

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb Blida-1-
Faculté des sciences
Département de chimie



Mémoire de master

Option : Chimie Des Produits Naturels

Intitulé

Criblage phytochimique et évaluation des activités
biologiques des extraits d'une plante
médicinale du genre *Echium*

Présenté par :

BENDJEROUDIB Rahma & CHEKALIL Rahma

Devant le jury :

M^{me} M. AISSAOUI	Maître de conférences B	Présidente
M^{me} R. BOUKAABACHE	Maître de conférences B	Examinatrice
M^{me} C. ESSEID	Maître de conférences B	Promotrice
M^{me} S. HAMICHE	Maître de conférences B	Co-Promotrice

Soutenu le : 10/07/2023

Résumé

Le but principal de ce travail est de déterminer la composition chimique et les effets biologiques des extraits d'une plante médicinale du genre *Echium* appartenant à la famille des Boraginaceae choisie sur la base de son usage traditionnel.

Au cours de cette étude nous avons tout d'abord effectué le screening phytochimique sur les différents extraits des parties aériennes de l'espèce « *Echium trygorrhizum* » par réactions colorées pour déterminer la nature des métabolites secondaires qu'elle accumule. Les résultats ont révélé la présence de flavonoïdes, tanins, di-terpènes, alcaloïdes, saponosides, terpènes, anthraquinones, sucres et stérols. Ainsi que la quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux de ces extraits par les méthodes colorimétriques. Les résultats du dosage indiquent que la teneur en polyphénols est supérieure à celle des flavonoïdes. L'extrait acétate d'éthyle présente la teneur la plus élevée en polyphénols tandis que l'extrait de chloroforme présente la teneur la plus élevée en flavonoïde.

Par ailleurs, nous avons également effectuée une valorisation des activités biologiques par la recherche de l'activité antioxydante sur les différents extraits des parties aériennes de cette espèce, par deux méthodes différentes : la méthode de réduction de radical libre DPPH, et le blanchissement du β -carotène. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur cinq souches bactériennes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus ceureus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, et deux champignon *Candida albicans* et *Aspergillus niger*, selon la méthode de diffusion de disque sur gélose Mueller Hinton pour les bactéries et sabouraud pour les champignons, Les extraits testés ont montré des activités variables contre les bactéries et les champignons.

Mots clés : Activité antioxydante, Polyphénols, Tanins, boragenacea, Antibactérienne.

Abstract

The main objective of this work is to determine the chemical composition and biological effects of extracts from a medicinal plant of the *Echium* genus, belonging to the Boraginaceae family, chosen based on its traditional use.

In this study, we first conducted phytochemical screening on various extracts of the aerial parts of the species "*Echium trygorrhizum*" using color reactions to determine the nature of the secondary metabolites it accumulates. The results revealed the presence of flavonoids, tannins, diterpenes, alkaloids, saponins, terpenes, anthraquinones, sugars, and sterols. We also quantified the total polyphenols and flavonoids in these extracts using colorimetric methods. The assay results indicated that the polyphenol content was higher than that of flavonoids. The ethyl acetate extract showed the highest polyphenol content, while the chloroform extract showed the highest flavonoid content.

Furthermore, we also evaluated the biological activities by investigating the antioxidant activity of the various extracts of the aerial parts of this species using two different methods: the DPPH free radical reduction method and the β -carotene bleaching method. The antimicrobial activity was determined against five bacterial strains, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus ceureus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, and two fungi, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*, using the disc diffusion method on Mueller Hinton agar for bacteria and Sabouraud agar for fungi. The tested extracts showed variable activities against the bacteria and fungi.

Keywords : Antioxidant activity, Polyphenols, Tannins, Boraginaceae, Antibacterial.

المخلص

الهدف الرئيسي لهذا العمل هو تحديد التركيب الكيميائي والتأثيرات البيولوجية لمستخلصات نبات طبي من جنس *Echium* التابعة لعائلة Boraginaceae ، تم اختيارها بناءً على استخدامها التقليدي.

خلال هذه الدراسة، أجرينا أولاً فحصاً فيتوكيميائياً على المستخلصات المختلفة من الأجزاء الهوائية لنوع « *Echium trygorrhizum* » باستخدام تفاعلات ملونة لتحديد طبيعة المركبات الثانوية التي تتراكم فيها. أظهرت النتائج وجود فلافونويدات وتانينات وثنائي تريينات وقلويدات وصابونينات وتربينات وأنثراكوينونات وسكريات واستيروولات. بالإضافة إلى تحديد محتوى البوليفينولات والفلافونويدات الإجمالية في هذه المستخلصات باستخدام الأساليب اللونية. أشارت نتائج التحليل إلى أن محتوى البوليفينولات أعلى من محتوى الفلافونويدات. أظهر مستخلص أسيتات الإيثيل أعلى محتوى للبوليفينولات، في حين أظهر مستخلص الكلوروفورم أعلى محتوى للفلافونويدات.

علاوة على ذلك، أجرينا أيضاً تقييماً للأنشطة البيولوجية من خلال البحث عن النشاط المضاد للأكسدة في المستخلصات المختلفة من الأجزاء الهوائية لهذا النوع، باستخدام طريقتين مختلفتين: طريقة اختزال الجذر الحر DPPH ، وتلاشي- β كاروتين. تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على خمسة سلالات بكتيرية (*Escherichia coli* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Bacillus ceureus* ، *Staphylococcus aureus* ، *Salmonella enterica*) و اثنين من أنواع الفطريات (*Candida albicans* و *Aspergillus niger*) باستخدام طريقة الانتشار على وسط Mueller Hinton للبكتيريا ووسط sabouraud للفطريات. أظهرت المستخلصات التي تم اختبارها أنها تظهر أنشطة متفاوتة ضد البكتيريا والفطريات.

الكلمات الرئيسية : النشاط المضاد للأكسدة، البوليفينولات، التانينات، البوراجيناسي، المضادة للبكتيريا.




Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Dieu, le Tout-Puissant, qui m'a accordé le courage, la patience et a illuminé mon chemin tout au long de cette entreprise, pour laquelle je suis infiniment reconnaissant.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à tous les enseignants, Mme S. HAMICHE et Mr. A. MEZRAG, ainsi qu'à tous les intervenants, qui ont généreusement partagé leur savoir et leur expertise. Je tiens également à remercier chaleureusement toutes les personnes qui, par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques, ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et de répondre à mes questions tout au long de mes recherches. Je suis reconnaissant envers Mme C. ESSEID, notre promotrice, pour son précieux encadrement.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers Mme M.AISSAOUI pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury. De même, nous souhaitons exprimer notre reconnaissance envers Mme R.BOUKAABACHE pour avoir accepté d'examiner attentivement ce travail.



Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers mes parents bien-aimés, qui ont toujours été présents à mes côtés. Je souhaite également remercier chaleureusement mes frères, MOHAMED, ABDERAHMAN et AMINE, pour leurs encouragements constants. Enfin, mes amis méritent également mes remerciements sincères.

Rahma.B

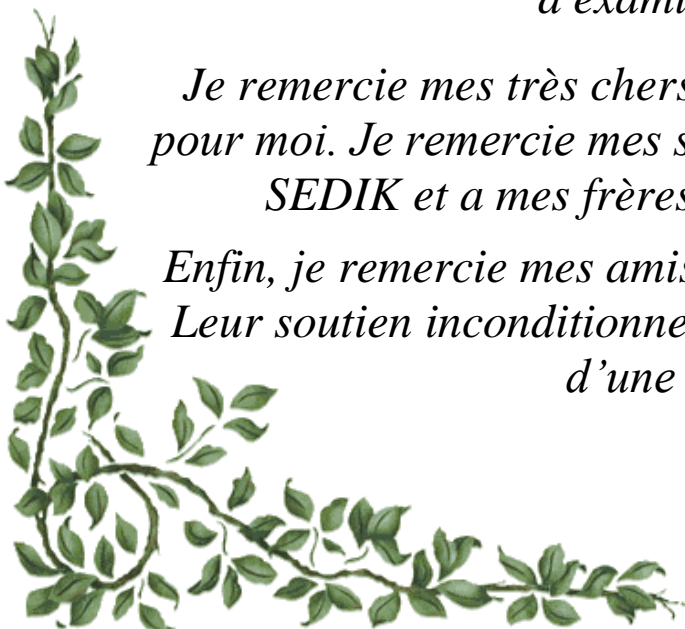


Remerciements

Le grand merci revient encore et toujours à notre DIEU le tout puissant qui m'a donné le courage et la patience et qui a éclairé mon chemin pour achever ce travail.

Je suis profondément reconnaissant envers tous les enseignants, en particulier Mme S. HAMMICHE et Mr. A. MEZRAG, ainsi que tous les intervenants, pour avoir généreusement partagé leur précieux savoir et leur expertise. Je souhaite exprimer une gratitude sincère et ardente envers toutes les personnes qui, par leurs paroles percutantes, leurs écrits éclairés, leurs conseils avisés et leurs critiques constructives, ont illuminé mon chemin et ont accepté de me rencontrer et de répondre patiemment à mes questions tout au long de mes recherches. Je suis indéfectiblement reconnaissant envers Mme C. ESSEID, notre promotrice, pour son encadrement d'une valeur inestimable.

Nous souhaitons exprimer nos sincères remerciements à Mme M. AISSAOUI pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'être présidente du jury. De plus, nous tenons également à remercier Mme R. BOUKAABACHE d'avoir accepté d'examiner ce travail.



Je remercie mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi. Je remercie mes sœurs SAMIRA et KARIMA, a mon SEDIK et a mes frères pour leurs encouragements. Enfin, je remercie mes amis qui ont toujours été là pour moi. Leur soutien inconditionnel et leurs encouragements ont été d'une grande aide.

Rahma.C

Liste des figures

Figure I.1 : Distribution géographique de la famille Borraginacées.....	5
Figure I.2 : Structure de base des flavonoïdes.....	12
Figure II.1 : Les feuilles de la plante d' <i>Echium trygorrhizum</i>	16
Figure II.2 : Planche extraite de la <i>Flore du Sahara</i> de Paul Ozenda.....	17
Figure II.3 : Fleures de laPlante <i>Echium trygorrhizum</i>	18
Figure II.4 : <i>Echium trygorrhizum</i> Pomel.....	19
Figure II.5 : protocole d'extraction de <i>Echium trygorrhizum</i>	21
Figure II.6 : les étapes de dosages des polyphénols totau.....	25
Figure II.7 : Réaction du Chlorure d'aluminium et les flavonoïdes.....	26
Figure II.8 : résume le protocole de dosage des flavonoïdes totaux.....	27
Figure II.9 : Réaction radicalaire DPPH• avec un représentés antioxydant.....	28
Figure II.10 : schéma de protocole d'activité anti oxydante avec DPPH.....	30
Figure II.11 : schéma de protocole d'activité anti oxydante avec BCB.....	32
Figure II. 12 : Principe de la méthode de diffusion par disque.....	34
Figure III.1 : droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	54
Figure III.2 : la teneur en polyphénols des extraits de <i>Echium Trygorrhizum</i>	54
Figure III.3 : droite d'étalonnage de la quercitine.....	55
Figure III.4 : la teneur en flavinoides des extraits de <i>Echium Trygorrhizum</i>	56
Figure III.5 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des quatre extraits de <i>Echium Trygorrhizum</i>	57
Figure III.6 : courbe d'activité antioxydante des extraits et l'acide ascorbique.....	58
Figure III.7 : valeur IC50% des extraits <i>Echium Trygorrhizum</i> et de compose standard acide ascorbique.....	59
Figure III.8 : cinétique de l'inhibition de blanchissement du β -carotène par l'extrait d' <i>Echium Trygorrhizum</i> et du témoin positif BHT.....	60
Figure III.9 : Activité antioxydante relative des extraits d' <i>Echium Trygorrhizum</i> et du BHT dans le système β -carotène/acide linoléique.....	61
Figure III.10 : résultats des activités antibactériennes et antifongiques des extraits étudiées..... ;;	66
Figure III.10 : résultats des activités antibactériennes et antifongiques des extraits étudiées (suite).	66

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Exemples des rôles biologiques des composés phénoliques	10
Tableau I.2 : Structures chimiques de certains composés phénoliques.....	13
Tableau II.1 : préparation des solutions mères.....	29
Tableau II.2 : préparation d'une gamme de solutions filles.....	30
Tableau II.3 : Les différents microorganismes testés.....	35
Tableau III.1 : Masses et rendements des extraits.....	39
Tableau III.2 : les métabolites secondaires dans l'extrait chloroformique.....	40
Tableau III.2 : Les métabolites secondaires existent dans l'extrait chloroforme (Suite 1).....	41
Tableau III.2 : Les métabolites secondaires existent dans l'extrait chloroforme (Suite 2).....	42
Tableau III.2 : Les métabolites secondaires existent dans l'extrait chloroforme (Suite 3).....	43
Tableau III.3 : les métabolites secondaires dans l'extrait acétate.....	43
Tableau III.3 : les métabolites secondaires existent dans l'extrait acétate d'éthyle (Suite 1).....	44
Tableau III.3 : les métabolites secondaires existent dans l'extrait acétate d'éthyle (Suite 2).....	45
Tableau III.3 : les métabolites secondaires existent dans l'extrait acétate d'éthyle (Suite 3).....	46
Tableau III.4 : les métabolites secondaires dans l'extrait n-butanol.....	47
Tableau III.4 : les métabolites secondaires existent dans l'extrait <i>n</i> -butanol (Suite 1).....	48
Tableau III.4 : les métabolites secondaires existent dans l'extrait <i>n</i> -butanol (Suite 2).....	49
Tableau III.5 : les métabolites secondaires dans l'extrait éther de pétrole	50
Tableau III.5 : les métabolites secondaires existent dans l'extrait éther de pétrole (Suite 1).....	51
Tableau III.5 : les métabolites secondaires existent dans l'extrait éther de pétrole (Suite 2).....	52
Tableau III.5 : les métabolites secondaires existent dans l'extrait éther de pétrole (Suite 3).....	53
Tableau III.6 : les valeurs d'absorbance des extraits d' <i>Echium Trygorrhizum</i>	54
Tableau III.7 : les teneurs en polyphénols des différents extraits d' <i>Echium Trygorrhizum</i>	55
Tableau III.8 : les valeurs d'absorbance des différents extraits d' <i>Echium Trygorrhizum</i>	56
Tableau III.9 : les teneurs en flavonoïdes des différents extraits d' <i>Echium Trygorrhizum</i>	56
Tableau III.10 : pourcentage d'inhibition des extraits et de l'acide ascorbique selon différentes concentration	57
Tableau III.11 : la concentration (IC ₅₀) pour les différents extraits et l'acide ascorbique	58
Tableau III.12 : les valeurs d'absorbance des extraits (BCB).....	60
Tableau III.13 : les valeurs d'AA% pour les différents extraits et le BHT	60
Tableau III.14 : Diamètre de la zone d'inhibition des différents extraits d' <i>Echium Trygorrhizum</i>	62

Liste des abréviations

AA% : pourcentage d'activité antioxydant

Abs : absorbance

AG : acide gallique

ATB : antibiotique

ATF : antifongique

ATCC : American Type Culture Collection

BCB : β -carotène blanchissement

BHT : Hydroxytoluène butylé

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DO : Densité optique.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

Ext.ACOEt : l'extrait acétate d'éthyle

Ext.CHCl₃ : extrait chloroformique

Ext.n-BuOH : extrait n-butanolique

EQ : équivalent de quercétine

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

Mg EAG/g Ps : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme du poids sec de la plante

Mg EQ/g Ps : Milligramme d'équivalent quercétine par gramme du poids sec de la plante

MH : Mueller Hinton agar

Pb(OAc) : tétracétate de plomb

PI(%) : Le pourcentage d'inhibition

PS : poids sec de l'extrait.

Q : quercétine

R (%) : Rendement.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. les plantes médicinales.....	3
I.1.1. Généralités.....	3
I.1.2. Les plantes en médecine moderne.....	3
I.2. La famille de Boraginacées	4
I.2.1. Définition.....	4
I.2.2. Utilisation traditionnelle	4
I.2.3. La taxonomie.....	4
I.2.4. Les plantes appartenant à la famille des Boraginacées	5
I.2.5. La distribution géographique.....	5
I.3. Les plantes du genre <i>Echium</i>	6
I.3.1. Définition et caractérisation des plantes du genre <i>Echium</i>	6
I.3.2. Propriétés et usages thérapeutiques des plantes du genre <i>Echium</i>	6
I.4. Les substances actives des plantes médicinales.....	7
I.4.1. Métabolites secondaires chez les végétaux	7
I.4.1.1. Principes généraux de classification des métabolites secondaires.....	7
I.4.1.2. Classification des métabolites secondaires.....	8

Chapitre II : Etudes chimiques et biologiques de la plante

II. Etude phytochimique et biologique de la plante étudié	16
II.1- Etude bibliographique de la plante.....	16
II.2. Etude phytochimique du <i>Echium trygorrhizum</i> Pomel	19
II.2.1. Récolte du matériel végétal.....	19
II.2.2. Extraction de la plante <i>Echium trygorrhizum</i>	19
II.2.3. Screening phytochimique (Travail personnel).....	22

II.2.3.1. Caractérisation générale des extraits de <i>Echium</i>	22
II.3. Etude quantitatives	23
II.3.1. Dosage des polyphénols totaux	23
II.3.1.1. Principe	24
II.3.1.2. Mode opératoire	24
II.3.1.3. Procédure expérimentale.....	24
II.3.2. Dosage des flavonoïdes	26
II.3.2.1. Principe	26
II.3.2.2. Mode opératoire	26
II.3.2.3. Procédure expérimentale.....	27
II.4. Etude biologique de <i>Echium trygorrhizum</i>	28
II.4.1. Evaluation de l'activité antioxydant.....	28
II.4.1.1. La méthode de piégeage du radical libre DPPH•.....	28
II.4.1.1.1. Principe	28
II.4.1.1.2. Mode opératoire	29
II.4.1.2. Méthode de blanchissement du β -carotène BCB.....	30
II.4.1.2.1. Principe	31
II.4.1.2.2. Mode opératoire	31
II.5.1. Evaluation de L'activité antimicrobienne	33
II.5.1.1. Principe de la méthode	33
II.5.1.2. Provenance des souches testées.....	34
II.5.1.3. protocole expérimental	36

Chapitre III : Résultats et discussions

III. Étude phytochimique	39
III.1. Rendement de l'extraction	39
III.2. Screeninge phytochimique	39
III.3. Résultats de l'étude quantitatives.....	53
III.3.1. Dosage des polyphénols totaux	53
III.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux	55
III.4. Résultats des tests biologiques	57
III.4.1. Activité antioxydant	57
III.4.1.1. Résultats d'activité antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH....	57
III.4.1.2. Résultats d'activité antioxydant par la méthode blanchissement du BCB	59

III.4.2. Résultat de l'évaluation de l'activité antimicrobienne	61
III.4.2.1. Résultats du test préliminaire	62
III.4.2.2. Activité antibactérienne des extraits bruts par la méthode des disques	62
Conclusion générale.....	67
Références bibliographiques	

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes ont depuis longtemps présenté un rôle très important pour l'humanité, car elles peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes dotées souvent d'activités biologiques potentielles. Elles constituent des merveilleuses usines végétales qui nous donnent la joie de guérir par un geste thérapeutique. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes [1].

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constitutions des plantes sont utilisés directement comme agent thérapeutique, mais aussi comme matière première pour la synthèse de médicaments ou comme modèle pour les composés pharmacologiquement actifs [2].

Les extraits de plantes médicinales contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribués diverses activités biologiques dont l'activité antioxydant et antimicrobienne [3]. L'utilisation d'extraits de plantes et des composés d'origine végétale est des sources précieuses pour la médecine traditionnelle dans le traitement et la prévention d'un large éventail de maladies ; notamment des maladies infectieuses [4].

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, on trouve assez des espèces de la famille des Boraginaceae, qui sont également largement distribuées dans les régions méditerranéennes, dont certaines d'entre eux sont des espèces spécifiques des zones magrébines.

Le screening ou le criblage phytochimique joue un rôle essentiel dans la caractérisation des groupes de familles chimiques dans une plante donnée, par contre, il ne permet pas d'identifier ou de déterminer la structure chimique des composés présents.

Bien qu'un grand nombre d'espèces végétales aient été traditionnellement utilisées pour le traitement de diverses maladies et pour de nombreuses autres activités bénéfiques, la plupart d'entre elles n'ont pas été étudiées scientifiquement. En effet, bon

nombre de ces espèces sont chimiquement inconnues et peuvent être dangereuses pour la santé humaine.

L'utilisation de plantes médicinales à des fins thérapeutiques est en augmentation dans le monde, mais la majorité des gens ne sont certainement pas conscients des effets secondaires possibles de ces plantes, ni comment et quand elles peuvent être utilisées en toute sécurité de diverses manières. Malgré les bienfaits thérapeutiques des plantes médicinales, certains constituants d'un certain nombre de plantes médicinales sont connus pour être potentiellement toxiques, cancérigènes et tératogènes [5].

Certaines plantes médicinales peuvent être utilisées en toute sécurité à des doses thérapeutiques, mais celles qui n'ont pas encore été étudiées scientifiquement doivent être utilisées avec prudence.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'étude chimique et biologique d'une espèce médicinale du genre *Echium* appartient à la famille des Boraginaceae, choisie sur la base de son usage traditionnel. Notre travail sera reparti en trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à la synthèse bibliographique, la description de la famille des boraginaceae et particulièrement le genre *Echium*, et ses métabolites secondaires.
- Le second chapitre est consacré aux travaux expérimentaux qui comportent : Screening phytochimique, extraction, le dosage polyphénols et flavonoïdes ainsi la mise en évidence de l'activité antioxydante des extraits par deux méthodes (Teste DPPH, et Test de blanchissement du β -carotène), et l'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits de notre plante.
- Le dernier chapitre regroupe les différentes observations et la discussion des résultats obtenus.

Nous terminerons notre étude par une conclusion générale.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

I.1. Les plantes médicinales

I.1.1. Généralités

Les végétaux constituent depuis longtemps une importante ressource naturelle pour les sociétés humaines. Ils servent à la fois pour l'alimentation et la confection d'autres biens de consommations nécessaires aux sociétés [6].

Les extraits bruts des plantes font l'objet des études pour leur éventuelle utilisation dans la préparation des produits cosmétiques, des parfums, des arômes et comme des alternatives dans le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation. Ils interviennent dans la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif tels que les cancers, la cataracte, l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension artérielle, les maladies neuro-dégénératives, l'arthrite....ect [7].

L'approvisionnement en produits d'origine naturelle devra de plus en plus se faire en tenant compte des contraintes écologiques : produits non pollués et obtenus sans destruction des gîtes naturels [8].

I.1.2. Les plantes en médecine moderne

L'usage des plantes en médecine est très ancien, où les animaux sauvages utilisent instinctivement certaines plantes pour se soigner ! Aujourd'hui, pour que la médecine traditionnelle puisse porter ses fruits à une large échelle, et de manière encore plus efficace, il lui faut rencontrer la médecine dite « moderne » où l'homme a développé des procédés d'extraction qui ont permis la fabrication de médicaments à partir d'agents phytochimiques extraits des plantes [6].

L'avenir des substances naturelles biologiquement intéressantes passe par la poursuite des études chimiques et pharmacologiques classiques de la matière, mais aussi par le développement des études biotechnologiques. Il n'est pas superflu d'insister une fois de plus sur l'importance primordiale de la systématique pour connaître parfaitement et identifier le matériel vivant. Sans elle, rien ne pourrait ici se faire intelligemment [8].

I.2. La famille des Boraginaceae

I.2.1. Définition

Les Boraginaceae sont des angiospermes, comprenant 1600 espèces réparties en 110 genres, on y trouve des herbes annuelles, arbustes et arbres. Les feuilles sont souvent entières, simples, alternées et ex-stipulées, possèdent des tiges avec des poils rigides qui donnent une sensation rugueuse. Les cellules des feuilles possèdent des cristaux d'oxalate de calcium. Les fleurs, qui sont le plus souvent hermaphrodites, ont un calice à lobes imbriqués et une corolle tubuleuse campanulée, divisée en 5 lobes relativement réduits et munis d'écailles ou de poils au centre [9].

La classe des alcaloïdes pyrrolizidiniques constitue un marqueur chimio-taxonomique important des Boraginaceae car on le retrouve quasi systématiquement dans les genres qui forment cette grande famille [10].

I.2.2. Utilisation traditionnelle

Les différentes parties (feuilles, fleurs et racines) de plusieurs plantes de la famille de Boraginaceae sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter : les blessures, les maladies de la peau (soulagement des brûlures), de la fièvre, des douleurs thoraciques, abdominales et articulaires, l'hypotension, inflammation des yeux, infection de l'oreille, arthrite. Elles présentent également des activités antispasmodiques, antibactériennes, antihelminthique, anti-hémorragique, antiseptique, diurétique, cataplasme aux plaies courantes et aux maladies vénériennes, etc.... [11].

I.2.3. La taxonomie

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Angiospermae

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Boraginaceae

I.2.4. Les plantes appartenant à la famille des Boraginacées

On estime aujourd'hui que les Boraginaceae regroupent 1600 à 1700 espèces en 90 à 120 genres. Parentés et familles proches à inclure sont discutées selon les classifications. Selon la phylogénie, les Boraginacées au sens large (en incluant les familles proches) peuvent être divisées en 6 sous-familles :

1. sous-famille **Boraginoideae** ex Symphytum, les consoudes, Myosotis, Brunera, Lindelofia, mertensia, Cynoglossum, Pulmonaria, Anchusa, Echium...
2. sous-famille **Cordioideae** ex, Cordiasubcordata un arbre appelé Le Tou.
3. sous-famille **Ehretioideae** ex genre *Ehretia* ou genre *Bourreria* qui produit des baies.
4. sous-famille **Heliotropioideae** (450 espèces) qui pourrait être reconsidérée en tant que famille distincte. Ex genres *Helotropium* et *Euploca*.
5. sous-famille **Hydrophylloideae** ex la *Phacélie*, utilisée comme engrais vert et les *Nemophila*, de jolies fleurs annuelles cultivées.
6. sous-famille **Lennooideae** 3 genres *Ammobroma*, *Lennoa* et *Pholisma*, qui sont des plantes parasites du continent américain.

I.2.5. La distribution géographique

Les Boraginaceae ont une distribution cosmopolite. Les genres d'arbres sont pantropicales et subtropicale, tandis que les genres d'herbacées sont distribués dans le monde entier bien que particulièrement abondants dans la région méditerranéenne et en Asie tempérée chaude. Ils se produisent dans un large éventail d'habitats à partir du niveau de la mer à plus de 4000 m d'altitude [12].

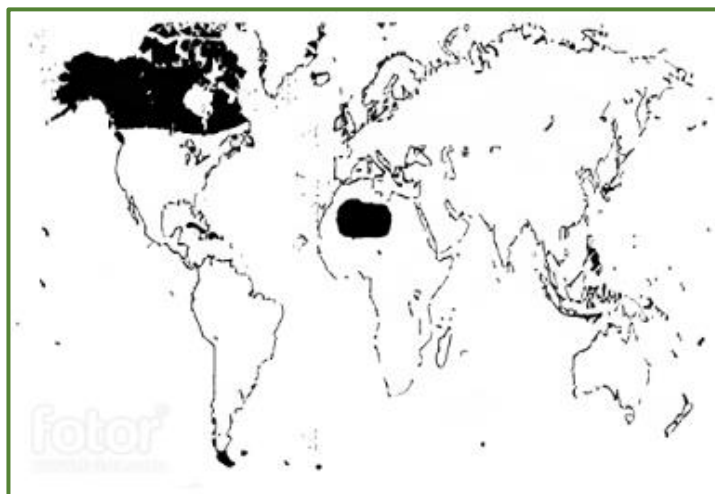


Figure I.1 : Distribution géographique de la famille Boraginacées [32].

I.3. Les plantes du genre *Echium***I.3.1. Définition et caractérisation des plantes du genre *Echium***

Le genre *Echium* contient deux nœuds évolutifs distincts : les espèces à prédominance ligneuse de l'archipel macaronésien (comprenant quelque 25 espèces) et les espèces herbacées qui sont principalement distribuées en Europe et en Afrique du Nord (totalisant, peut-être, quelque 25 espèces). Au sein de ce dernier groupe, les principaux centres de diversité des espèces sont la péninsule ibérique avec environ 16 espèces, et l'Afrique du Nord-Ouest (en particulier le Maroc) avec 20 espèces, tandis qu'un groupe secondaire de taxons est présent en Méditerranée orientale qui comprend le complexe polymorphe *E. angustifolium*. [13].

Les espèces d'*Echium* présentent la caractéristique commune des boraginacées de posséder deux types de trichomes : des soies plutôt robustes à base de tubercules et des poils simples, ces derniers formant généralement une sous-couche lorsque les soies sont denses. La nature et l'abondance relative de ces types de trichomes sont d'une importance taxonomique puisque l'indument donne une apparence distinctive à de nombreuses espèces. , ainsi, chez *E. albicans* les soies relativement clairsemées et les poils très denses, blanchâtres, apprimés donnent un aspect blanchâtre-cinéreux distinctif à cette espèce. De même, la présence de soies denses, blanchâtres et perméables, en particulier celles du calice, contribue au faciès caractéristique d'*E. bumile*. [14].

I.3.2. Propriétés et usages thérapeutiques des plantes du genre *Echium*

Les espèces d'*Echium* ont été utilisées comme médecines populaires à travers l'endémie répartition géographique des archipels d'Asie, d'Europe et de Macaronésie.

Les espèces du genre *Echium*, Ce sont des plantes sauvages, originaires d'Afrique du Nord. Traditionnellement utilisées dans la médecine populaire algérienne pour le traitement de la jaunisse, du diabète et de l'amygdalite. L'utilisation de plantes médicinales à des fins thérapeutiques est en augmentation dans le monde.

Parmi la plante parties, les racines sont les plus utilisées, suivies des parties aériennes. Les espèces d'*Echium* exercent un effet sédatif, propriétés pharmacologiques anti-inflammatoires, antioxydantes et anxiolytiques. En conséquence, ces espèces sont largement utilisées pour traiter les problèmes respiratoires, les ulcères, les troubles de santé mentale et pour aider à la cicatrisation des plaies [15].

I.4. Les substances actives des plantes médicinales

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites :

- **Les métabolites primaires :**

Sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes : les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques [16].

- **Les métabolites secondaires :**

Sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes [17]. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions externes. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. On trouve ces métabolites dans toutes les parties de la plante, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre.

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches pour leurs intérêts multiples. Ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires [18].

Donc, les plantes médicinales doivent leur action à un ou plusieurs principes actifs que l'on peut analyser chimiquement et qu'il est indispensable de les connaître pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme [19].

I.4.1. Métabolites secondaires chez les végétaux

I.4.1.1. Principes généraux de classification des métabolites secondaires

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- Les alcaloïdes et composés azotés.
- Les composés phénoliques.
- Les composés terpéniques.

Auxquelles on ajoute classiquement :

- La catégorie des hétérosides, constituée de dérivés glycosylés de composés terpéniques, phénoliques et plus rarement d'alcaloïdes. Ces glycosylations affectent largement leurs propriétés biochimiques (dont l'extractibilité dans différents solvants) mais également leurs effets biologiques (toxicité, propriétés pharmacologiques).
- Les molécules désignées sous le terme de « composés mixtes » ou « composés d'origine mixte », qui correspondent à des condensations de molécules provenant des catégories citées plus haut. Mais souvent, les composés mixtes peuvent être rattachés à l'une des catégories précédentes.

On distingue enfin d'autres familles de métabolites secondaires plus restreintes en termes de nombre de composés et de nombre d'espèces végétales concernées (désignée parfois comme la catégorie des « miscellaneous compounds »). On peut citer par exemple les composés dérivés du soufre présents dans les Aillacées, mais également chez certaines algues et plantes maritimes.

Dans chacune de ces grandes catégories, on distingue quantité de catégories inférieures. Les classifications sont généralement basées sur :

- La nature biochimique des molécules, leurs propriétés et effets biologiques (dans le cas des alcaloïdes).
- et/ou de leur origine biosynthétique.

I.4.1.2. Classification des métabolites secondaires

I.4.1.2.1. Les composés phénoliques

Ils se caractérisent par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside [20].

I.4.1.2.2. La biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromatisation :

- La voie la plus courante est celle qui, via le shikimate (l'acide shikimique) conduit des oses aux amino-acides aromatiques (phénylalanine (Phe), la tyrosine (Tyr) et le tryptophane (Trp)). puis par désamination de ces derniers aux acides cinnamiques et à des très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines, etc... [21].

Cette voie débute par la condensation d'un érythro-4-phosphate (prélevé sur la voie des pentoses) et d'un phosphoénolpyruvate (produit de la glycolyse) pour former un composé hétérocyclique à sept carbones, le 3-désoxy-D-arabino-heptulonate-7-phosphate (DAHP) qui après déphosphorylation, déshydratation et réduction, donne du shikimate. Une série de réactions assure ensuite l'accrochage d'une chaîne latérale et la création d'une double liaison sur le cycle, d'où le chorismate. Toutes ces réactions, dont certaines exigent de l'ATP, sont catalysées par des synthases [22].

- L'autre voie, voie de l'acétate et conduit à des poly- β -cétosters de longueur variable, les polyacétates, qui engendrent par cyclisation (réaction de CLAISEN ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, xanthes, quinones, etc...

La diversité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétiques est encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte (flavonoïdes lato sensu, stilbènes, pyrones, xanthes, etc...) [23].

I.4.1.2.3. Rôles biologiques

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés biologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépato-protective, antivirale, antibactérienne, anti-carcinogénique, anti-thrombotique, cardio-protective et vasodilatatoire (Tableau I.1). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène ou décomposition des peroxydes [24].

Tableau I.1 : Exemples des rôles biologiques des composés phénoliques [25].

Composés phénoliques	Activités biologiques
Acides phénoliques	Antifongique, antioxydant, antibactérienne
Tanins	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, anti-diarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur.
Flavonoïdes	Anti-tumorale, anti-carcinogène, anti-inflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur, diurétique.
Coumarines	Anticoagulante, antioxydante, protectrice vasculaire et anti-œdémateuse.
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, antioxydant
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, anti-tumorale, antifongiques et anti-inflammatoires.
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques

I.4.1.2.4. Rôles physiologiques

- Ce sont des pigments permettant la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles et sont impliqués dans les réactions de défense contre les agents pathogènes ou le rayonnement UV.
- Ils sont engagés dans les processus de germination, floraison, tubérisation et la croissance racinaire.
- Le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec diverses hormones végétales de croissance [26].

I.4.1.2.5. Classification des composés phénoliques**1. Les non flavonoïdes****a. Les acides phénoliques :**

Le terme d'acide-phénolique peut s'appliquer à tous les composés possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique [23].

b. Les coumarines :

Tirent leur nom de « coumarou » nom vernaculaire de la fève tonka, d'où fut isolée en 1820. Ce sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone [16].

c. Les lignanes :

Ce terme désigne habituellement des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbone- β des chaînes latérales de deux unités dérivés du 1-phénol propane (liaison 8-8'). On dit aussi que ce sont des dimères d'alcools ou d'acides cinnamiques [23].

d. Les stilbènes :

Ce sont des composés phénoliques, qui possèdent deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène, dont la structure est C6-C2-C6 comme les flavonoïdes, généralement peuvent être libres ou hétérosidiques parfois polymériques [23].

2. Les flavonoïdes :

Ces composés sont présents chez toutes les plantes vasculaires et la plupart des Bryophytes [27], ayant une structure de base en C6-C3-C6, constituée de deux noyaux aromatiques, désignés par les lettres A et B reliés par un hétérocycle oxygéné, indiqué par la lettre C [23].

Les flavonoïdes sont classés en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central. On les distingue aussi par le nombre et la position des groupements hydroxyles et par l'existence ou non de substituant sur la génine. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structurel de base.

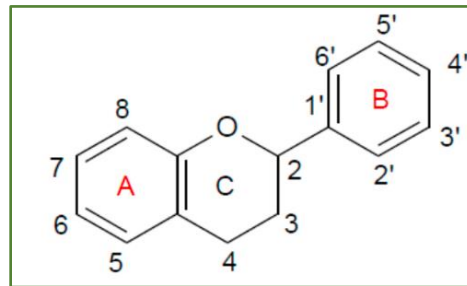


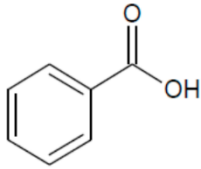
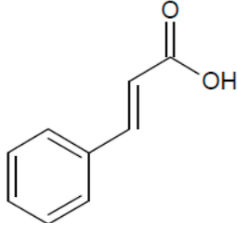
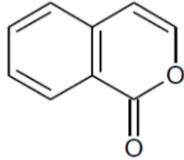
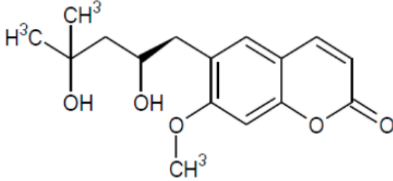
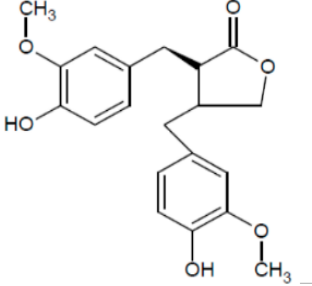
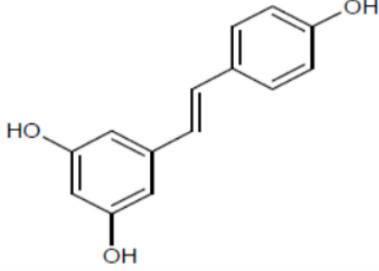
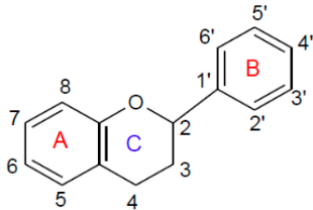
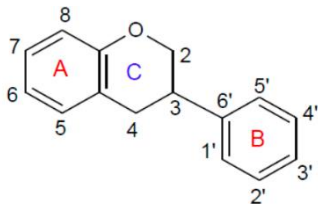
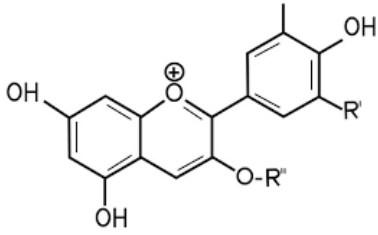
Figure I.2 : Structure de base des flavonoïdes [22].

a. Les anthocyanes :

Un terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en, bleu, rouge, mauve, rose ou orange [28].

Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavon » généralement glycosylé en position C3, les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment [27].

Tableau I.2 : Structures chimiques de certains composés phénoliques [18].

<p>L'acide benzoïque</p> 	<p>L'acide cinnamique</p> 	<p>Benzo-2-pyrone (Isocoumarine)</p> 
<p>Coumarines</p>  <p>(Peucedanol)</p>	 <p>Lignane (Matairesinol)</p>	 <p>Stilbène (Resveratrol)</p>
 <p>Flavane</p>	 <p>Isoflavane</p>	 <p>Anthocyanes</p>

I.4.1.2.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont principalement extraits des plantes fleurissantes, mais on les trouve également chez quelques animaux comme les fourmis, les grenouilles et les coccinelles. Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane. Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes. Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce de la plante.

I.4.1.2.2.1. Rôles physiologiques

Le rôle des alcaloïdes dans les végétaux est encore largement inconnu. Certaines théories prédisent que certains alcaloïdes interviennent dans les relations plantes/prédateurs en protégeant les premières contre l'agression des seconds. Plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des microorganismes, par exemple la nicotine empêche la croissance des larves du tabac. En outre, certains alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV. Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante.

Les alcaloïdes sont totalement impliqués dans une chimie de communications inter et intra-espèce, intégrés dans une écologie chimique. Dans les relations inter-espèce, le goût amer est une approche non négligeable souvent suivie de la toxicité.

I.4.1.2.2.2. Rôles biologiques

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés :

- Au niveau de système nerveux centrale qu'ils soient dépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychimie, caféine)
- Au niveau de système nerveux autonome : sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytique (yohimbine), parasympathomimétique, inhibiteurs des cholinestérases (pilocarpine, galanthamine), anti-cholinergiques (atropine, hyoscyamine, scopolamine), ganglioplégiques (spartéine, nicotine).
- On notera aussi l'existence des curarisants, d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'anti-fibrillants (quinidine), d'anti-tumoraux, d'antipaludiques et d'amoebicides [23].

I.4.1.2.2.3. Classification des alcaloïdes selon l'origine biosynthétique**1. Les alcaloïdes vrais :**

Existent sous forme de sels, correspondent à des substances formées à partir d'un acide aminé, leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et elles possèdent une activité pharmacologique significative.

2. Les pseudo-alcaloïdes :

Présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés. Il s'agit dans la majorité des cas connus d'isoprénoides et l'on parle alors d'alcaloïdes terpéniques. On connaît également des substances azotées hétérocycliques issues du métabolisme de l'acétate.

3. Les proto-alcaloïdes :

Ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique; ils ont une réaction basique [23].

I.4.1.2.4. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (AP)

Les alcaloïdes de pyrrolizidine sont des toxines naturellement présentes dans une grande variété d'espèces végétales et affectent la faune sauvage, les animaux d'élevage et les humains [29].

Les AP et leurs oxydes azotés forment un grand groupe de métabolites secondaires produits par certaines plantes qui peuvent devenir hépatotoxiques (l'intoxication chronique se traduit par une perte d'appétit, des douleurs, une distension abdominale, une augmentation du volume du foie). Certains d'entre eux se sont révélés génotoxiques et cancérigènes [30]. Ces alcaloïdes sont caractérisés par une structure pyrrolizidine qui correspond à l'association de deux cycles pyrroles. La diversification chimique se fait par des ramifications, sur la position 1 et 7 du noyau pyrrolizidine. La plupart de ces alcaloïdes sont des esters formés entre des amino-alcools et un ou deux acides carboxyliques aliphatiques. Les aminoalcools dérivés de la pyrrolizidine sont appelés des nécines. Les acides estérifiant ces nécines sont des acides aliphatiques pouvant compter jusqu'à 10 carbones et sont nommés acides néciques [31].

Conclusion

Les métabolites secondaires des végétaux sont des molécules qui constituent très souvent la clé de voûte du système d'interactions entre les plantes et leur environnement.

Les Boraginaceae sont l'une des familles les plus connues parmi les plantes à fleurs. Ils ont été largement étudiés, en raison notamment de leur importance économique, Ils sont aussi largement utilisés en médecine traditionnelle pour certaines propriétés thérapeutiques.

Une recherche bibliographique exhaustive faite sur les espèces du genre *Echium*, nous a permis de constater que ces plantes sont peu étudiées et que leur composition chimique reste à déterminer.

Chapitre II
Etudes chimiques et biologiques de la
plante

II. Etude phytochimique et biologique de la plante étudié

- Introduction

Cette partie se base sur l'étude de la composition chimique des différents extraits de la partie aérienne d'une plante du genre *Echium* à savoir le screening phytochimique, le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes, et l'évaluation de l'activité antiradicalaire et antimicrobienne des différents extraits de cette plante.

II.1. Etude bibliographique de la plante

II.1.1. Description botanique

Plante de 5-25 cm, à racine rouge-vineux, en général rameuse dès la base, à tige centrale dressée, à tiges latérales ascendantes.

- **Indument**

Double, formé de soies raides étalées, insérées sur un tubercule bien visible à l'oeil nu, et d'une pubescence courte hérissée, souvent très abondante.

- **Feuilles**

Planes, spatulées ou lancéolées, obtuses, les inférieures atténuées en pétiole, les supérieures sessiles, toutes couvertes de l'indument double des tiges.



Figure II.1 : Les feuilles de la plante d'*Echium trygorhizum*[33].

- **Inflorescence**

De forme variable, groupant en général des cymes assez nombreuses, peu denses, dressées ou dressées-étalées, s'allongeant assez rapidement et pouvant atteindre 10-12 cm à la fructification ; bractées linéaires-lancéolées ou linéaires, obtuses.



Figure II.2 : Planche extraite de la *Flore du Sahara* de Paul Ozenda[34].

- **Fleurs**

Sessiles ou subsessiles; calice (6-8 mm) à divisions linéaires, obtuses ; corolle longue de 15-22 mm, le plus souvent d'un beau bleu à l'anthèse, rarement blanche, finement pubescente extérieurement, glabre intérieurement, peu dilatée à la gorge, à limbe assez ouvert, nettement oblique; anneau basilaire glabre ou poilu, formé d'une membrane continue, à 10 lobes plus ou moins marqués; étamines à filets glabres, les antérieures et les latérales exsertes ; anthères jaunâtres; style poilu-hérissé, sauf en général sous la bifurcation, assez longuement bifide (1,5-3 mm); calice fructifère peu accrescent.; (3mm) grisâtres ou brunâtres, couvertes de petits tubercules émoussés [34].



Figure II.3: Fleures de laPlante *Echiumtrygorrhizum*[35].

II.1.2. Nomenclature

Nom :*Echiumtrygorrhizum*Pomel[36].

Synonymes :*Echiumpyncnanthumsubsp. trygorrhizum* (Pomel)[37].

II.1.3. Taxonomie

Système de classification : APG IV

Superrègne : Eucaryote

Regnum : Plantes

Cladus : Angiospermes

Cladus :Eudicots

Cladus :eudicots de base

Cladus: Astérides

Cladus :Lamiides

Ordre:Boraginales

Famille : Boraginacées

Sous-famille :Boraginoideae

Tribus :Lithospermeae

Genre :Échium

Section : E. sect. *Échium*

Espèce :*Echiumtrygorrhizum*



Figure II.4: *Echium trygorrhizum* Pomel [38].

II.1.4. Usages thérapeutiques de la plante

L'espèce *Echium trygorrhizum* Pomel, C'est une plante sauvage, originaire d'Afrique du Nord. Est connue localement sous le nom de « Hamar » ou « Hmimiche ». Traditionnellement utilisées dans la médecine populaire algérienne pour le traitement de la jaunisse, du diabète et de l'amygdalite. L'utilisation de plantes médicinales à des fins thérapeutiques est en augmentation dans le monde.

II.2. Etude phytochimique de *Echium trygorrhizum* Pomel

II.2.1. Récolte du matériel végétal

La plante *Echium trygorrhizum* Pomel, a été récoltée durant le mois d'avril 2012 de la région de Ghardaïa (Sud algérien). La détermination botanique a été effectuée sans équivoque et un voucher a été conservé dans l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL (Université de Constantine 1).

II.2.2. Extraction de la plante *Echium trygorrhizum*

La quantité de matériel végétal obtenue (851g) a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau ; 80 : 20 ; v/v) pendant 72 heures. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite et une température modérée (environ 35 °C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures. Les trois extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et concentrés. A la solution concentrée obtenue, on ajoute sous agitation magnétique 340 ml d'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière

sèche, et du tétraacétate de plomb $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ jusqu'à disparition de la coloration verte au profit d'une coloration marron. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable, etc....

Après filtration on obtient une solution aqueuse claire. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par de l'éther de pétrole, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les quatre phases organiques récupérées sont séchées avec du Na_2SO_4 anhydre puis filtrées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées.

Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme (Figure II.5) montrant les différentes étapes du processus d'extraction.

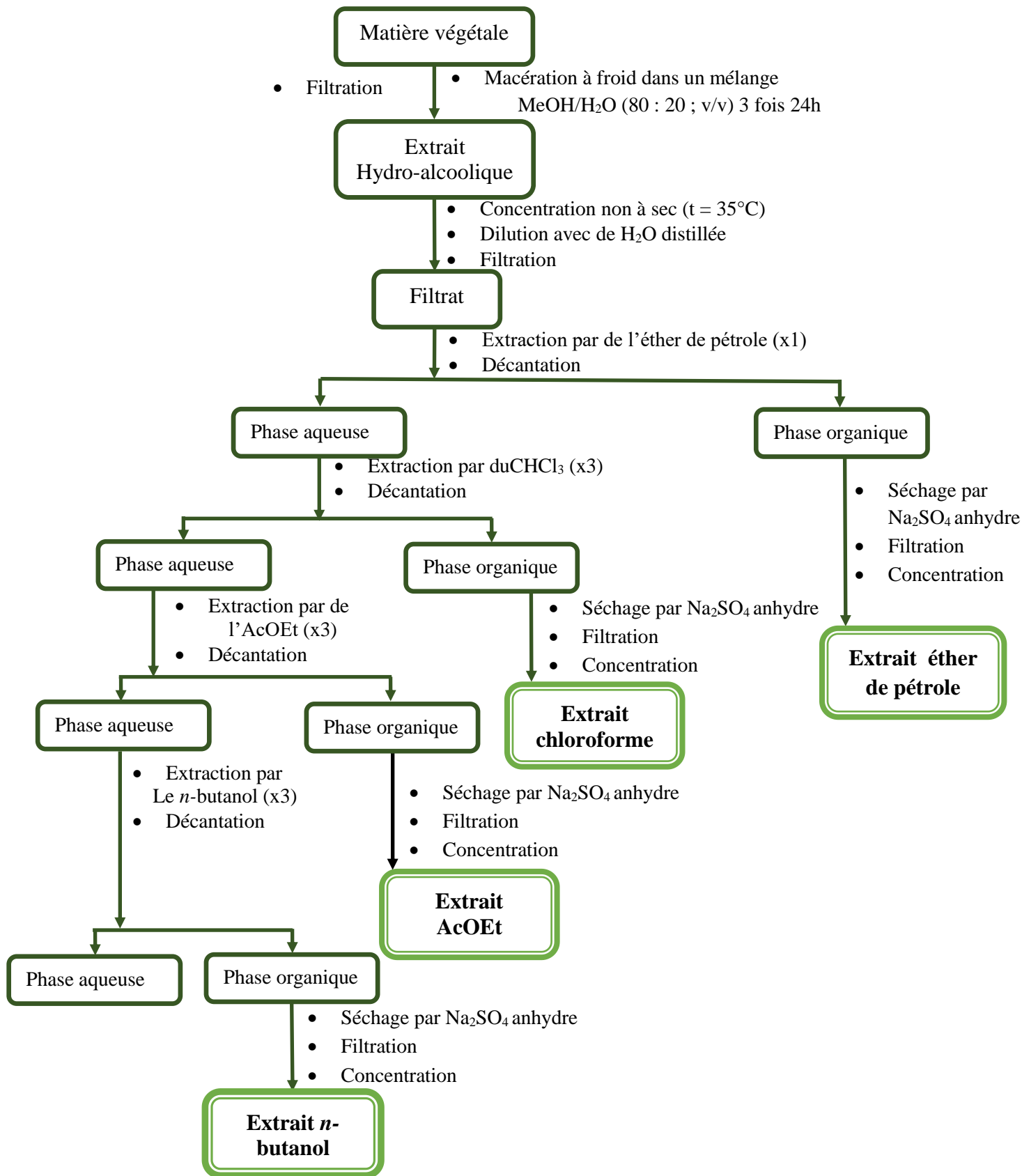


Figure II.5 : protocole d'extraction d'*Echium trygorrhizum*

II.2.3. Screening phytochimique (Travail personnel)

Le screening phytochimique est un test qualitatif qui permet de détecter la présence ou l'absence des familles chimiques essentiellement telles que les composés phénoliques, les hétérosides notamment les saponosides, les composés azotés en particulier les alcaloïdes, les isoprénoïdes qui renferment les stéroïdes, et les composés terpéniques et triterpéniques. Il est basé sur :

- Les essais de solubilité, des constituants de la plante, vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente.
- Des réactions de coloration et de précipitation.
- L'examen sous la lumière ultraviolette.

II.2.3.1. Caractérisation générale des extraits d'*Echiumtrygorhizum*

1. Détection des tanins

Une solution de FeCl_3 diluée à 5% dans de l'éthanol est ajoutée à un tube à essai qui contient une quantité de chaque l'extrait et d'eau.

L'apparition d'une couleur verdâtre ou bleu noir indique la présence des tanins [39].

2. Détection des flavonoïdes (test de Shinoda)

Le test consiste à ajouter 5 mL d'éthanol à une petite quantité de chaque extrait, puis quelques gouttes d'HCl concentré et 0.5g de coupeau de magnésium.

La présence des flavonoïdes fera virer la solution vers une couleur rose ou magenta [40].

3. Détection des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir du réactif de Wagner, 1.5 mL de HCl est ajouté à chaque extrait puis le tout est filtré, quelques gouttes de réactif de Wagner est ensuite ajouté au filtrat recueilli

L'apparition d'un précipité brun indique la présence d'alcaloïdes [41].

4. Détection des terpènes

Dans un tube à essai contenant une quantité de chaque extrait est ajouté 0.5 mL de chloroforme et 0.5 mL d'anhydride acétique, après dissolution il est ajouté 1mL d'acide sulfurique concentré. La réaction est effectuée à froid.

La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet traduit la présence des terpènes [41].

5. Détection des saponosides (test de la mousse)

Dans un tube à essai, une quantité de bicarbonates de sodium et d'eau est ajoutée à quelques milligrammes chaque extrait, le mélange est ensuite agité.

La présence de saponosides se manifeste par l'apparition d'une mousse sous la forme d'alvéoles de miel stable [42].

6. Détection des stérols (test de Salkowski)

La mise en évidence des stérols se fait en ajoutant 2 mL de chloroforme dans quelques milligrammes de chaque extrait, puis 2 mL de H₂SO₄ concentré. Le mélange est secoué puis laissé au repos quelques minutes.

L'apparition de la couleur rouge dans la couche chloroforme indique la présence des stérols [41].

7. Détection des anthraquinones

Une solution chloroforme/éther de pétrole est préparée dans les proportions (1:1). Quelques millilitres de la solution précédente sont ajoutés à un tube à essai qui contient déjà une quantité de chaque extrait, puis quelques gouttes de NaOH sont ajoutées.

L'apparition d'une couleur rouge indique la présence des Anthraquinones [43].

8. Détection des sucres (test de Fehling)

Dans un tube à essai une quantité de chaque extrait est ajoutée à 1mL de méthanol, ensuite 1mL de solution de Fehling est ajouté au mélange précédent. Le tube à essai est placé dans un bain marie qui contient de l'eau bouillante pendant 8 minutes.

L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des sucres [44].

9. Détection des diterpènes

Dans un tube à essai contenant une quantité de chaque extrait dissout dans l'eau distillée et ajouter quelques gouttes de solution d'acétate de cuivre.

L'apparition d'une couleur émeraude vert qui indique la présence des diterpènes[45,46].

II.3.Etude quantitaves

II.3.1.Dosage des polyphénols totaux

II.3.1.1.Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué de réactif Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par [47].

La teneur des polyphénols totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec un spectrophotomètre UV- vis en utilisant l'essai généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique (réactif de Folin) dans une solution alcaline [48].

Réactifs utilisés :

- Eau distillée, Méthanol
- FCR (Folin-Ciocalteu réactif)
- Na_2CO_3 de 7,5% (Carbonate de sodium)
- Acide Gallique
- Extrait de plante

II.3.1.2. Mode opératoire

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

7,5 gramme de Na_2CO_3 est dissout dans 100 ml d'eau distillée.

Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 mg de chaque extrait est dissoute dans un volume de 1 ml Méthanol.

Préparation de Folin-Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois

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

Préparation des solutions d'acide gallique :

Les solutions ont été préparées à partir d'une solution mère : 1 mg d'acide gallique solubilisé dans 2 ml de méthanol, puis différentes concentrations allant de: 0.125 jusqu'à 0.0156 mg/ml ont été préparées.

II.3.1.3. Procédure expérimentale

Brièvement 200 μl de chaque extrait ont été ajoutés à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes. Après l'incubation 800 μl de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 75g/l a été ajoutée et agitée. Les polyphénols totaux sont

déterminés après 2 heures d'incubation à la température ambiante. L'absorbance de la couleur bleue en résultant a été mesurée au $\lambda_{\max} = 765$ nanomètres avec un spectrophotomètre.

La quantification a été faite en ce qui concerne la courbe standard de l'acide gallique. Les résultats ont été exprimés en μg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait [47].

Le taux de composés phénoliques est déterminé par la loi suivante :

$$T = (C \cdot V) / M$$

T : taux des composés polyphénoliques.

C : concentration d'extrait équivalent.

V : Volume d'extrait (ml).

M : poids sec d'extrait (g).

Droite d'étalonnage de l'acide gallique

Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant l'acide gallique comme standard, dans les mêmes conditions que les échantillons.

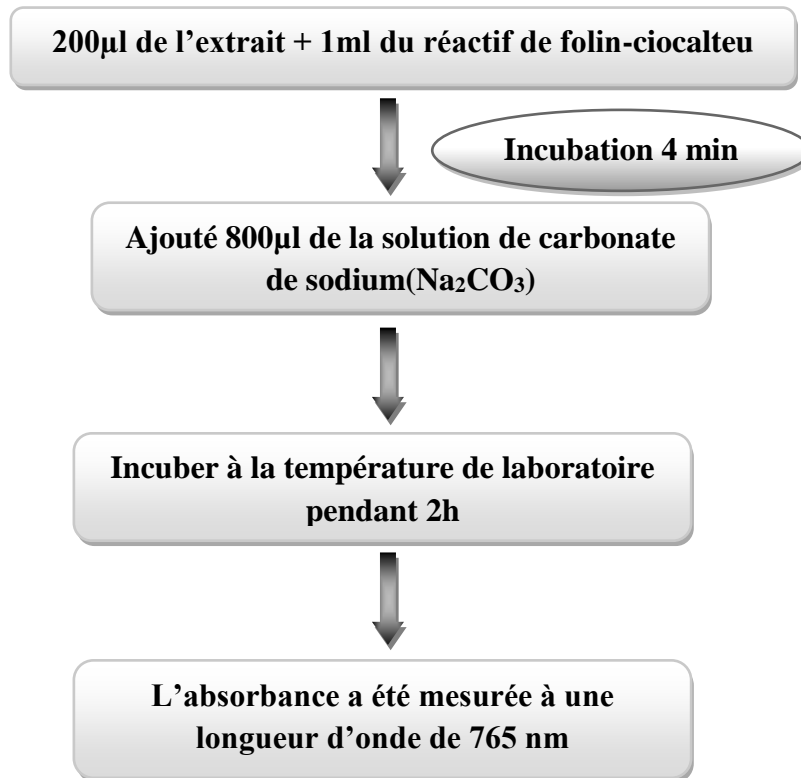


Figure II.6 : les étapes de dosages des polyphénols totaux.

II.3.2. Dosage des flavonoïdes

II.3.2.1. Principe

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al^{+3} et les flavonoïdes. Ces derniers forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons [49].

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée selon la méthode décrite par [50]. Avec modification des réactifs (remplacé nitrite de sodium par acétate de sodium).

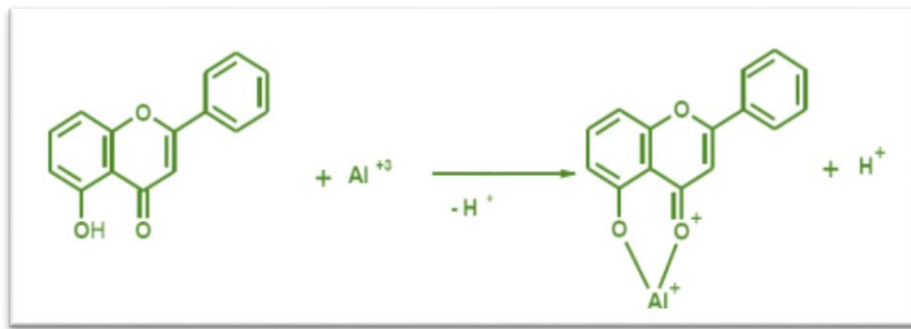


Figure II.7 : Réaction du Chlorure d'aluminium et les flavonoïdes[51].

Réactifs utilisés :

- Méthanol
- Eau distillé
- 10% chlorure d'aluminium ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$)
- 1Md'acétate de sodium (CH_3COONa)
- Quercetin (Flavonoïde)
- Extrait de plante

II.3.2.2.Mode opératoire

Préparation de l'extrait de plante :

-Une masse de 1 milligramme de chaque extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol.

Préparation des solutions:

- Peser 2,05 g d'acétate de sodium et le dissoudre dans une fiole de 25 ml par le méthanol.

- Peser 10 mg de chlorure d'aluminium et le dissoudre dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau distillée.
- Transférer le mélange dans une fiole de 100 ml et compléter avec du méthanol jusqu'au trait des 100 ml.

Préparation des solutions de la quercétine :

La solution est préparée avec la quercétine à des concentrations variables de (0 30) $\mu\text{g/ml}$. 2000 μl de chaque dilution est a été mélange avec 100 μl de trichlorure d'aluminium (10%) et 100 μl d'acétate de sodium (1M) et 2500 μl de l'eau distillée. Après une heure (1h) d'incubation à température ambiante L'absorbance a été mesurée à 420 nm par un spectrophotomètre UV-Visible [50].

II.3.2.3. Procédure expérimentale

Des volumes de 100 μl de solution de chlorure d'aluminium ont été ajoutés à 2 ml de solution d'extrait ou de fraction Après 4 min d'incubation, on rajoute 100 μl de solution d'acétate de sodium. Le mélange a été mis en contact avec 2.8ml l'eau distillée.

L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 420nm contre un blanc constitué de 100 μl de solution d'acétate de sodium de 100 μl de solution de chlorure d'aluminium et de 2.8ml de l'eau distillée.

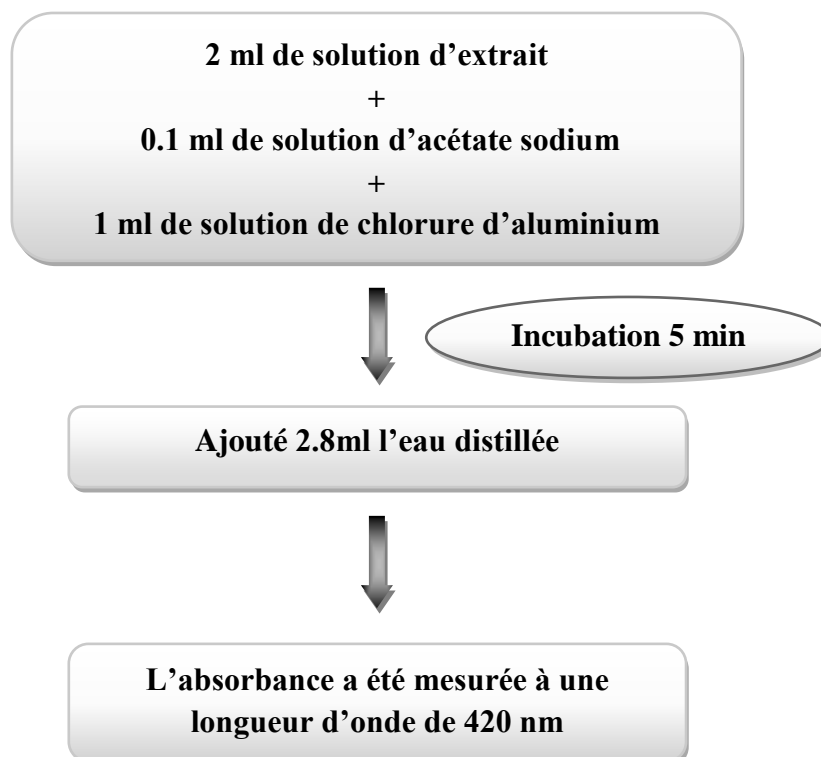


Figure II.8 :Résumé du protocole de dosage des flavonoïdes totaux

La quercétine a été utilisée comme standard de référence pour l'établissement de la courbe d'étalonnage et pour la quantification des teneurs en flavonoïdes totaux exprimées en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

II.4. Etude biologique d'*Echiumtrygorrhizum*

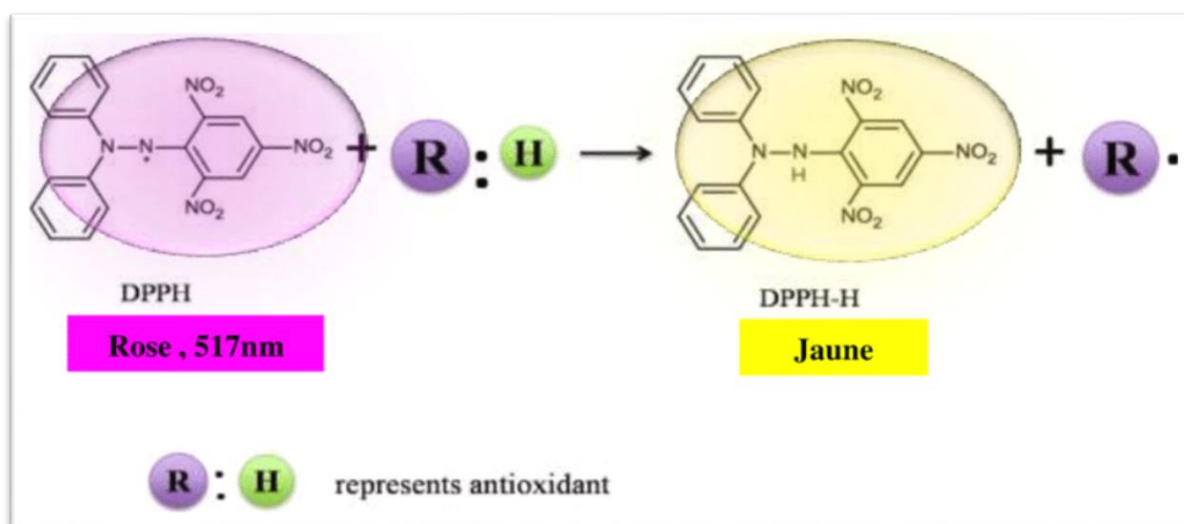
II.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante

II.4.1.1. La méthode de piégeage du radical libre DPPH•

II.4.1.1.1. Principe

Il s'agit de la méthode la plus simple dans laquelle un composé ou un extrait est mélangé à une solution de DPPH et l'absorbance est évaluée après un temps spécifié.

Le DPPH est caractérisé par des radicaux libres stables (électrons non appariés sur des atomes de pont d'azote). du fait de cette délocalisation, les molécules de radicaux libres ne forment pas de dimères, le DPPH conserve sa forme monomérique relativement stable à température ambiante, et cette délocalisation produit une couleur violet foncé mesurable à environ 517 nm en solution éthanolique détectée par spectrophotométrie [52].

**Figure II.9:**Réaction radicalaire DPPH• avec un représente antioxydant [53].

Préparation du DPPH

Une quantité de 4mg de DPPH est dissout dans 100ml méthanol avec agitation pendant 30 min, à l'abri de la lumière. L'absorbance est de (0,7-0,9) mesurée avec un spectrophotomètre à 517 nm.

II.4.1.1.2. Mode opératoire

400µl des solutions des extraits ont été ajoutés à 1600 µl DPPH (3% préparé dans le méthanol).

En parallèle un contrôle négatif est préparé en mélangeant 400µl de méthanol avec 1600 µl de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est préparé par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration, le test est répété 2 fois. L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous [54].

Le pourcentage d'inhibition (PI) des radicaux libres DPPH a été calculé selon la formule :

$$PI (\%) = [(A0-A1)/A0] \times 100$$

PI = Le pourcentage d'inhibition

A0 = Absorbance du blanc

A1 = Absorbance de l'échantillon

Nous avons commencé par une concentration de 2 mg/ml et on a appliqué 9 dédilutions pour chaque extrait.

Tableau II.1: préparation des solutions mères

extraits	La quantité des extraits	Méthanol	Concentration de la solution mère (mg/ml)
Chloroformique	2mg	1ml	2
Acétate d'éthyle	2mg	1ml	2
n-Butanol	2mg	1ml	2

Tableau II.2 : préparation d'une gamme de solutions filles

Les solutions	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Première étape	1ml d'extrait	0,5 extrait+ 0,5methanol	0,5extrait (S1)+ 0,5methanol	0,5extrait (S2)+ 0,5methanol	0,5extrait (S3)+ 0,5methanol	0,5extrait (S4)+ 0,5methanol	0,5extrait (S5)+ 0,5methanol	0,5extrait (S6)+ 0,5methanol

NB :L'extrait éthérique n'as pas d'activité antioxydante.

La concentration de l'échantillon nécessaire pour neutraliser 50% des radicaux libres (IC_{50}) a été déterminée graphiquement par la régression linéaire.

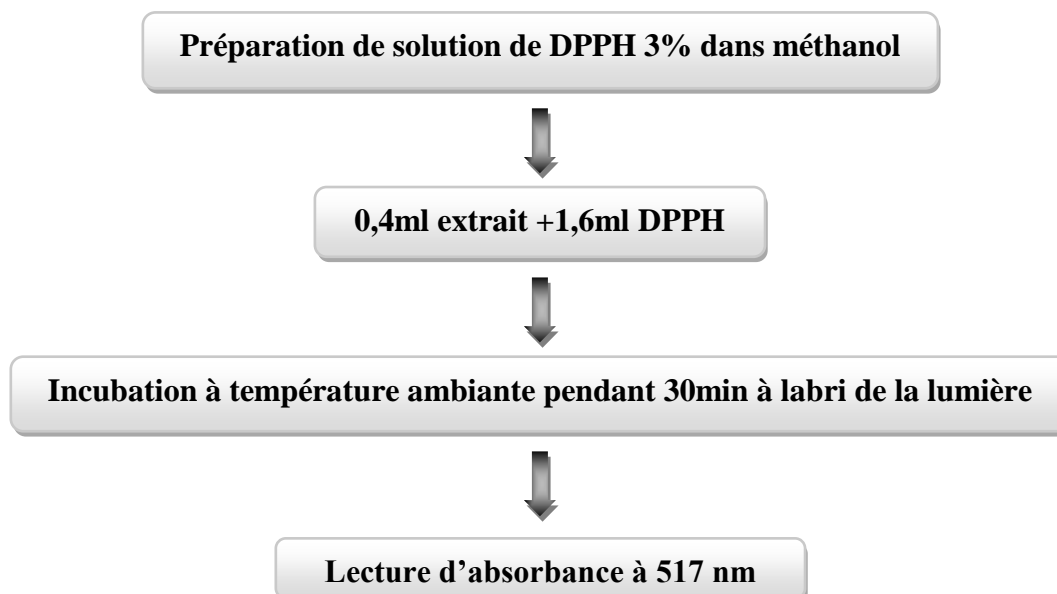


Figure II.10 : schéma de protocole d'activité anti oxydante avec DPPH.

II.4.1.2. Méthode de blanchissement du β -carotène BCB :

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de blanchissement du β -carotène repose sur la mesure d'inhibition des hydroperoxydes conjugués diènes résultant de l'oxydation de l'acide linoléique. [55].

II.4.1.2.1.Principe

Les activités inhibitrices de peroxydation des lipides par les polyphénols et les flavonoïdes ont été évaluées par l'essai du blanchiment du β -carotène qui est fondé sur la perte de la couleur orange de β -carotène due à sa réaction aux radicaux qui sont constitués par oxydation d'acide linoléique dans une émulsion. La présence de différents antioxydants peut gêner l'ampleur du blanchiment du β -carotène en neutralisant le radical libre de linoléate et d'autres radicaux libres formés dans le système [56]. Cette méthode est employée couramment parce que le β -carotène montre une activité biologique forte et est un composé physiologique important [56]. En outre, le β -carotène est employé comme agent de coloration en boissons, et sa décoloration réduirait nettement la qualité de ces produits [56].

II.4.1.2.2.Mode opératoire

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

Un volume de 4800 μl de cette émulsion a été ajouté dans des tubes contenant chacun 200 μl de chaque extrait (à une concentration finale de 2mg/ml préparé dans méthanol). après agitation, les tubes sont placés dans un bain marie à 50°C pendant 2h. L'absorbance a été mesurée immédiatement contre un blanc (émulsion sans extrait) à 470nm, correspondant au $t=0$. Les tubes ont été par la suite placés dans un bain marie à 50°C pendant 2h. après incubation ces derniers ont été de nouveau mesurés à la même longueur d'onde ($t = 120$ min).

La même procédure a été répétée avec le hydroxy anisole butyle (BHT) (1mg/ml) comme un contrôle positif avec méthanol comme des contrôles négatifs. Les absorbances ont été lues à 470nm, après [30, 60, 90, 120] min d'incubation à température ambiante [57].

L'activité antioxydante des extraits et du BHT a été calculée par rapport au contrôle négatif en utilisant l'équation suivante [58].

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

Abs échantillon $t=0$: Représente l'absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 0 min

Abs échantillon t=120 : Représente l'absorbance de l'extrait à 120min

Abs contrôle t=0 : Représente l'absorbance du contrôle à 0 min

Abs contrôle t=120 : Représente l'absorbance du contrôle à 120min

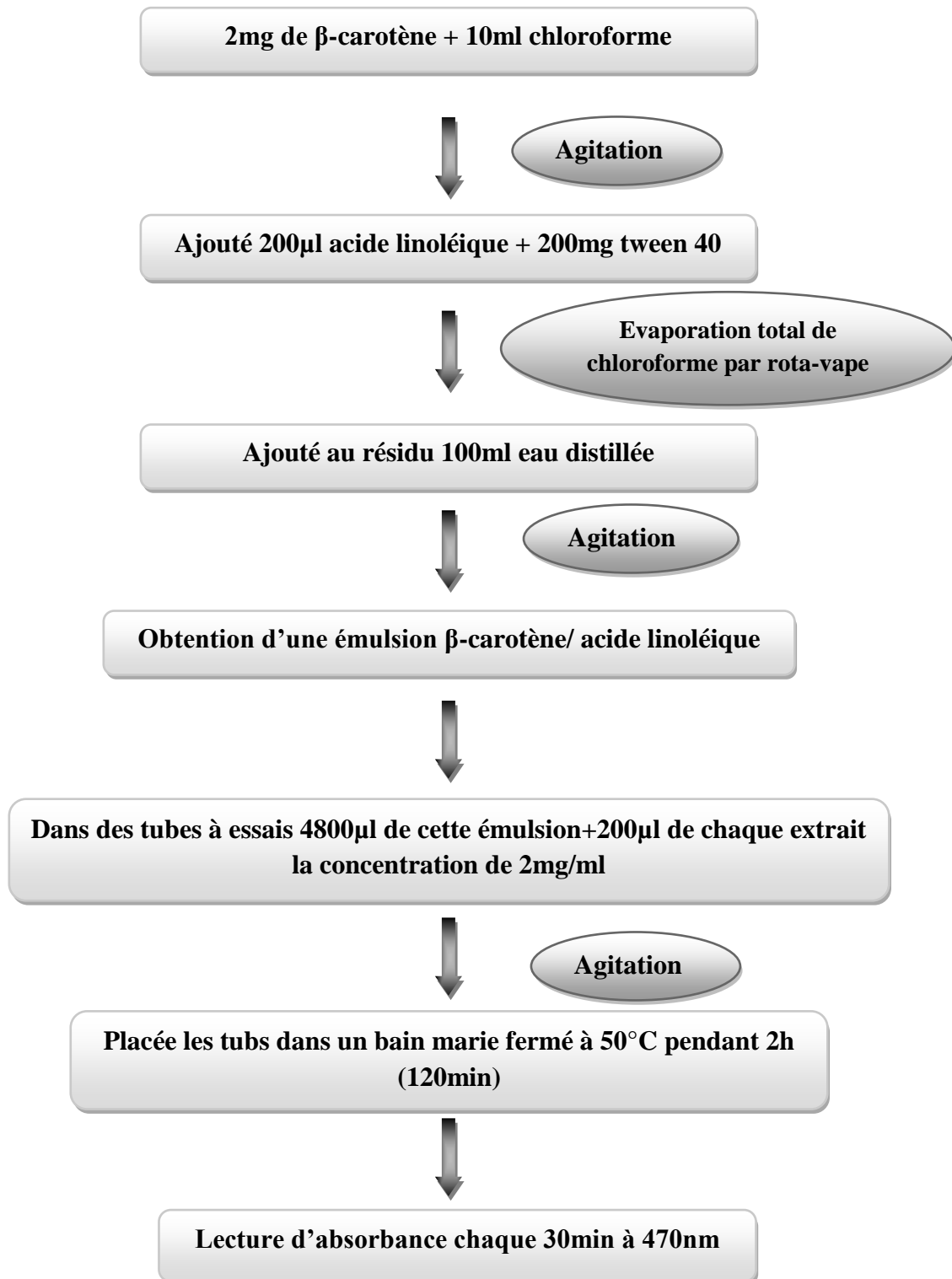


Figure II.11: schéma de protocole d'activité anti oxydante avec BCB.

II.5.1. Evaluation de L'activité antimicrobienne

Introduction

Les tests antimicrobiens ont pour but de rechercher l'activité biologique des extraits de notre plante *Echiumtrygorhizum* vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries, moisissure, levure.

Dans ce chapitre nous allons étudier in vitro le pouvoir antimicrobien des extraits préparé à partir de l'espèce *E.trygorhizum* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélose solide, Mueller-Hinton pour les bactéries et sabouraud pour les champignons.

Cette activité a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis sept germes pathogènes, dont cinq souches bactériennes contient de gram+ et gram- et deux souche fongique.

L'activité antibactérienne et antifongique des extraits bruts de notre plantes étudiées a été réalisée selon la méthode de disque au laboratoire d'hygiène au niveau de l'Etablissement Hospitalier Publique,ferroudja, Blida.

II.5.1.1. Principe de la méthode

1. Antibioگرامe

C'est une technique très utilisée en microbiologie médicale, appelée également la méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques.

L'effet du produits antimicrobien sur la cible est appréciées par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifier de sensible, d'intermédiaire ou de résistant.

Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester [59].

2. Principe

La technique consiste à déposer des disques de papier buvard stérile de 6mm de diamètre imprégnés d'une concentration connue de la substance chimique testée sur une gélose dans des boites de pétries incubées et uniformément au préalable par la suspension bactérienne à étudier, puis incubé à la fin de la période d'incubation et si la substance est efficace, une zone est pâle apparait autour du disque, làoù la croissance microbienne a été inhibée, cette région s'appelle « zone d'inhibition » ou « halo d'inhibition » (figure II.12). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à la substance chimique testée. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

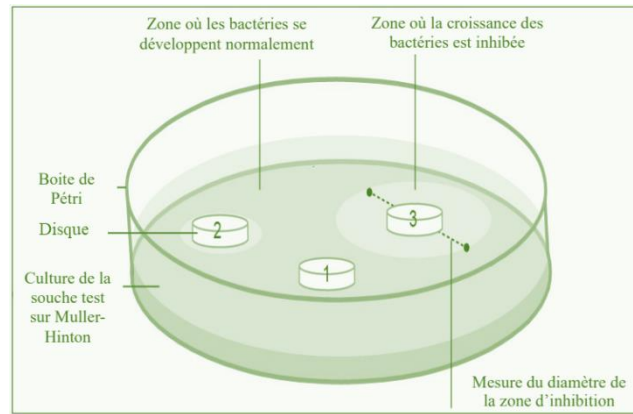


Figure II. 12 : Principe de la méthode de diffusion par disque.[60]

3. Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) ont été stérilisés l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes [61].

II.5.1.2. Provenance des souches testées

Les souches qui ont été testées sont des souches de références ATCC provenant du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida. En effet, sept souches microbiennes sont utilisées dans notre étude, deux champignons et cinq bactéries.

Les souches microbiennes testées sont représentés dans le tableau ci-dessous (Tableau II.3).

Tableau II.3 : Les différents microorganismes testés

	Espèces	références	Habitat préférentiel	Pouvoir pathogène
Bactérie Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Peau, cheveux Nasopharynx Aliments Contaminés	Infections cutanées, abcès Infections pulmonaires Infections alimentaires
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 6633	Sol, l'intestin humain.	infection alimentaires, nosocomiales .
Bactérie Gram-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Sol, eau, plantes Voies respiratoires Matières fécales Réfrigérateurs Appareils sanitaires	infections pulmonaires, brûlures plaies Septicémies Infections alimentaires, nosocomiales
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Matières fécales Aliments contaminés Eaux usées	infections urinaires Infections respiratoires Infections alimentaires . Gastro-entérite .
	<i>Salmonella enterica</i>	NCTC 6017	les animaux à sang chaud	la gastro-entérite, la bactériémie, la fièvre entérique et l'état de porteur asymptomatique
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Tube digestif	infections viscérales candidoses superficielles La candidose Infection cutanée.
Champignon	<i>Aspergillus Niger</i>	ATCC 16404	Sol, les débris végétaux, les fruits pourris .	Infections alimentaires infections cutanées Cancer hépatique.

1. antibiotique et antifongique utilisé

La sensibilité des souches microbiennes a été testée par un antibiotique (gentamicine (ATB) ;10µg/disque)et un antifongique (novagenerics(ATF) 0.5mg/disque) par la méthode de diffusion sur disque.

II.5.1.3.protocole expérimental

L'activité antimicrobienne a été déterminée par le protocole adaptée par la pharmacopée européenne [62].

1. Préparation de l'inoculum bactérien

Une parcelle de la colonie cible obtenu après revivification a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur puis homogénéisée avec 9ml d'eau physiologique stérile dans un tube à essai.

Des dilutions sont effectuées dans la même solution, jusqu'avoir une densité Optique de (DO= 0,08 à 0,1 pour les bactéries et de 1 à 2 pour les levures et les moisissures utilisant un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde $\lambda = 625$ nm) correspondant à une concentration optimale de de 10^7 à 10^8 germes/ml.).

2. Préparation de milieu de culture

Faire fondre les milieux gélosés (Muller Hinton pour les bactéries et sabouraud pour les levures et moisissures) dans un bain marie réglé à 95 C.

Couler aseptiquement les milieux de culture dans des boites de pétries de 90mm de diamètre à raison de 15ml par boîte.

Laisser refroidir et solidifier sur la paillasse.

3. Ensemencement

Les milieux de cultures préalablement préparés, sont ensemencés par étalement à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de la suspension bactérienne déjà préparée. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries sur les milieux.

4. Préparation des solutions a testées

Les extraits de la plante étudiées ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour avoir une concentration de 60 mg /ml.

5. Préparation des disques

Une fois les milieux sont solidifiés, prélever aseptiquement à l'aide d'une pince un disque buvard imprégné dans la solution d'extrait, ensuite les dépose à la surface des milieux de culture préalablement coulés. Appuyer doucement sur chaque disque pour assurer un contacte uniforme avec le milieu.

Laisser les boites pendant 30minutes sur la palliasse à température ambiante pour permettre une bonne diffusion des produit étudiés.

6. incubation

Incuber les boites a pétri à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures et moisissures.

7. lecture des résultats

La sensibilité des germes au produit est déterminée après incubation, par mesure de diamètre des zones claire autour des disques (zone d'inhibition en mm) à l'aide d'un pied à coulisse.

Suivant le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en (mm) autour de chaque disque, la lecture des résultats est faite comme suit [63].

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur ou égale à 28mm
- Modérément inhibitrice lorsque : 14 mm diamètre de la zone 28mm.
- Légèrement inhibitrice lorsque : 8 mm diamètre de la zone 14mm.
- Non inhibitrice lorsque : diamètre de la zone 8mm.

NB : pour le temoin négatif, nous déposons des disques imbibés du solvant DMSO, pour confirmer que l'apparition des zones d'inhibition est due à la présence de nos échantillons

Conclusion

Au cours de notre étude, nous avons effectué un screening phytochimique, des dosages et des tests de piégeage des radicaux libres sur les différents extraits de la plante *Echium trygorhizum*. Ces travaux ont permis d'identifier qualitativement et quantitativement les composés présents dans ces extraits. Les résultats de cette partie de notre recherche seront présentés en détail dans le chapitre III, où nous rassemblerons les résultats obtenus et les discussions associées.

Chapitre III
Résultats et discussions

III. Étude phytochimique

III.1. Rendement de l'extraction

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec par le rapport entre le poids de l'extrait sec, avec le poids du matériel végétal sec utilisé pour l'extraction en gramme. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{M_0}{M_1} \times 100$$

M₀ : Masse en gramme de l'extrait

M₁ : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche

Les masses et les rendements évalués par rapport au poids du matériel végétal sec sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau III.1 : Masses et rendements des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement
Les parties aériennes d'Echium trygorrhizum (851 g)	Ether de pétrole	2,5	0,29 %
	chloroforme	11,04	1,33 %
	acétate d'éthyle	0,48	0,06 %
	<i>n</i> -butanol	17,6	2,06 %

III.2. Screening phytochimique

La recherche phytochimique ne donne aucune information sur la structure d'une molécule précise. Il permet d'identifier la présence de telle famille chimique, qui peut contenir des molécules différentes mais de structures apparentées en général, présentant un ou plusieurs caractères communs.

Les résultats de screening chimique de chaque extrait sont présentés dans un tableau :

Présence confirmé : (+++)

Présence modérée : (++)

Réaction négative (absence) : (-)

Tableau III.2 : les métabolites secondaires existent dans l'extrait chloroforme.







Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
Tanins	 A test tube with a yellow label that reads 'chloroforme' and 'tanins'. It contains a small amount of yellowish liquid at the bottom.	 The same test tube after the test. The liquid has become a darker yellow and a black precipitate is visible at the bottom.	Précipite de coloration bleu noir	++
flavonoïdes	 A test tube with a yellow label that reads 'chloroforme' and 'flavonoïdes'. It contains a small amount of yellowish liquid at the bottom.	 The same test tube after the test. The liquid remains yellowish and there is no visible change or precipitate.	Aucun changement	-
alcaloïdes	 A test tube with a yellow label that reads 'chloroforme' and 'alcaloïdes'. It contains a small amount of yellowish liquid at the bottom.	 The same test tube after the test. The liquid has become a darker yellow and a brown precipitate is visible at the bottom.	L'apparition d'un précipité brun	+++

Tableau III.2 : Les métabolites secondaires existents dans l'extrait chloroforme (Suite 1)





Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
terpènes			Aucun changement de couleur	-
saponosides			L'apparition d'une mousse	+++

Tableau III.2 : Les métabolites secondaires existents dans l'extrait chloroforme (Suite 2)




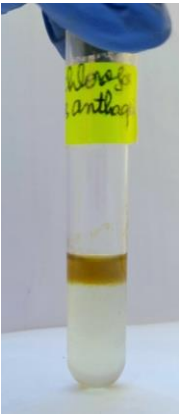




Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
stérols			Changement de couleur vers le rouge foncé	++
anthraquinones			Changement de couleur	++
sucres			Précipité rouge très foncé	+++

Tableau III.2 : Les métabolites secondaires existent dans l'extrait chloroforme (Suite 3)

Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
diterpènes			Précipité émeraude vert foncé	++

Les résultats de screening phytochimique de l'extrait chloroforme montrent que les métabolites secondaires fortement présent dans cet extrait sont :

- les alcaloïdes
- les saponosides
- les sucres

Tandis que les métabolites secondaires moyennement présents sont :

- les tanins
- les stérols
- les anthraquinones
- les di terpènes

Tableau III.3 : les métabolites secondaires existent dans l'extrait acétate d'éthyle



Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
Tanins			Coloration verdâtre très foncé	+++

Tableau III.3 : les métabolites secondaires existents dans l'extrait acétate d'éthyle (Suite 1)







Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
flavonoïdes			Changement de couleur rose orangé	+++
alcaloïdes			Aucun précipité n'apparaît	-
terpènes			Aucun changement	-

Tableau III.3 : les métabolites secondaires existents dans l'extrait acétate d'éthyle (Suite 2)











Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
saponosides			Aucun changement	-
stérols			Coloration rouge très foncé	+++
anthraquinones			Coloration rouge orangé	+++

Tableau III.3 : les métabolites secondaires existents dans l'extrait acétate d'éthyle (Suite 3)

Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
sucres			Trouble foncé	+
diterpènes			Coloration vert tilleul	++

Les résultats du screening phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle montrent une forte présence de métabolites secondaires de type :

- tanins
- flavonoïdes
- stérols
- anthraquinones

Et ils montrent des métabolites secondaires moyennement présents de type :

- di terpènes

Par contre ils montrent une faible présence de métabolites secondaires comme :

- les sucres

Tableau III.4 : les métabolites secondaires présents dans l'extrait *n*-butanol







Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
Tanins			Coloration verdâtre très foncé	+++
Flavonoïdes			Changement de couleur rose	+++
alcaloïdes			Aucun changement	-

Tableau III.4 : les métabolites secondaires existents dans l'extrait *n*-butanol (Suite 1)













Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
terpènes	 A test tube with a yellowish liquid at the bottom. The label is partially visible and reads '...omolig...te mo...'.	 The same test tube after the addition of a reagent, showing a distinct reddish-brown ring at the interface between the two liquid layers.	anneau rouge brunâtre	++
saponosides	 A test tube with a yellowish liquid at the bottom. The label reads 'ex. butol...st de saponos...'.	 The same test tube after the addition of a reagent, showing no change in the appearance of the liquid.	Aucun changement	-
stérols	 A test tube with a yellowish liquid at the bottom. The label reads '...tanol...le stérol'.	 The same test tube after the addition of a reagent, showing a dark red color in the bottom chloroform layer.	L'apparition de la couleur rouge foncé dans la couche chloroforme	+++

Tableau III.4 : les métabolites secondaires existents dans l'extrait *n*-butanol (Suite 2)

Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
anthraquinones	 A test tube with a yellow label that reads 'ex. but', 'est ple', and 'anthraq'. It contains a small amount of clear liquid at the bottom.	 The same test tube after the test, showing a distinct orange-red color at the bottom of the liquid.	Apparition de couleur rouge orangé	+
sucres	 A test tube with a yellow label that reads 'stanoim' and 's sucro'. It contains a small amount of clear liquid at the bottom.	 The same test tube after the test, showing a greenish-yellow color at the bottom of the liquid.	Aucun changement	-
diterpènes	 A test tube with a yellow label that reads 'stanoim' and 'de di, terp'. It contains a small amount of clear liquid at the bottom.	 The same test tube after the test, showing a bright emerald green color at the bottom of the liquid.	L'apparition d'une couleur émeraude vert	+++

Les résultats du screening phytochimique de l'extrait *n*-butanol montrent que les métabolites secondaires fortement présents dans cet extrait sont :

- les tanins
- les flavonoïdes
- les stérols
- les di terpènes

Les métabolites secondaires moyennement présents dans cet extrait sont :

- les terpènes

Par contre les métabolites secondaires faiblement présents dans cet extrait sont :

- les anthraquinones

Tableau III.5 : les métabolites secondaires présents dans l'extrait éther de pétrole





Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
Tanins			N'a pas de résultat	-
Flavonoïdes			Pas de coloration	-

Tableau III.5 : les métabolites secondaires existents dans l'extrait éther de pétrole (Suite 1)







Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
alcaloïdes			Coloration brun	+
terpènes			Apparition d'un anneau vert brunâtre	+
saponosides			Aucun changement	-

Tableau III.5 : les métabolites secondaires existents dans l'extrait éther de pétrole (Suite 2)









Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
stérols			N'a pas de résultat	-
anthraquinones			N'a pas de résultat	-
sucres			N'a pas de précipite	-

Tableau III.5 : les métabolites secondaires existents dans l'extrait éther de pétrole (Suite 3)

Test	Tub avant	Tub après	Observation	Résultat
diterpènes			Coloration émeraude verte	++

Les résultats de screening phytochimique de l'extrait éther de pétrole montrent que les métabolites secondaires moyennement présents dans cet extrait sont :

- les di terpènes

Par contre les métabolites secondaires faiblement présents sont :

- les alcaloïdes
- les terpènes

III.3. Résultats de l'étude quantitatives

III.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits de notre plante étudiée est déterminée par la méthode de Folin- Ciocalteu, en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique utilisé comme standard (Figure III.1). Les teneurs sont exprimées en μg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait (μg EAG/mg d'extrait), et déterminé par l'équation de type : $y = 0,0089x + 0,02213$ sachant que $R^2 = 0,9994$ (Figure III.1).

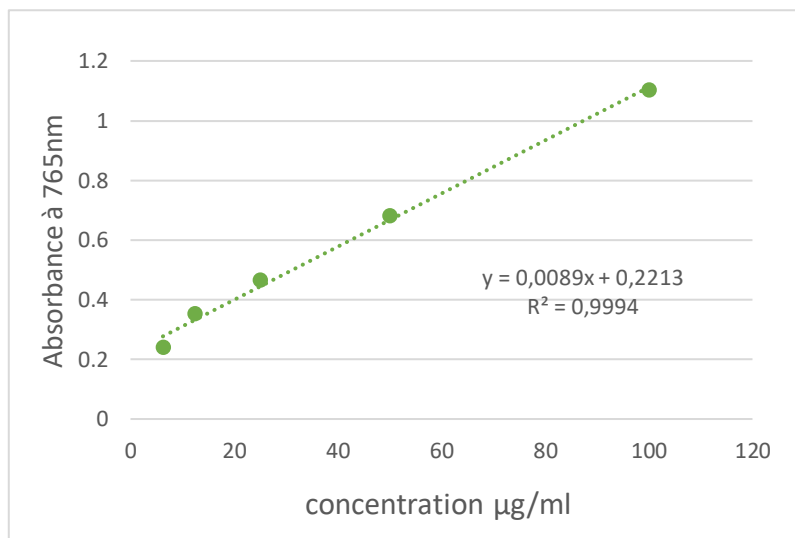


Figure III.1 : droite d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats des absorbance des extraits sont représentés dans le tableau suivant (tableau III.6)

Tableau III.6 : les valeurs d'absorbance des différents extraits d'*Echium Trygorrhizum*

Extrait Abs (nm)	Extrait AcOEt	Extrait éther de pétrole	Extrait n-Butanol	Extrait CHCl ₃
Absorbance 1	1.026	0.316	0.867	0.498
Absorbance 2	1.062	0.335	0.846	0.506
Absorbance moyenne	1.044	0.326	0.857	0.502

Les résultats concernant les quantités des polyphénols présents dans les extraits sont reportés dans la figure (figure III.2) et le tableau suivant (tableau III.7) :

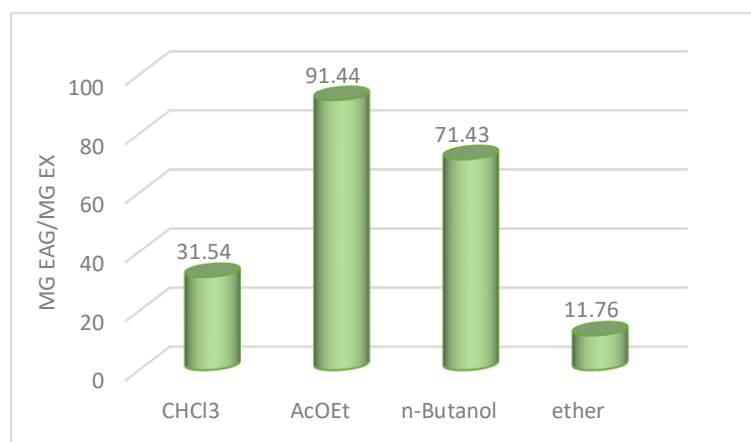


Figure III.2 : la teneur en polyphénols des extraits d'*Echium Trygorrhizum*

Tableau III.7 : les teneurs en polyphénols des différents extraits d'*Echium Trygorrhizum*

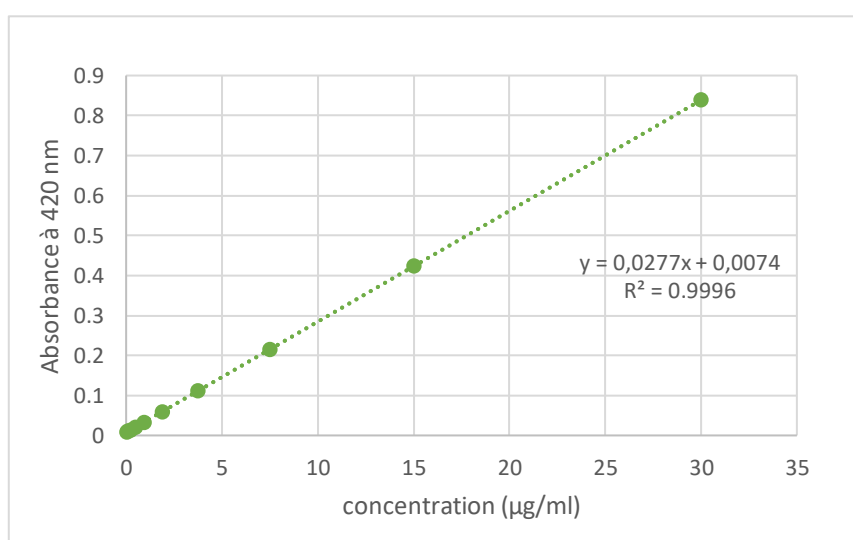
Extrait Abs (nm)	Extrait AcOEt	Extrait éther de pétrole	Extrait <i>n</i> - Butanol	Extrait CHCl ₃
Teneur en polyphénols	91.44	11.76	71.43	31.54

Selon les résultats mentionnés dans le tableau III.7 et la figure III.2, les teneurs en phénols totaux varient largement dans les extraits bruts (de 11.76 à 92.44 µg EAG/mg).

Parmi les quatre extraits étudiés, l'extrait ACOEt possède la meilleure Teneur (91.44 µg EAG/mg). L'extrait *n*-BuOH et l'extrait CHCl₃ ont aussi des teneurs en composés phénoliques élevées par rapport la teneur de dernier extarit(71.43 et 31.54 µg EAG/mg respectivement). Le dernier teneur a été enregistré dans l'extrait éthérique (11.76 µg EAG/mg).

III.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et l'étalon été la quercétine (Figure III.3). La teneur est exprimée en µg équivalent de quercétine/mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait). Les taux des flavonoïdes des quatre extraits bruts méthanoliques de la plante étudié ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0,0277x + 0,0074$ sachant que $R^2 = 0,9996$.

**Figure III.3** : droite d'étalonnage de la quercétine

Les résultats des absorbance des extraits sont représentés dans le tableau suivant (Tableau III.8)

Tableau III.8 : les valeurs d'absorbance des différents extraits d'*Echium Trygorrhizum*

<i>Extrait</i> <i>Abs (nm)</i>	Extrait ACOEt	Extrait éthérique	Extrait <i>n</i>- Butanol	Extrait CHCl₃
Absorbance 1	0.529	0.721	0.455	0.702
Absorbance 2	0.569	0.728	0.449	0.697
Absorbance moyenne	0.549	0.7245	0.472	0.699

Les résultats concernant les quantités des polyphénols présents dans les extraits sont reportés dans la figure suivante (figure III.4) et le tableau suivant (tableau III.9) :

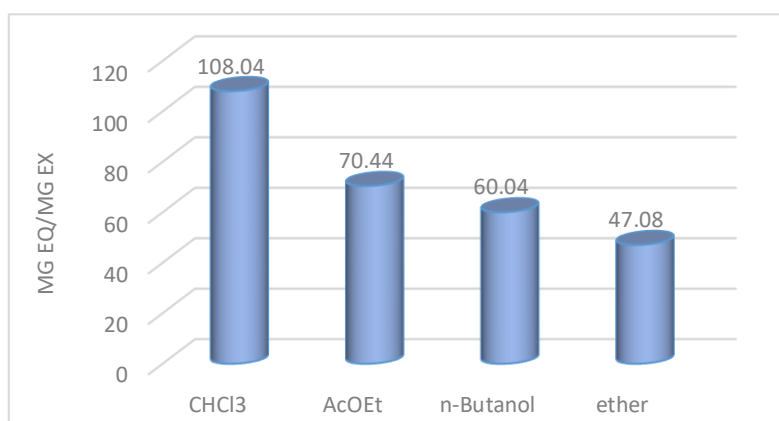


Figure III.4 : la teneur en flavonoïdes des extraits d'*Echium Trygorrhizum*

Tableau III.9 : les teneurs en flavonoïdes des différents extraits d'*Echium Trygorrhizum*

<i>Extrait</i> <i>Abs (nm)</i>	Extrait AcOEt	Extrait éther de pétrole	Extrait <i>n</i>- Butanol	Extrait CHCl₃
Teneur en flavonoïdes	70.44	47.08	60.04	108.04

Les concentrations des flavonoïdes (Figure III.4 et Tableau III.9 ci-dessus) sont relativement importants dans notre extraits, les teneurs en flavonoïdes sont de 108.04 µg EQ/mg dans l'extrait Chloroformique suivie de celles de l'extraits acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanols de 70.44 et 60.04 µg EQ/mg respectivement et enfin celle d'extrait éthérique avec 47.08.18 µg EQ/mg est faible par rapport à les autres extraits étudiées.

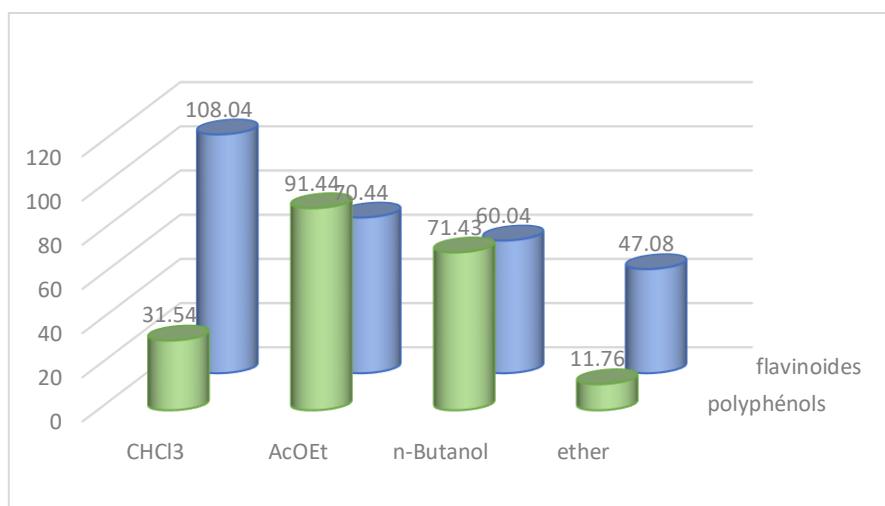


Figure III.5 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des quatre extraits d'*Echium Trygorrhizum*

Plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques tels que les méthodes d'extraction, les facteurs géographiques et climatiques, le patrimoine génétique, la période de la récolte, le degré de maturation de la plante ainsi que la durée de stockage [64].

III.4. Résultats des tests biologiques

III.4.1. Activité antioxydante

III.4.1.1 .résultats d'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti radicalaire d'*Echium Trygorrhizum* été déterminé par la méthode de DPPH à 517 nm par spectrophotomètre, en présence de l'acide ascorbique comme témoin positif. Les résultats se manifestent par un changement de couleurs du violet au jaune pour chaque extrait.

Tableau III.10 : pourcentage d'inhibition des extraits et de l'acide ascorbique selon différentes concentration

Concentration/extrait (mg/ml)	Extrait CHCl ₃	Extrait n-Butanol	Extrait AcOEt	Acide ascorbique
2	64	90	90	93
1	62	88	88	91
0,5	35	79	84	56
0,25	24	51	59	45
0,125	19	31	38	32

0,0625	17	21	25	0
0,03125	16	19	14	0
0,015625	8	12	11	0
0,0078125	7	11	10	0

Ce phénomène de la coloration observé signifie que les extraits contiennent une substance réductrice responsable de la réduction du DPPH, les résultats de test ont permis de tracer les graphes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour chaque extrait :

Ces courbes montrent que lorsque la concentration des extraits est élevée le pourcentage de réduction augmente jusqu'à un seuil où le pourcentage d'inhibition se stabilise avec l'évaluation de la concentration, la détermination de l'IC₅₀ (valeur correspond à 50 % d'inhibition) à travers les résultats obtenus vis-à-vis le standard :

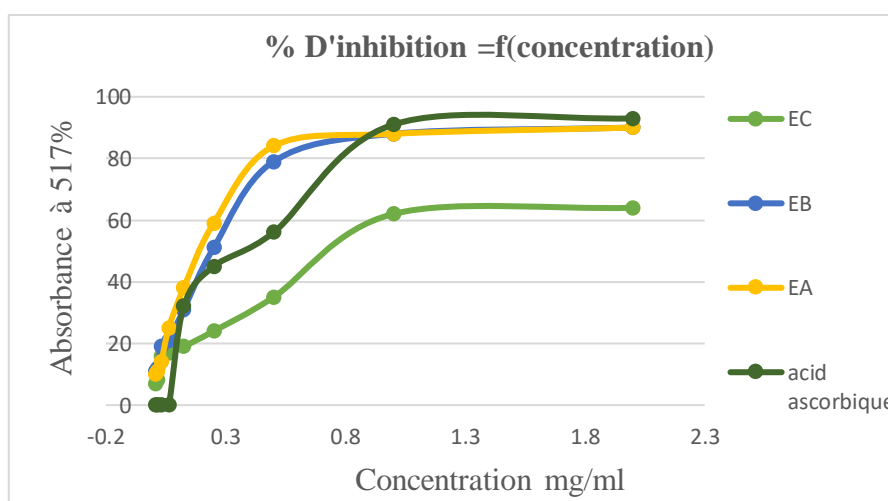


Figure III.6 : Les courbes d'activité antioxydante des extraits et de l'acide ascorbique

Tableau III.11 : la concentration (IC₅₀) pour les différents extraits et l'acide ascorbique

Extrait	E.C	E.B	E.A	Acide ascorbique
IC ₅₀ %(mg/ml)	0,68	0,25	0,18	0,35

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus l'ordre de l'activité antioxydante des extraits ainsi que la substance de référence l'acide ascorbique sont classés selon l'ordre décroissant suivant :

$$\text{E.A} > \text{E.B} > \text{A. Ascorbique} > \text{E.C}$$

Les IC_{50} obtenus par les extraits acétate et *n*-butanolique sont bien inférieurs que la molécule de référence, donc ces deux extraits marquent une activité antioxydante très élevée présentant des valeurs respectivement de 0,18 .0, 25 mg/ml, l'acide ascorbique avec $IC_{50} = 0,35$ mg/ml puis l'extrait chloroformique qui reprisant un grand pourcentage $IC_{50} = 0,68$ mg/ml en effet une activité antioxydante très faible. Nous remarquons que l'extrait acétate et l'extrait *n*-butanolique sont plus actifs en comparaison avec l'antioxydant standard ce qui indique la présence de composés efficaces dans la composition biochimique de la plante qui ont une capacité élevée dans la réduction du DPPH. Ces composés sont caractérisés par une polarité élevée.

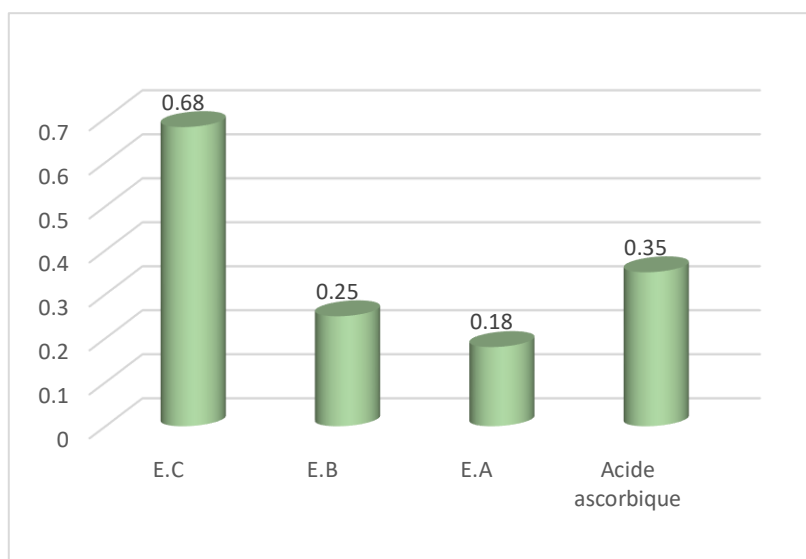


Figure III.7 : valeur IC_{50} des extraits d'*Echium Trygorrhizum* et de composé standard acide ascorbique

III.4.1.2. Résultats d'activité antioxydante par la méthode blanchissement du BCB

La technique de décoloration du β -carotène/ acide linoléique permet d'évaluer l'activité antioxydante des quatre extraits par inhibition de la peroxydation des lipides en suivant l'absorbance dans le temps.

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β - carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène.

Les résultats d'absorbances sont dans le tableau ci-dessous (tableau III.12) :

Tableau III.12 : les valeurs d'absorbance des extraits (BCB)

temps/Extrait	Acétate	<i>n</i> -butanol	Chloroformique	Ethérique	BHT
T=0 min	0,487	0,482	0,484	0,494	0,486
T=30 min	0,332	0,333	0,311	0,309	0,46
T=60 min	0,3085	0,314	0,278	0,280	0,46
T=90 min	0,3045	0,289	0,2685	0,268	0,456
T=120 min	0,3005	0,283	0,261	0,249	0,445

La cinétique de β -carotène en présence ou en absence des composés phénoliques dans les 4 extraits et celle de standard est montrée dans la figure suivante (figure III.8) :

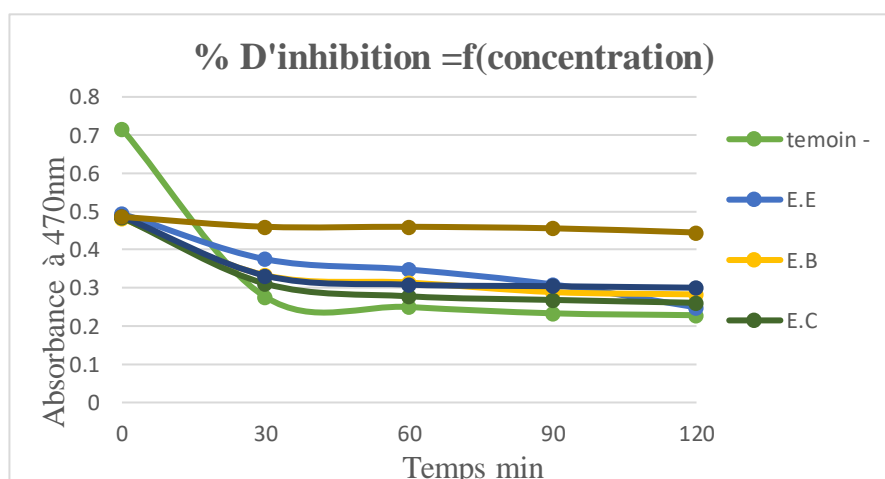


Figure III.8 : cinétique de l'inhibition de blanchissement du β -carotène par les extraits d'*Echium Trygorrhizum* et du témoin positif BHT

Les valeurs obtenues d'AA% (coefficient d'activité antioxydante) sont dans le tableau suivant (tableau III.13) :

Tableau III.13 : les valeurs d'AA% pour les différents extraits et le BHT .

Extrait	E.C	E.B	E.A	E.E	BHT
AA%	54,2	59,2	61,7	49,7	91,5

D'après les résultats du tableau, il est indiqué que les extraits acétate, de *n*-butanol et de chloroforme présente une activité faible en comparaison avec le témoin positif BHT, les valeurs

respectivement sont : 61,7% ; 59,2% ; 54,2% et 91,5% pour le BHT, l'extrait Ethérique représente une très faible activité antioxydante de 49,7 %.

À T= 0, les valeurs d'absorbance des extraits ainsi que du témoin sont presque identiques et avoisinent 1. Cela signifie qu'à ce moment-là, aucun radical qui a été formé dans le milieu réactionnel [65].

À T=120 min, l'absorbance commence à diminuer progressivement, ce qui indique la formation des radicaux libre dans le milieu réactionnel. Ces radicaux sont générés par la dégradation des doubles liaisons de l'acide linoléique en présence du Tween 40.

L'étude de la cinétique de blanchissement du β -carotène montre une diminution progressive de son absorbance avec le temps. Après 2 heures, un état d'équilibre est atteint, car le nombre de radicaux libres devient important. Après cette période, la diminution de l'absorbance reste constante, ce qui indique que toutes les doubles liaisons présentes dans le β -carotène sont dégradées, ce processus aboutit à l'épuisement irréversible du pigment jaune, se traduisant par une transformation en une couleur blanche. On parle alors de blanchissement total du β -carotène [66].

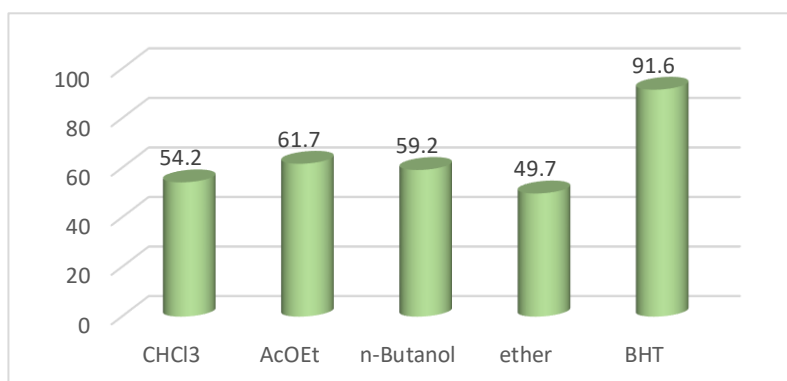


Figure III.9 : Activité antioxydante relative des extraits d'*Echium Trygorrhizum* et du BHT dans le système β -carotène/acide linoléique

III.4.2. Résultat de l'évaluation de l'activité antimicrobienne

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antimicrobien des quatre extraits bruts de notre plantes par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries et les moisissures ,et sur le milieu gélose sabouraud pour les champignons .

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de sept (07) germes

pathogènes d'origine hospitalière : (05) bactéries Gram + et Gram - et deux (02) champignons à savoir une seule moisissure et une levure.

III.4.2.1. Résultats du test préliminaire

Si les extraits doivent être soumis à des essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés [67]. À ce regard, le DMSO a été testé comme solvant et les résultats ont montré qu'il est approprié et n'a aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes.

III.4.2.2. Activité antibactérienne des extraits bruts par la méthode des disques

Les résultats de l'activité antibactérienne in vitro des quatre extraits de la plante médicinale étudiée sont confiés dans le tableau ci-dessous (tableau III.14) :

Tableau III.14 : Diamètre de la zone d'inhibition des différents extraits d'*Echium Trygorrhizum*.

Diamètres zones d'inhibition de la croissance (mm)							
		E.AcOEt	E.Ether	E.n-BuOH	E.CHCl ₃	Temoin + (ATB.ATF)	Temoins – (DMSO)
Gram - Bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	8	9	10	22	-
	<i>Echerichia. coli</i>	8.5	13	8	7	26	-
	<i>Salmonella enterica</i>	13	11	12	10	22	-
Gram+ Bactéries	<i>Bacillus cereus</i>	13	11	12.5	8	22	-
	<i>Staphylococcus aureus.</i>	10	12	10	7	24	-
Levures	<i>Candida albicans</i>	15	14	13	10	29	-
Champignon	<i>Aspergillus niger</i>	12	-	14	10	-	-

Les effets inhibiteurs de la croissance des germes sont manifestés par des extraits bruts à partir d'une concentration de 60 mg/ml, sur 5 bactéries et deux champignons. Les diamètres d'inhibition sont mesurés en fonction de la dose de 30 µl appliquée sur le disque.

Pseudomonas aeruginosa : Les résultats de l'antibiogramme ont révélé une activité modérée de l'extrait acétate d'éthyle (14 mm) et de l'extrait *n*-butanol (9 mm) contre la bactérie. L'extrait étheré a montré une activité relativement faible avec une zone d'inhibition de 8 mm, tandis que l'extrait chloroformique a présenté une activité similaire avec une zone d'inhibition de 10 mm. Ces résultats préliminaires ont révélé que les extraits testés ont une certaine capacité à inhiber la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*. L'antibiotique de référence a montré une zone d'inhibition de 22 mm, ce qui indique une activité significative contre la bactérie.

Escherichia coli : Les résultats des extraits testés contre la bactérie sont les suivants : L'extrait étheré a montré la plus grande activité, avec une zone d'inhibition de 13 mm, indiquant une inhibition significative de la croissance d'*Escherichia coli*. En revanche, les extraits acétate d'éthyle, *n*-butanol et chloroformique ont présenté des activités modérées à faibles, avec des zones d'inhibition respectives de 8,5 mm, 8 mm et 7 mm. Comparé aux extraits, l'antibiotique de référence a affiché une efficacité élevée avec une zone d'inhibition de 26 mm.

Salmonella entérica : Les résultats indiquent différentes activités des extraits testés. L'extrait acétate d'éthyle a montré une activité modérée avec une zone d'inhibition de 13 mm, suggérant une certaine capacité à inhiber la croissance de *Salmonella entérica*. De même, l'extrait étheré a présenté une activité prometteuse avec une zone d'inhibition de 11 mm. Les extraits de *n*-butanol et de chloroforme ont également montré des activités modérées avec des zones d'inhibition respectives de 12 mm et 10 mm. Cependant, il est important de noter que l'antibiotique de référence a montré une zone d'inhibition de 22 mm.

Bacillus cereus : Les résultats des activités variables des extraits testés. L'extrait acétate d'éthyle a montré une activité modérée avec une zone d'inhibition de 13 mm, suggérant une capacité à inhiber partiellement la croissance de la bactérie. L'extrait étheré a présenté une activité prometteuse avec une zone d'inhibition de 11 mm. De même, l'extrait *n*-butanol a également montré une activité modérée avec une zone d'inhibition de 12,5 mm. Cependant, l'extrait chloroformique a montré une zone d'inhibition de 8 mm, indiquant une inhibition limitée de la croissance bactérienne. L'antibiotique de référence a montré une zone d'inhibition de 22 mm, indiquant une activité significative

Staphylococcus aureus : L'extrait acétate d'éthyle et l'extrait n-butanol ont montré une activité modérée avec des zones d'inhibition de 10 mm chacun, suggérant une capacité à inhiber partiellement la croissance de la bactérie. L'extrait étheré a présenté une activité plus élevée avec une zone d'inhibition de 12 mm, indiquant une inhibition plus significative. En revanche, l'extrait chloroformique a montré une activité relativement faible avec une zone d'inhibition de 7 mm, indiquant une inhibition limitée de la croissance bactérienne. L'antibiotique a montré une zone d'inhibition de 22 mm, indiquant une efficacité élevée contre *Staphylococcus aureus*.

Candida albicans : Les résultats révèlent des activités variables des extraits testés. L'extrait acétate d'éthyle a montré une activité élevée avec une zone d'inhibition de 15 mm, suggérant une capacité significative à inhiber la croissance de *Candida albicans*. De même, l'extrait étheré a présenté une activité prometteuse avec une zone d'inhibition de 14 mm. L'extrait n-butanol a également montré une activité modérée avec une zone d'inhibition de 13 mm. En revanche, l'extrait chloroformique a montré une activité relativement faible avec une zone d'inhibition de 10 mm, indiquant une inhibition limitée de la croissance fongique. L'antifongique de référence a montré une zone d'inhibition de 29 mm, indiquant une activité significative et une efficacité élevée contre *Candida albicans*.

Aspergillus niger : L'extrait acétate d'éthyle a montré une activité modérée avec une zone d'inhibition de 12 mm, suggérant une capacité à inhiber partiellement la croissance du champignon. En revanche, l'extrait étheré n'a montré aucune activité inhibitrice indiquant une absence d'effet sur *Aspergillus niger*. L'extrait n-butanol a présenté une activité prometteuse avec une zone d'inhibition de 14 mm, suggérant une inhibition significative de la croissance du champignon. Cependant, l'extrait chloroformique a montré une activité relativement faible avec une zone d'inhibition de 10 mm, indiquant une inhibition limitée. L'antifongique de référence n'a montré aucune zone d'inhibition, indiquant une inefficacité contre *Aspergillus niger*.

Lors des essais biologiques, le solvant utilisé, en l'occurrence le DMSO, a été testé et s'est avéré approprié, n'affectant pas la croissance normale des souches microbiennes. Ainsi, les effets observés sont attribuables aux composés actifs des extraits et non à des interactions indésirables avec le solvant.

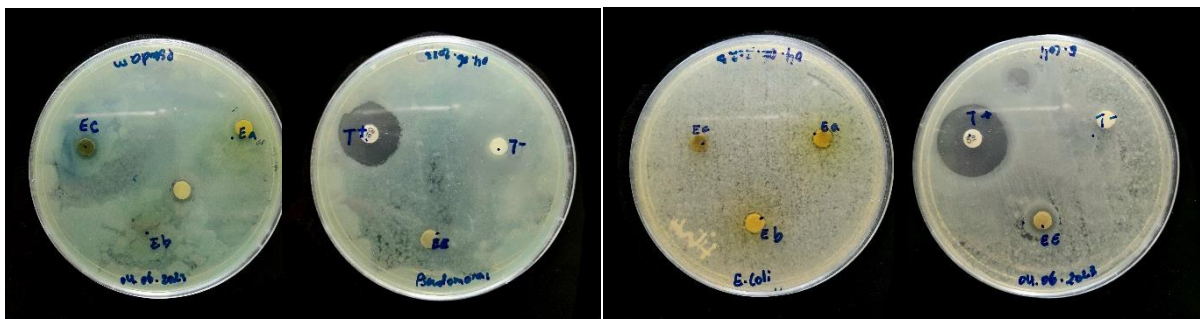
L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés [68].

Selon l'activité antibactérienne [69], dépend de plusieurs facteurs à savoir : l'espèce de la plante, la préparation de l'extrait et la sensibilité des bactéries. L'activité antibactérienne des

poly-phénols d'*Anchusa Azurea* Mill (famille de Boraginaceae) qui sont extraits par chloroforme et l'acétate d'éthyle sont les plus actifs sur la plupart des bactéries testées (3 souches de Gram- : *E. coli* ATCC25922, *Salmonella thyphimurium* ATCC1331, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 et 2 souches de Gram+ , *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC10876) dont le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 8 et 11 mm par rapport à l'extrait de poly-phénols à base de méthanol [70].

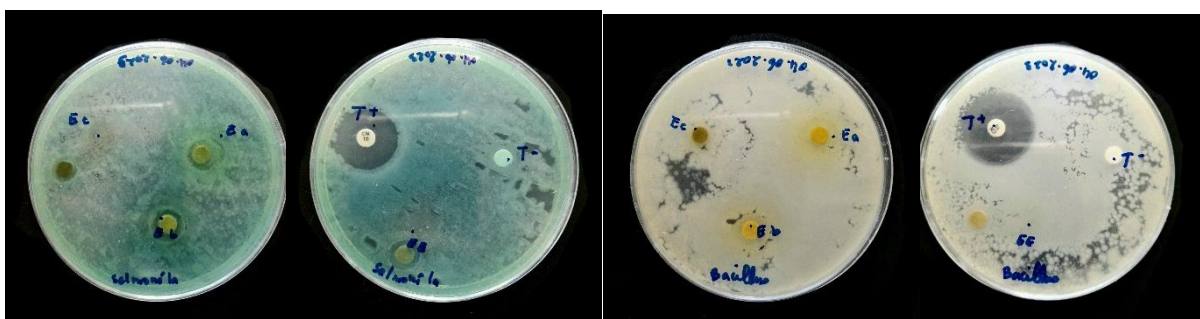
Une étude réalisée par [71] suggère la présence de substances à activité antimicrobienne dans les extraits méthanoliques obtenus à partir des feuilles de la consoude :

Symphytum officinale (famille de Boraginaceae) et qui sont capables d'inhiber la culture de trois microorganismes : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida nomosa* [72]. A partir de ces données, on conclut que les espèces de la famille de Boraginaceae ne possèdent pas une bonne activité antimicrobienne, ce qui indique que nos résultats se concordent avec les travaux déjà réalisés. Plusieurs études ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram+ par rapport aux Gram à l'action des antibiotiques et des extraits naturels des plantes médicinales [73-77] qui est attribuée à la différence de la composition des parois des bactéries selon le type Gram.



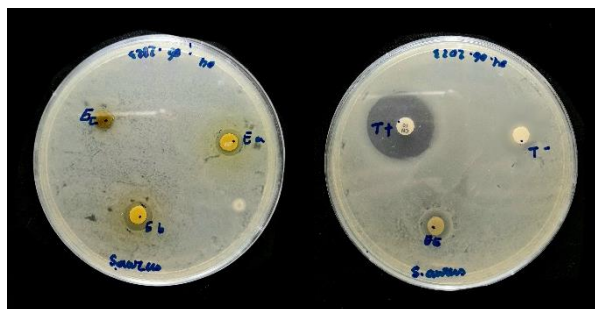
Pseudomonas aeruginosa

Echerichia. coli



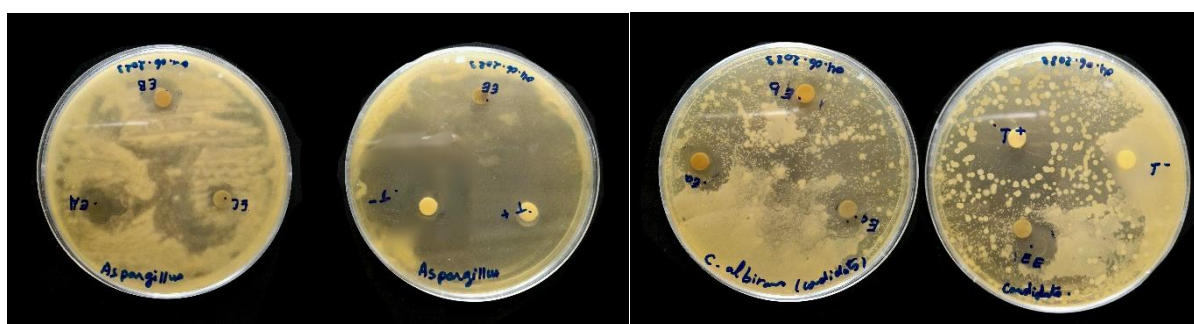
Salmonella thyphimurium

Bacillus cereus



Staphylococcus aureus

Figure III.10 : résultats des activités antibactériennes et antifongiques des extraits étudiés.



Aspergillus niger

Candida albicans

Figure III.10 : résultats des activités antibactériennes et antifongiques des extraits étudiés (suite).

Conclusion

Dans cette étude, les parties aériennes du genre *Echium. T* ont été soumises à un screening phytochimique, révélant la présence de flavonoïdes, tanins, di-terpènes, alcaloïdes, saponosides, terpènes, anthraquinones, sucres et stérols. Les extraits organiques ont été obtenus en utilisant des différents solvants, et les rendements variaient entre 0,06% et 2,06%.

Les extraits ont été évalués pour leur activité biologique. L'activité antioxydante a été mesurée à l'aide de deux méthodes, montrant des pourcentages d'inhibition allant de 49,7% à 61,7% pour les extraits testés. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur différentes souches bactériennes et champignons, montrant des activités variables selon les extraits. L'extrait acétate d'éthyle a été modérément actif contre certaines bactéries et a présenté une activité élevée contre *Candida albicans*. L'extrait étheré a également montré une activité prometteuse contre certaines bactéries, mais aucune activité contre *Aspergillus niger*. Les extraits *n*-butanol et chloroformique ont montré des activités généralement modérées à faibles.

Conclusion

Conclusion générale

Ce travail nous a été confié dans le cadre du stage de fin de cycle du master 2 « Chimie des produits naturels ». L'objectif principal de cette étude porte sur les propriétés phytochimiques et biologiques d'une plante médicinale appartenant à la famille des Boraginaceae, nommée "*Echim trygorhizum*". Cette espèce a été choisie en raison de son utilisation médicinale bien établie. Originaires d'Afrique du Nord, cette plante sauvage est localement connue sous les noms de « Hamar » ou « Hmimiche ».

Dans le cadre de ce travail nous avons tout d'abord effectué le screening phytochimique des parties aériennes de cette espèce pour déterminer la nature des métabolites secondaires qu'elle accumule. Cette étude a montré essentiellement la présence des flavonoïdes, tanins, diterpènes, alcaloïdes, saponosides, terpènes, anthraquinones, sucres et stérols. Ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques. L'estimation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux dans les extraits analysés montre que sont les plus riches en ces métabolites.

Le dosage des polyphénols totaux de ces extraits a été effectué par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Les teneurs en polyphénols totaux montrent que l'extrait AcOEt représente la teneur la plus élevée de l'ordre de 91,44 mg EAG /g, tandis que la teneur la plus basse a été obtenue avec l'extrait d'éther de pétrole de l'ordre de 11,76 mg EAG /g.

Le dosage quantitatif des flavonoïdes de ces extraits a été réalisé par la méthode au trichlorure d'aluminium en équivalent à la quercétine. Les résultats révèlent que l'extrait CHCl₃ est plus riche en flavonoïdes 108,64 mg EQ/g, alors que la teneur la plus basse a été obtenue avec l'extrait éther de pétrole de l'ordre de 47,08 mgEQ/g.

Par ailleurs, nous avons également effectuée une valorisation des activités biologiques par la recherche de l'activité antioxydante sur les différents extraits des parties aériennes de cette espèce, par deux méthodes différentes : la méthode de réduction de radical libre DPPH, et le blanchissement du β -carotène.

Les extraits acétate et *n*-butanol ont montré des valeurs d'IC₅₀ bien inférieures à celle de la molécule de référence, ce qui indique une activité antioxydante très élevée. Les valeurs obtenues pour ces extraits étaient respectivement de 0,18 et 0,25 mg/ml, tandis que l'acide ascorbique, utilisé comme antioxydant standard, avait une valeur d' IC₅₀ de 0,35 mg/ml. En

revanche, l'extrait chloroformique a montré une activité antioxydante très faible, avec un IC₅₀ de 0,68 mg/ml.

Il est intéressant de noter que les extraits acétate et *n*-butanol ont montré une activité plus élevée que l'antioxydant standard, ce qui suggère la présence de composés efficaces dans la composition biochimique de la plante. Ces composés semblent avoir une polarité élevée et une capacité élevée à réduire le DPPH, un indicateur couramment utilisé pour évaluer l'activité antioxydante.

L'activité antioxydante du β -carotène indiquent que les extraits acétate, *n*-butanol et chloroforme présentent une activité relativement faible par rapport au témoin positif BHT. Les valeurs d'activité antioxydante obtenues pour ces extraits étaient respectivement de 61,7 %, 59,2 % et 54,2 %, tandis que le BHT a montré une activité élevée de 91,5 %. En revanche, l'extrait éther de petrolol a montré une activité antioxydante très faible, avec un pourcentage de 49,7 % seulement.

Les résultats suggèrent donc que les extraits acétate, *n*-butanol et chloroforme ont une activité antioxydante inférieure à celle du BHT, qui est utilisé comme témoin positif. En comparaison, l'extrait éthérique présente une activité antioxydante encore plus faible.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur cinq souches bactériennes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus ceureus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, et deux champignon *Candida albicans* et *Aspergillus niger*, selon la méthode de diffusion de disque sur gélose Mueller Hinton pour les bacteries et sabouraud pour les champignons, Les extraits testés ont montré des activités variables contre ces micro-organismes.

L'extrait acétate d'éthyle a présenté une activité modérée contre plusieurs espèces bactériennes et une activité élevée contre *Candida albicans*. L'extrait éthéré a montré une activité potentiel contre certaines bactéries mais était inactif contre *Aspergillus niger*. Les extraits *n*-butanol et chloroformique ont montré des activités généralement modérées à faibles.

Cette étude met en évidence que les parties aériennes de la plante *E. trygorhizum* renferment une variété de composés phytochimiques, révélant des activités antioxydantes intéressantes. Cependant, il convient de noter que l'activité antimicrobienne de ces parties de la plante est relativement faible par rapport à la concentration utilisée. Ces résultats suggèrent que les propriétés antioxydantes pourraient être importante pour la recherche pharmaceutique ou l'élaboration de produits naturels.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1]. Hurtel, J.-M., Huiles essentielles et médecine. Aromathérapie ; (2006).
- [2]. Ameenah G, Plantes médicinales: traditions d'hier et drogues de demain, Molecular aspects of Medicine 27 (1), 1-93 ; (2006).
- [3]. Ghazghazi.H., Chedia,A., Abdererazak,M. et Brahim,H. Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques des quatre plantes collectées du nord de Tunisie. Microbial.Hyg.Alim.73(25) : 37-41; (2013).
- [4]. Al-Bayati. A. F., Khudir D. S, In vitro activité antimicrobienne de salvadora persica .L. Université de Mossoul. Irak : 57-62 ; (2007).
- [5]. D Praslickova, E Ricci, S Subramanian... - Frontiers in plant ..., - frontiersin.org; (2018).
- [6]. Gontier E. Effets de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. Cultivé en conditions hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de lorraine, 211p ; (2008).
- [7]. Cheurba M. Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé. Thèse de doctorat, Université Hassiba Ben bouali (Chlef), 102p ; (2015).
- [8]. Cabalion P. Les substances naturelles végétales, leur intérêt biologique, leurs perspectives d'application. Industrie Mulhouse, 4 : 58-69 ; (1990).
- [9]. Bremer K., Bremer B. and Thulin M. Introduction to Phylogeny and Systematics of Flowering Plants. Uppsala University, Stockholm, 102p ;(2003).
- [10]. Gandini C. Etude phytochimique d'une plante médicinale péruvienne *Cordia lutea* Lam. ayant démontré une activité biologique contre la bactérie *Helicobacter pylori*. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, 93p ; (2016).
- [11]. Tiwari S. Plants: a rich source of herbal medicine, Journal of Natural Products, 1: 27-35;(2008).
- [12]. Bowe L. M. and Yatskievych G. *Cynoglossum creticum* in North America, LUNDELLIA, 19: 39-46; (2016).

- [13]. Recibido el .A revision of the genuse Echium in macaronesia D. Bramwell .Department of Botany, The University, Reading, England;(26 de mayo de 1972).
- [14]. Recibido el . Taxonomic studies on the genus Echium I. An outline revision of the spanich species P. E. GIBBS Department of Botany, The University, St. Andrews, Scotland;(15 de mayo de 1971).
- [15]. Anonyme Guide illustré de la Flore Algérienne, W. d'Alger & Mairie de Paris, N° ISBN : 978-2-7466-4242-3, 95p ; (2011).
- [16]. Hamidi A. Etude phytochimique et activité biologique de la plante Limoniastrum guyonianum. Mémoire de magister, Chimie organique, Université Kasdi Merbah (Ourgla), 111p ; (2013).
- [17]. Boudjouref M. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'Artemisia campestris L. Mémoire de magister, Université Ferhat Abbes (Sétif), 99p ; (2011).
- [18]. Benhamza L. Effets biologiques de la petite Centauree Eryhraea Centaurium (L) pers. Thèse de doctorat, Université de Mentouri (Constantine), 266p ; (2008).
- [19]. Krief S. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (pan troglodytes Schweinfurth) en Ouganda : activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat, 343p ; (2003).
- [20]. Bruneton J. Phytochimie et plante médicinale. J. pharmacognosie. 3eme Ed Lavoisier, Paris, 1120p ; (1999).
- [21]. Heller et al. Heller R., Esnault R. et Lance C., 2004.Physilogie végétale II, Développement. Ed, dunod , paris . 64-240 pp ;(2004).
- [22]. Brunton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 4 emeEd Lavoisier, Paris, 1288p ; (2009).
- [23]. Zeghouane H. Essai de caractérisation phytochimique des extraits de quelques plantes médicinales du Sahara septentrionel Est- Algérien. Mémoire master académique, Université Kasdi Merbah (Ouargla), 54p ; (2014).

- [24]. Kebbab R. Etude du pouvoir antioxydant des poly-phénols issus des margines d'olives de la variété Chamlal : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation. Mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri (Tizi-Ouzou), 116p. (2014).
- [25]. Kebili Z. Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits d'Ephedra alata de la région d'Ouargla. Mémoire de magister. Université Kasdi Merbah (Ouargla), 102p (2016).
- [26]. Khater F. Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse des composés phénoliques .Thèse de doctorat, Ecole doctorale (France), 198p. (2011).
- [27]. Kholkhal F. Etude Phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de Thymus ciliatus ssp coloratus et ssp euciliatus. Thèse de doctorat, université Abou bekr Belkaid, 164p. (2014).
- [28]. Cheurba M. Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé. Thèse de doctorat, Université Hassiba Ben bouali (Chlef), 102p. (2015).
- [29]. FAO et OMS. Guide FAO/OMS d'application des principes et des procédures d'analyse des risques lors des urgences en matière de sécurité sanitaire des aliments. Rome. (2011). (Consultable à l'adresse suivante: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78041>)
- [30]. Lanzelotti P. Les alcaloïdes des miels. Universidad Nacional de Luján, 145 :14-15. (2011).
- [31]. Gandini C. Etude phytochimique d'une plante médicinale péruvienne Cordia lutea Lam. ayant démontré une activité biologique contre la bactérie Helicobacter pylori. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, 93p. (2016).
- [32]. Heywood VH, Brummitt RK, Culham A, Seberg O. Flowering Plant Families of the World. Kew: Royal Botanic Gardens. (2007).
- [33]. Les feuilles de la plante d'Echium trygorhizum - OuledAli (gps: 31.9472, -3.5422) 2017/04/07.
- [34]. [Extrait de la "Flore du Maroc analytique, descriptive et illustrée" de Ch. Sauvage et J. Vindt] N° 2495.

- [35]. Fleures de la Plante *Echium trygorrhizum* - Boudnib 2015/03/17
- [36]. Nouv. Tapis. Fl. Atl. 1 . Dobignard Alain. Contributions à la connaissance de la flore du Maroc et de l'Afrique du Nord. Nouvelle série. I. In: *Le Journal de botanique*, n°20, 2002. pp. 5-43. (1874). www.persee.fr/doc/jobot_1280-8202_2002_num_20_1_1872
- [37]. Maire in Jahandiez & Maire. Jahandiez, E – René Maire :Catalogue des plantes du Maroc spermatophytes et ptéridophytes / tome 2et 3 Relié. (1932) .
- [38]. *Echium trygorrhizum* Pomel Location: Morocco, voucher: Chatelain 2525 2014-05-27
- [39]. Dohou, R., et al. Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroides*. Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux, 142(1/4): p. 61-78. (2003).
- [40]. Usman, H., F.I. Abdulrahman, and A. Usman, Qualitative phytochemical screening and in vitro antimicrobial effects of methanol stem bark extract of *Ficus thonningii* (Moraceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 6(3). (2009).
- [41]. Sheel, R., K. Nisha, and J. Kumar, Preliminary phytochemical screening of methanolic extract of *Clerodendron infortunatum*. *IOSR J. Appl. Chem*, 7(1): p. 10-3. (2014).
- [42]. **N'Guessan, K., et al. (2009).**Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1).
- [43]. Bassène, E., Initiation à la recherche sur les substances naturelles: Extraction-AnalyseEssais Biologiques. P.150. (2012) .
- [44]. Bekro, Y.-A., et al. Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, 4(2): p. 217-225. (2007).
- [45]. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*.1(1):98- 106. (2011).
- [46]. Pandey A and Tripathi S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(5):115-119. (2014).
- [47]. Wong SP, Leong LP, William-Koh JH, Antioxidant activities of extracts of selected plants. *Food Chem* 99: 775–83. (2006).

- [48]. Vuorela, S. Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki. (2005)
- [49]. Ribéreau-Gayon , J . Peynaud , m.Ribéreau-Gayon , P . and Sudraud ,P. Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins. Ed. Dunod, Paris, p. 671. (1972).
- [50]. Marinova et al. est "Antioxidant activity of extracts from selected plant species native of the Carpathian Basin".(2005).
- [51]. Latifou Lagnika. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. [Lille thèses](#) 267 pages.(2005).
- [52]. S.B.Kedare and R.P. Singh,'Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay'. J.Food Sci.Technol .vol. 48, n° 4. Pages 412-22 (2011).
- [53]. Liang, N. and D.D. Kitts, Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11): p. 19180-19208. (2014).
- [54]. P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity, *Son KlamaKarin J.Sci, Technol*, 26 (2) 211-219 . (2004).
- [55]. Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA, Linssen PH. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolationprocedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 77: 140 - 146. (1998).
- [56]. Kadri A, Zarai A, Békir A, et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *Afr J Biotechnol* 10: 3908–14. (2011).
- [57]. Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical analysis*,; 13(1), 8-17. (2002).
- [58]. Amin Ismail; Tan Siew Hong. September . Antioxidant Activity of Selected Commercial Seaweeds. *Mal J Nutr* 8(2): 167-177. (2002).
- [59]. Broadasky T. F., Lewis C., Eble T.E. Bioautographic thin layer chromatophic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr.*, 123, 33-44. (1976).
- [60]. Gélose Mueller-Hinton : Principe, Préparation and Procedure

- [61]. Mihajilov-Krstev T. Radnovié D., Kitié D., Zlatkovié B., Ristié M., Brankovié S. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Cent Eur J. Biol.*, 4(3), 411-416. (2009).
- [62]. Pharmacopée européenne. Direction de la qualité du médicament, Council of Europe, 2623p. (2002).
- [63]. C. Mutai., C. Vafias., D. Abatis., V. Roussis. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extract and lupine triterpenes, *Journal of Ethnopharmacology*, 10, 1016-1050. (2009).
- [64]. Pendneault K, Leonharts A, Gosselin A, Ramputh A, Arnason JT. Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux. Texte de conférence, Canada, 1-5. (2001).
- [65]. Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, et al. Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie* 12:15-2. (2014).
- [66]. Su MS, Shyu YT, Chien PJ. Antioxydant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chem* 111: 892-6. (2008)
- [67]. Yrjöen T. Extraction and Planar. Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki, p. 76. (2004).
- [68]. Essawi T, Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 70: 343–349. (2000)
- [69]. Loziene K. & Venskutonis P.R. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33, 517-525. (2005).
- [70]. Boussoualim N. Activités biologiques de plantes médicinales *Anchusa azurea* Mill. et *Globularia alypum* L. Thèse de doctorat, Université de Ferhat Abbas (Sétif), 136p. (2014).
- [71]. Tarle D., Petritic J., and Kupinic M. Antimicrobial activity of common comfrey. (1982).
- [72]. Recurt- Carrere A. La grande consoude. Sciences pharmaceutiques, Thèse de doctorat, Université Paul sabatier, 116p . (2015).

[73]. Koné W. M., Kamanzi Atindehou K., Terreaux C., Hostettmann K., Traoré D. and Dosso M. Traditional medicine in Northe Cote –d’Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Ethnofarmacol*, 93: 43-93. (2004).

[74]. Hayouni A. E; Abedrabba M., Bouix M. and Hamdi M. The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. Fruit extracts. *Food. chem.*, 4: 45-58. (2007).

[75]. Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F. and Polat G. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contenents and antioxidant and antibacterial activities of Black Tea. *Molécules*, 12: 484-496. (2007).

[76]. Shan B., Cai Y., Brooks J. D. and Corche. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of microbiologie*, 117: 112- 119. (2007).

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