66, (4), 461-465, (2003).
- [39] L. Dinan., P. Whiting., P. Boume., J. Coll., 8-O-Acetylharpagide is not an ecdysteroid agonist, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 1077–1082, (2001).
- [40] R.M. Kariba., Antifungal activity of *Ajuga remota*, *Fitoterapia*, 72, 177-178, (2001).
- [41] A. Castro., J. Coll., Y.A. Tandron., A. K. Pant and C.S. Mathela., Phytoecdysteroids from *Ajuga macrosperma* var. *breWiflora* Roots, *J. Nat. Prod*, 71, 1294–1296, (2008).
- [42] M. El Beyrouthy., N. Arnold., A. Delelis-Dusollier., F. DuPont, Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon, *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 315–334, (2008).

- [43] T. Konoshima, M. Takasaki, H. Tokuda, H. Nishino, Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide from *Ajuga decumbens*, *Cancer Letters*, 157, 87-92, (2000).
- [44] X.C. Huang, S. Qin, Y.W. Guo, K. Krohn, Four New Neoclerodane Diterpenoids from *Ajuga decumbens*, *Helvetica Chimica Acta*, 91, 628-634, (2008).
- [45] M.L. Bondi, M.R.Y. Al-Hillo, K. Lamara, S. Ladjel, M. Bruno, F. Piozzi, M.S.J. Simmonds, Occurrence of the antifeedant 14,15-dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria *Biochemical Systematic and Ecology*, 28, 1023-1025, (2000).
- [46] S. Bouderbala, M.L. Senhadji, J. Prost, M.A.L. Dubois, M. Bouchenak, Changes in antioxidant defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*, *Phytomedicine*, 15, 453-461. (2008).
- [47] H. Chen, R.X. Tan, Z.L. Liu, C.Y. Zhao, J. Sun, A Clerodane diterpene with Antibacterial, *Acta Cryst*, 53, 814-816, (1997).
- [48] J. Coll, Y.A. Tandron, X. Zeng, New phytoecdysteroids from cultured plants of *Ajuga nipponensis Makino*, *Steroids*, 72, 270-277, (2007).
- [49] P.M. Khan, A. Malik, S. Ahmad, H.R. Nawaz, Withanolides from *Ajuga parviflora*, *J. Nat. Prod*, 62, 1290-1292, (1999).
- [50] P. M. Khan, H.R. Nawaz, S. Ahmad and A. Malik, Ajugins C and D, New Withanolides from *Ajuga parviflora*, *Helvetica Chimica Acta*, 82, 1432-1426, (1999).
- [51] A. Chaari, H. Ben Jannet, Z. Mighri, M.C. Lallemand and N. Kunesch, 7-O-6'-O-Malonylcachinesidic Acid, a New Macrocyclic Iridoid Ester of Malonic Acid from the Tunisian Plant, *Ajuga pseudoiva*, *J. Nat. Prod*, 65, 618-620, (2002).
- [52] H. Ben Jannet, A. Chaari, Z. Mighri, M.T. Martin, A. Loukaci, Neo-clerodane diterpenoids from *Ajuga pseudoiva* leaves, *Phytochemistry*, 52, 1541-1545, (1999).
- [53] D.L. Madhavi, S. Juthangkoon, K. Lewen, M.D. Berber-Jimenez, M.A.L. Smith, Characterization of anthocyanins from *Ajuga pyramidalis* Metallica Crispa cell cultures, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1170-1176, (1996).
- [54] D. L. Madhavi, M. A. L. Smith, A. C. Linas and G. Mitiku, Accumulation of Ferulic acid in cell cultures of *Ajuga pyramidalis* Metallica Crispa, *J. Agric. Food Chem*, 45, 1506-1508, (1997).
- [55] G. Kökdil, G. Topcu, A. C. Gören, W. Voelter, Steroids and terpenoids from *Ajuga relictata*, *Z. Naturforsch*, 57, 957- 960, (2002).
- [56] L.A. Manguro, S.O. Wagai, P. Lemmen, Flavonol and iridoid glycosides of *Ajuga remota* aerial parts, *Phytochemistry*, 67, 830-837, (2006).
- [57] J. Coll, Y. Tandron, Isolation and identification of neoClerodane Diterpenes from *Ajuga remota* by High performance Liquid Chromatography, *Phytochem. Anal*, 16, 61-67, (2005).

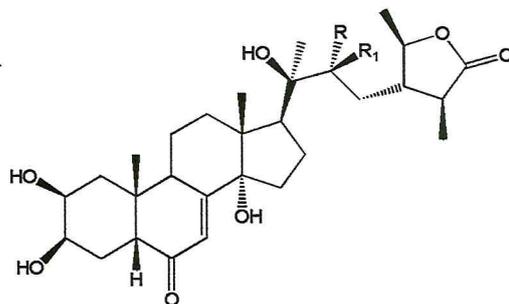
- [58] N. Terahara., A. Callebaut., R. Ohba., T. Nagata., M.O. Kameyama., M. Suzuki, Acylated anthocyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from *Ajuga reptans* flowers and the corresponding cell cultures, *Phytochemistry*, 58, 493–500, (2001).
- [59] T. PFEIFFER., Sexual or clonal origin? A morpho-ecological and molecular analysis in a patch of *Ajuga reptans* L. (Lamiaceae), *Feddes Repertorium*, 116, 3–4, 183–190. (2005).
- [60] A. Kimani, M. Kuria and all, The Antiplasmodial Activity of Isolates from *Ajuga remota*, *J. Nat. Prod.*, 65, 789-793, (2002).
- [61] H. Chen., R.X. Tan., Z.L. Liu., Y. Zhang. Antibacterial neoclerodane diterpenoids from *Ajuga lupulina*. *J. Nat. Prod.*, 59, 668-670, (1996).
- [62] P. Malakov., G.Y. Papanov, Areptins A and B: Two new Neo-Clerodane diterpenoids from *Ajuga*, *Phytochemistry*, 49, 8, 2443-2447, (1998).
- [63] P. Carbonell., J. Coll., Ajugatansins., neo-clerodane diterpenes from *Ajuga reptans*, *Phytochem Anal*, 12, 73–78 (2001).
- [64] M. Takasaki., H. Tokuda., H. Nishino and T. Konoshima., Cancer Chemopreventive Agents (Antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*, *J. Nat. Prod.*, 62, 972-975, (1999).
- [65] P. Quezel ., S. Santa., - Nouvelle flore de L'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, Ed. CNRS, (1963) France-75700 Paris.
- [66] E.K.Twidwell., J.J. Wagner., N.J.Thiex., Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages, *EXEX8077*, 2, (2002).
- [67] P. Franchomme., D .Pénoël., L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. (1990) 445.

Annexes

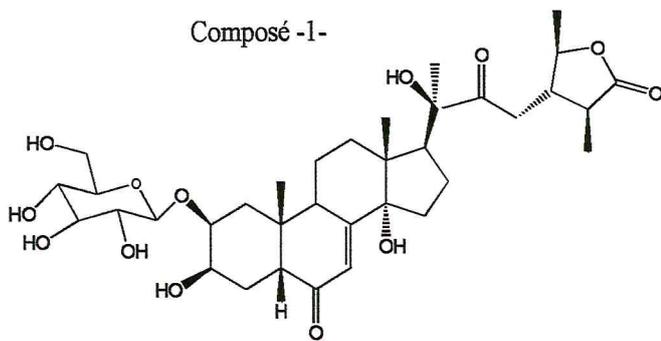
Planche 1: Structures des ecdystéroïdes isolés des espèces du genre *Ajuga*.



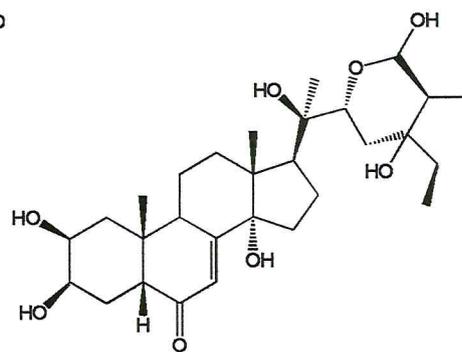
Composé -1-



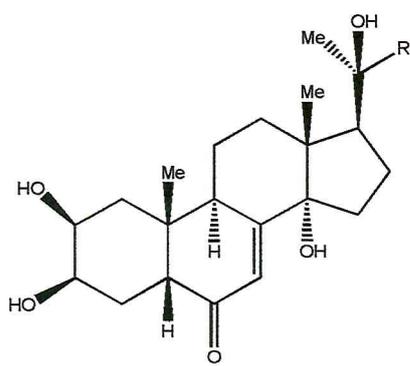
Composé -2-



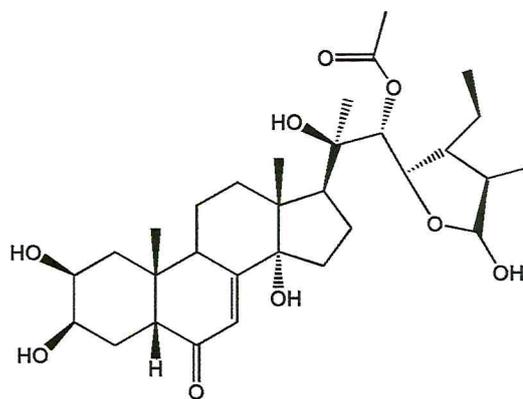
Composé -3-



Composé -4-

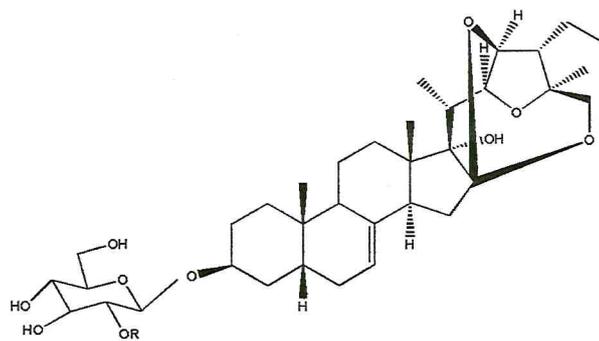


Composé -6-

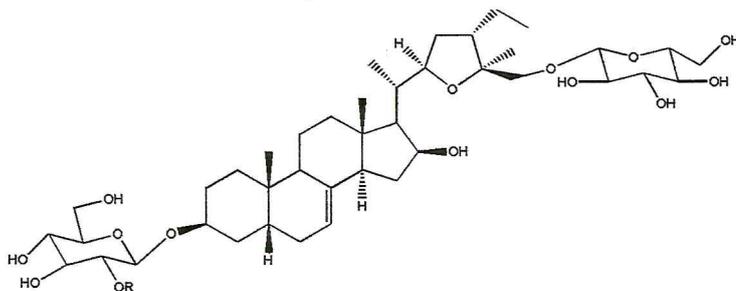


Composé -5-

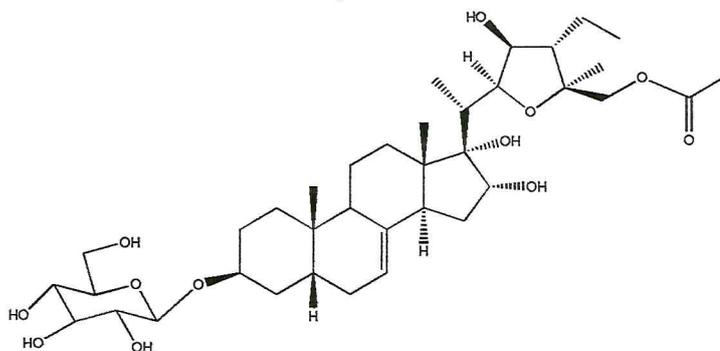
Suite Planche I : Structures des ecdystéroïdes isolés des espèces du genre *Ajuga*



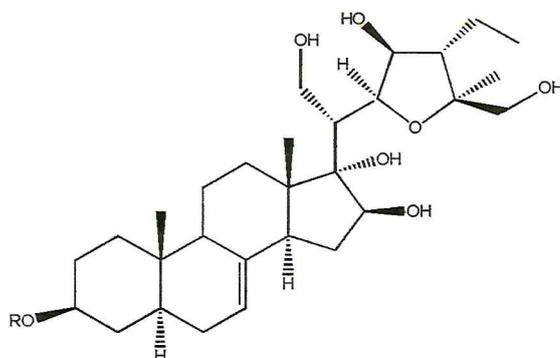
Composé -7-



Composé -8-

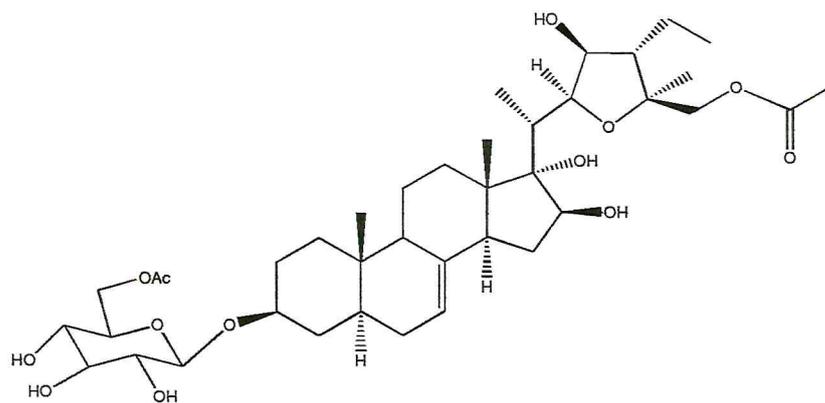


Composé -9-

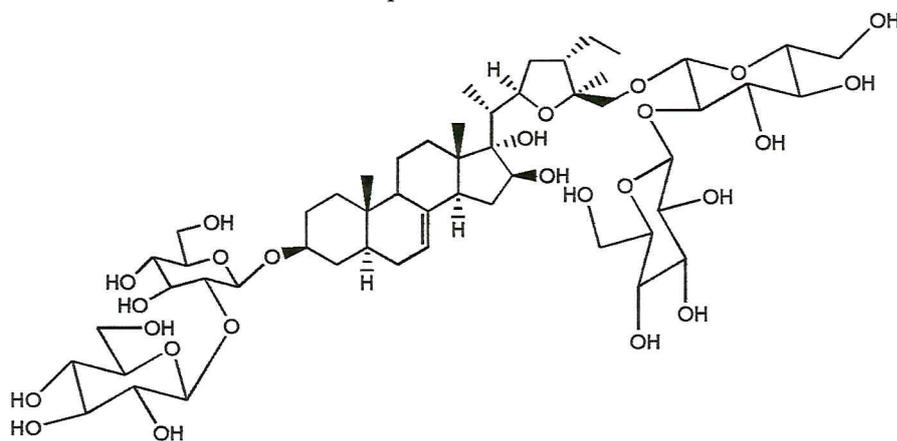


Composé -10-

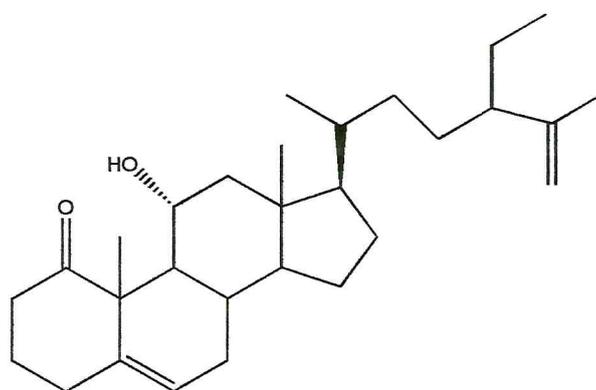
Suite Planche 1: Structures des ecdystéroïdes isolés des espèces du genre *Ajuga*



Composé -11-

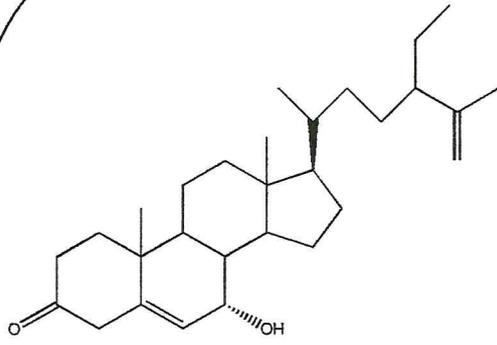


Composé -12-

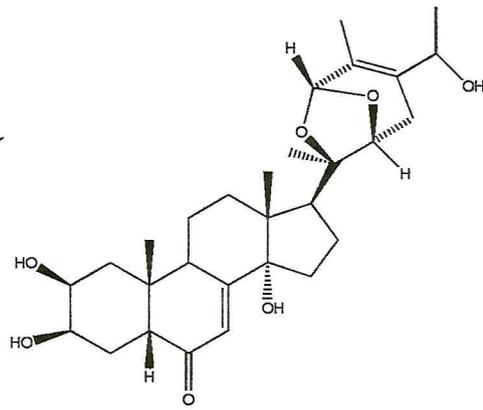


Composé -13-

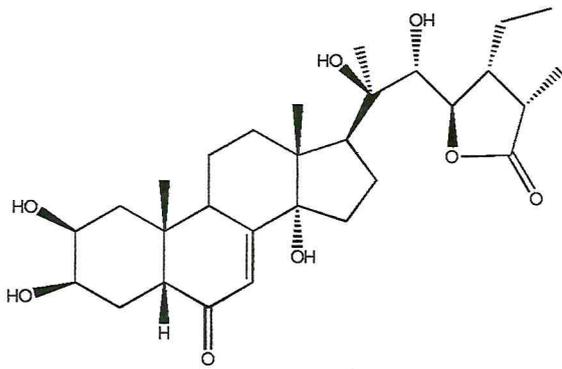
Suite Planche I : Structures des ecdestéroïdes isolés des espèces du genre *Ajuga*



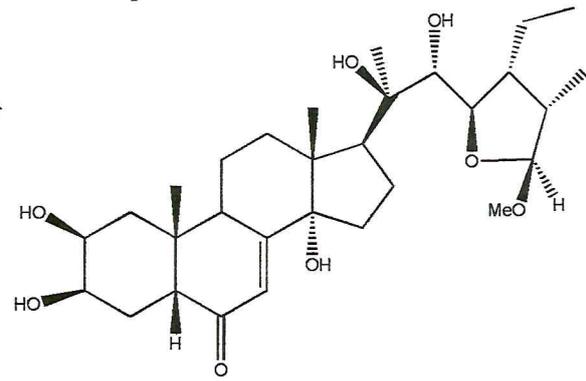
Composé -14-



Composé -15-

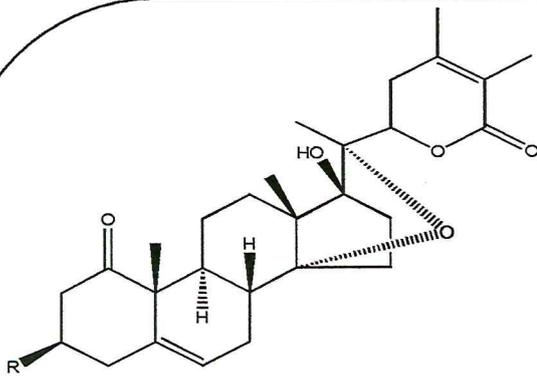


Composé -16-

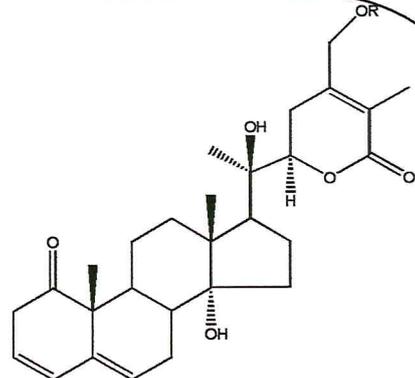


Composé -17-

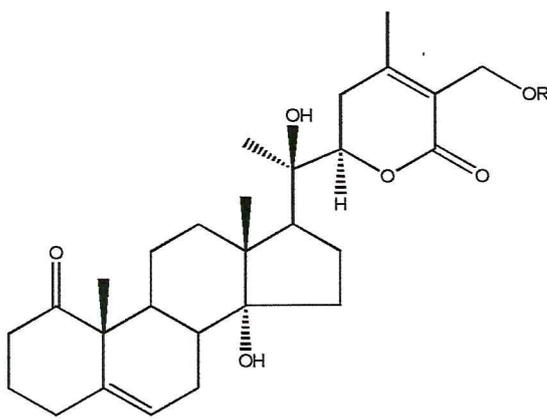
Planche 2 : Structures des withanolides isolés des espèces du genre *Ajuga*.



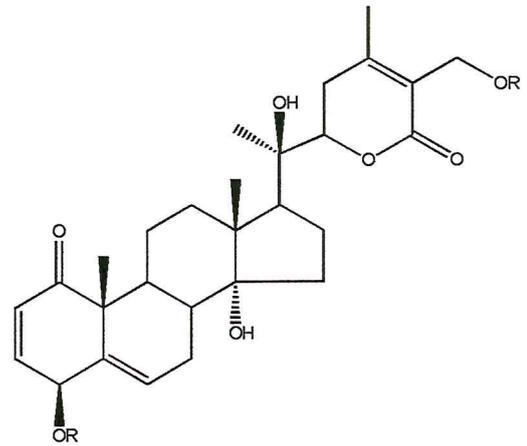
Composé -19-



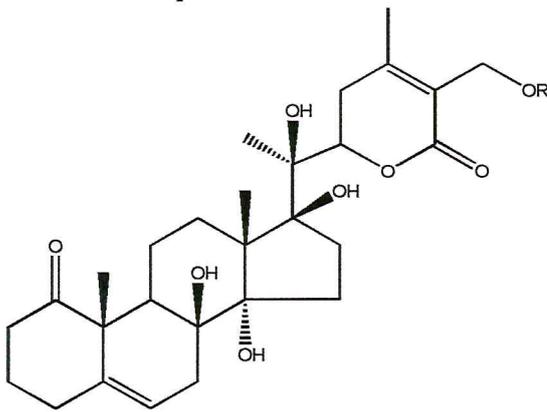
Composé -20-



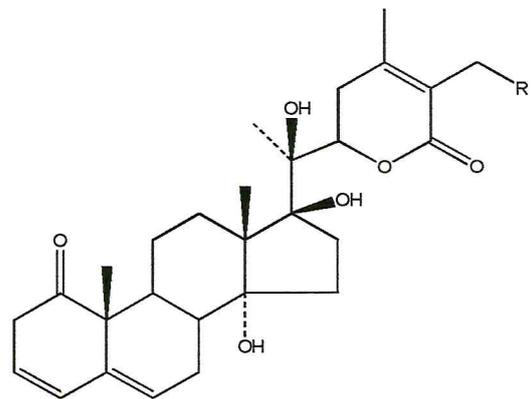
Composé -21-



Composé -22-

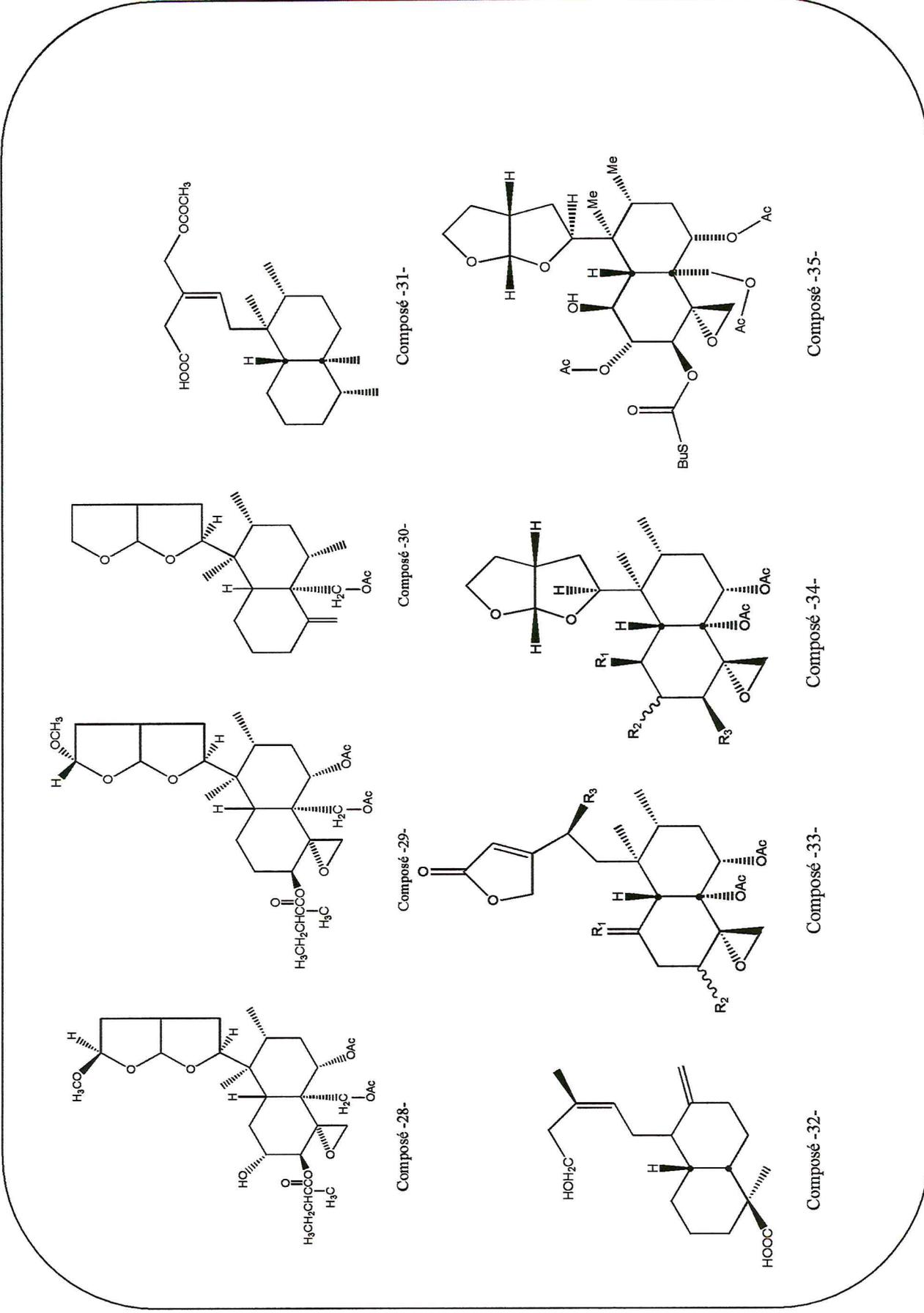


Composé -23-

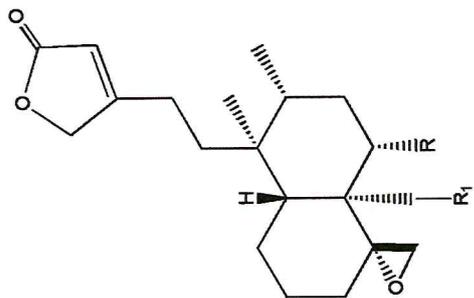


Composé -24-

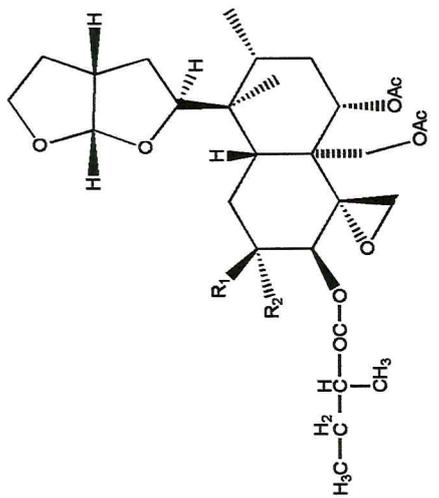
Planche 3 : structures des diterpènes neo-clerodane isolés des espèces du genre *Ajuga* :



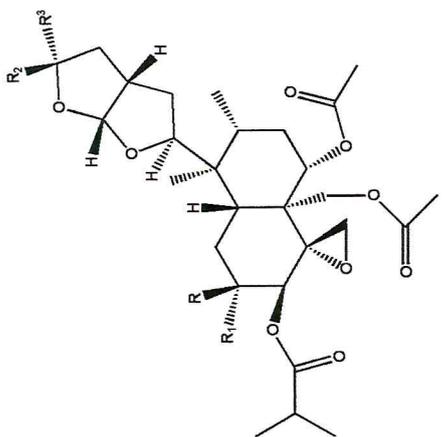
Suite planche 3 : structures des diterpènes neo-clerodane isolés des espèces du genre *Ajuga*



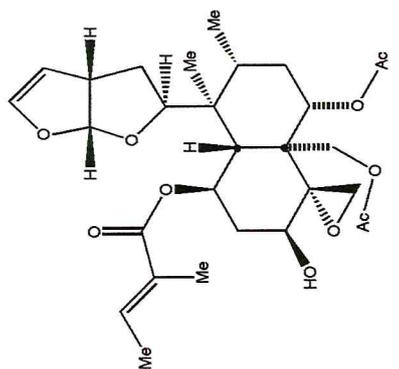
Composé -39-



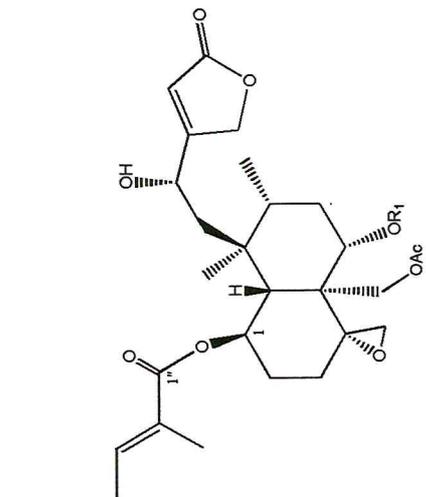
Composé -38-



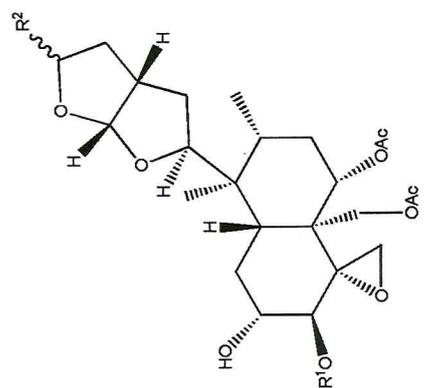
Composé -37-



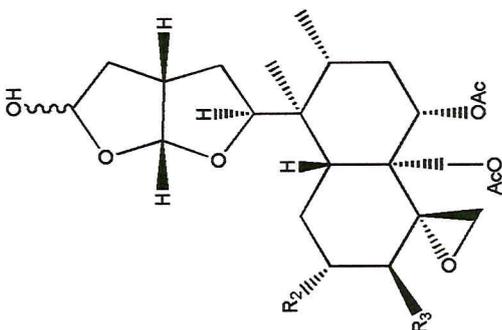
composé -36-



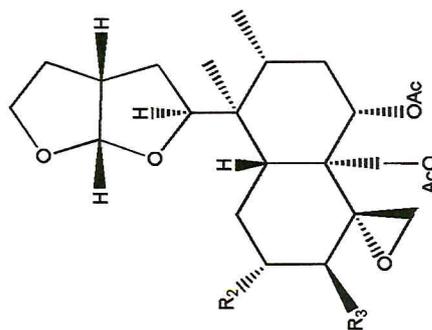
Composé -43-



Composé -42-



Composé -41-



Composé -40-

Suite planche 3 : structures des diterpènes neo-clerodane isolés des espèces du genre *Ajuga*

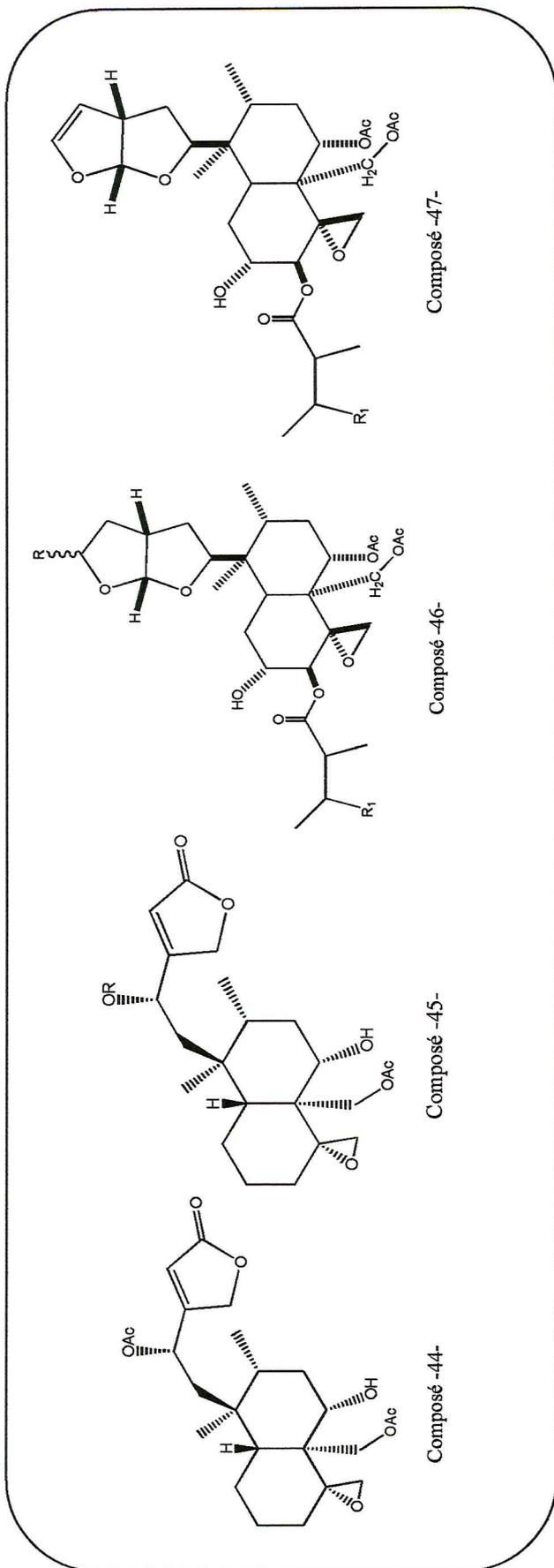


Planche 4: Structures des iridoïdes glucosides isolés des espèces du genre *Ajuga*

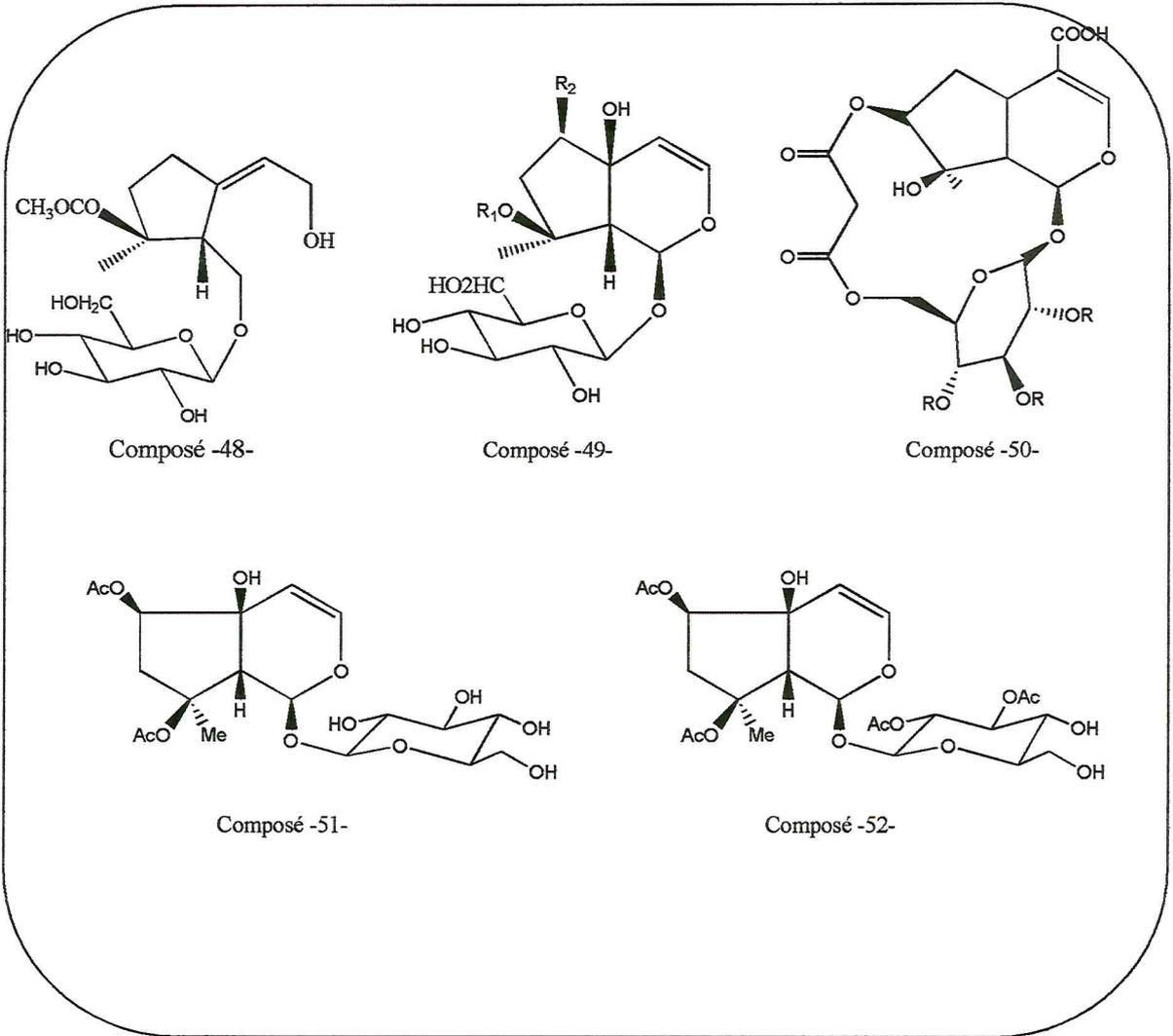
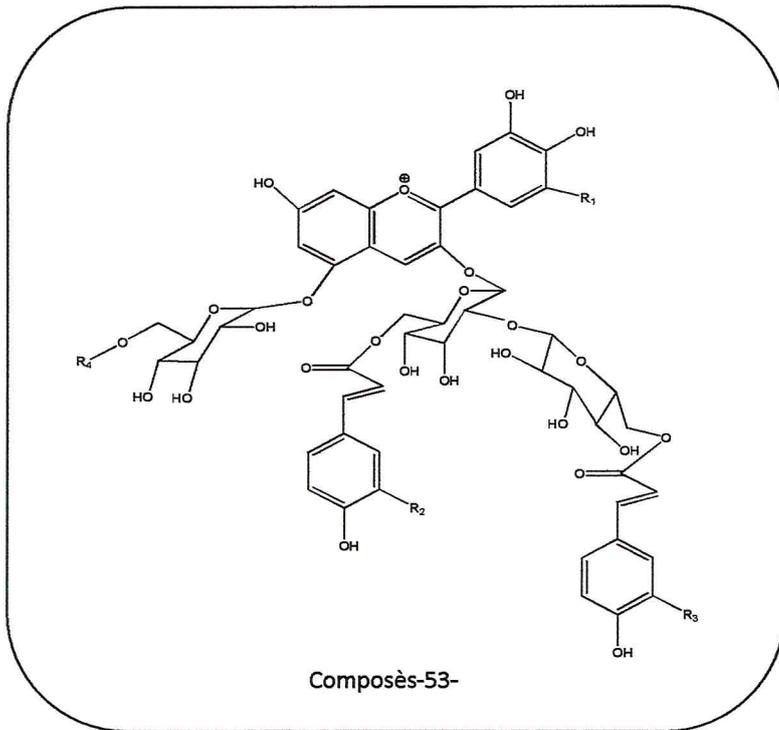
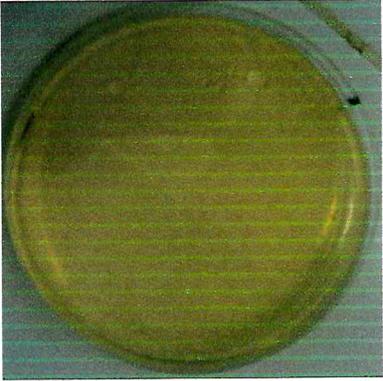
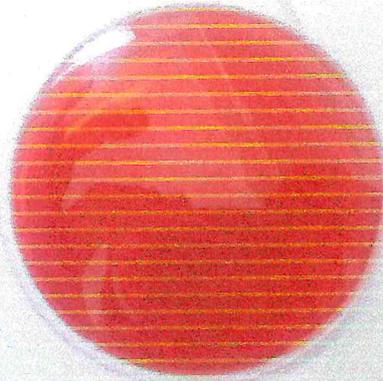
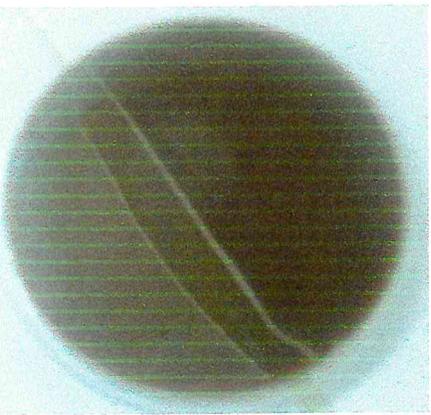


Planche 5 : Structure des anthocyanines glucosidiques isolés des espèces d'*Ajuga* .



• Milieux utilisés pour les testes antibactériens et antifongiques:

Milieu	Composition	Utilisation
<p>Gélose Hektoen</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Extrait de levure.....3g - Protéase peptone.....12g - Lactose.....12g - Saccharose.....2g - Salicine.....2g - Citrate ferrique.....1.5g - Sels biliaires.....9g - Fuchsine acide.....0.1g - Bleu de promothymol.....0.065g - Chlorure de sodium.....5g - Thiosulfate de sodium.....5g - Agar.....13g <p style="text-align: center;">pH= 7.5</p>	<p style="text-align: center;">Isolement des entérobactéries</p>
<p>Gélose Muller Hinton</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Infusion de viande de bœuf déchiquetée.....300g - Hydrolysate de caséine.....17.5g - Amidon de maïs.....1.5g - Agar.....13g - Eau distillée.....1000ml <p style="text-align: center;">pH=7.4</p>	<p style="text-align: center;">Réalisation des testes antibactériens et antifongiques</p>

<ul style="list-style-type: none"> • Gélose nutritive 	<ul style="list-style-type: none"> - Extrait de viande de bœuf.....1g - Extrait de levure.....2g - Peptone.....5g - Chlorure de sodium.....5g - Agar.....15g <p style="text-align: center;">pH= 7.4</p>	<p style="text-align: center;">Milieu d'isolement pour les germes non exigeants</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Gélose au sang frais 	<ul style="list-style-type: none"> - Infusion de cœur et de muscle.....375g - Bothicone.....10g - Chlorure de sodium.....5g - Gélose.....15g <p style="text-align: center;">pH= 7.4</p>	<p style="text-align: center;">Isolement des germes exigeants</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Gélose au sang cuit 	<ul style="list-style-type: none"> - Peptone de caséine.....7.5g - Peptone de vinade.....7.5g - Amidon de maïs.....1g - Phosphate dipotassique.....4g - Chlorure de sodium.....5g - Hémoglobine.....10g - Agar.....10g <p style="text-align: center;">pH= 7.2</p>	<p style="text-align: center;">Isolement des germes exigeants</p>