

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB – BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

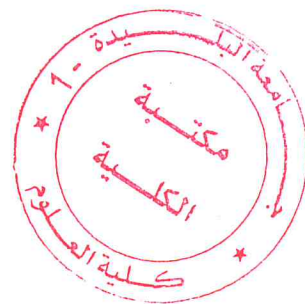


Mémoire présenté par

BOUSLAMI KHADIDJA

En vue de l'obtention
Du diplôme de Master en chimie

Option : Chimie des Produits Naturels



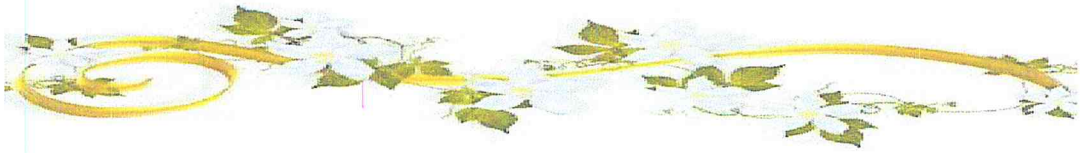
THEME

Etude de la composition chimique et de l'activité
biologique de l'huile essentielle et des extraits de l'espèce
Satureja calamintha (Lamiaceae).

Soutenu le 03/07/2017, devant le jury composé de :

B. Kadri	CMB	Président	Université de Blida 1.
R. Zahi	CMB	Examineur	Université de Blida 1.
O. Touafek	CMB	Promotrice	Université de Blida 1.

Année universitaire : 2016/2017



REMERCIEMENTS

En premier lieu et avant tout je tiens à remercier le bon DIEU « الله » le tous puissant qui ma donné la santé, le courage, la patience et la force de terminer ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier mon encadreur Madame O. Touafek, Maître de Conférences au département de chimie, Université SAAD DAHLEB –DLIDA 1, pour ses conseils, son encouragement et sa bienveillance.

Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude pour m'avoir guidée et aidée tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer mes sincères remerciements et toute ma gratitude à monsieur le professeur M. EL HATTAB, pour son aide et son soutien à tout les moments. Sa gentillesse et ses grandes qualités humaines ont fait de lui un responsable très spécial.

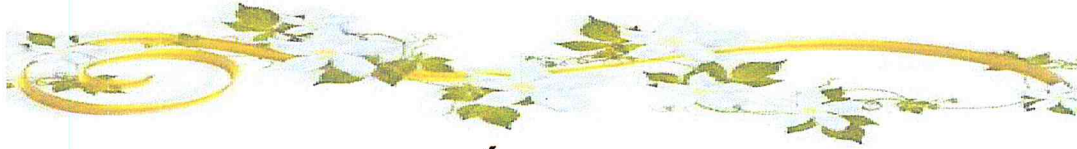
J'exprime mes plus sincères remerciements aux membres de jury qu'ils ont accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et de participer au jury de ma soutenance.

Je souhaite adresser mes remerciements à tout l'ensemble du personnel de laboratoire de chimie en particulier M^{me} S. CHIBI pour son aide précieuse.

Mes remerciements vont aussi à tout l'ensemble du personnel du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) où l'analyse chromatographique (CG/SM) a été effectuée.

Je remercie infiniment M^r D. Toufahi de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire ainsi que tout le personnel du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida pour les analyses biologiques.

Enfin, ma profonde gratitude va à l'égard de toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.



DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail :

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie
ma mère qui veille à ma réussite et mon bonheur pour son sacrifice et soutien qui
m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*A mon cher père qui a toujours cru en moi et a mis à ma disposition tous les
moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études.*

*A mon cher frère et mes sœurs, pour leurs soutiens et leurs encouragements qu'ils
m'ont apporté avec toute mon affection et ma reconnaissance. C'est grâce à votre
encouragement et votre soutien que je suis arrivée jusqu'ici.*

*A toute ma famille, Je vous remercie de votre patience vous m'avez aidé
toujours à avancer, pour le soutien moral au moment difficile, merci d'être
toujours près de moi, famille avec laquelle je souris.*

*A mes très chères amies, je dédie ce travail à toute notre préparation,
les jours et les nuits blanches, nos larmes et nos fous rires, nos déception et nos
éclat de joie. A notre belle amitié.*

*En fin à tous les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à
un moment ou à un autre et qui ont participé à faire de moi celle que je suis
aujourd'hui.*

Khadija.

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Recherche bibliographique	
I. Présentation de la famille des Lamiacées.....	2
II. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Satureja</i>	3
1. Présentation botanique du genre <i>Satureja</i>	3
2. Place dans la systématique botanique.....	3
3. Propriétés thérapeutiques.....	4
4. Travaux antérieurs sur le genre <i>Satureja</i>	4
4.1. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles des quelques espèces du genre <i>Satureja</i>	4
4.2. Travaux antérieure sur les métabolites secondaires de quelques espèces du genre <i>Satureja</i>	8
III. Recherche bibliographique sur l'espèce <i>Satureja calamintha</i>	11
1. Présentation de l'espèce <i>Satureja calamintha</i>	11
1.1. Classification systématique.....	11
1.2. Description botanique.....	11
1.3. Distribution géographique.....	12
1.4. Propriétés thérapeutiques.....	12
2. Etude antérieur sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce <i>Satureja calamintha</i>	12
Chapitre II : Etude de la composition chimique de l'espèce <i>Satureja calamintha</i>	
I. Extraction de métabolites secondaires de l'espèce <i>Satureja calamintha</i>	18
1. Matériel végétal.....	18
2. Protocole d'extraction.....	18
3. Calcul du rendement.....	21
4. Analyse des extraits par CCM.....	22
5. Screening phytochimique.....	23
1. Les terpènes et les triterpènes.....	24
1.1. Les terpènes.....	24
1.2. Les triterpènes.....	24
2. Stéroïdes et des stérols.....	25

3. Les phénols.....	25
4. Les flavonoïdes.....	26
6. Extraction de l'huile essentielle.....	27
1. Principe d'extraction.....	27
2. Protocole d'extraction.....	27
3. Analyse de l'huile essentielle par CPG/SM.....	28
3.1. Conditions opératoires.....	28
3.2. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle.....	29
7. Dosage des polyphénols totaux.....	32
7.1. Principe.....	32
7.2. Mode opératoire.....	33
7.3. Résultats et discussion.....	34
Chapitre III : Etude de l'activité biologique de l'espèce <i>Satureja calamintha</i>	
I. Etude de l'activité anti-oxydante de l'espèce <i>Satureja calamintha</i>	36
1. Principe.....	36
2. Protocole expérimentale.....	37
3. Résultats et discussion.....	38
II. Etude de l'activité antimicrobienne de l'espèce <i>Satureja calamintha</i>	41
1. Principe de la méthode.....	41
1.1 antibiogramme.....	41
1.2 principe.....	42
2. Microorganismes utilisés.....	42
3. Antibiotiques et antifongique utilisés.....	43
4. Protocole expérimental.....	43
5. Résultats et discussion.....	45
Conclusion.....	48
Références bibliographiques.....	50
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Intérêt pharmacologique de quelque espèce de la famille des Lamiacées.....	2
Tableau 2 : travaux antérieurs sur la composition chimique des huiles essentielles de quelques espèces du genre <i>Satureja</i>	5
Tableau 3 : La composition chimique de l'huile essentielle de <i>Satureja calamintha</i> récolté en Belgique.....	13
Tableau 4 : La composition chimique de l'huile essentielle de <i>Satureja calamintha</i> récolté en Italie.....	14
Tableau 5 : La composition chimique de l'huile essentielle de <i>Satureja calamintha</i> récolté en Algérie.....	15
Tableau 6 : Aspect, couleur et rendement de différents extraits de <i>Satureja calamintha</i>	21
Tableau 7 : Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits des feuilles de <i>Satureja calamintha</i>	22
Tableau 8 : Résultats du test phytochimique pour les terpènes et les triterpènes.....	24
Tableau 9 : Résultats du test phytochimique pour les stéroïdes et stéols.....	25
Tableau 10 : Résultats du test phytochimique pour les phénols.....	26
Tableau 11 : Résultats du test phytochimique pour les flavonoïdes.....	26
Tableau 12 : Résultats d'analyses chromatographiques (CPG/SM) de l'huile essentielle de <i>Satureja Calamintha</i>	30
Tableau 13 : Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.....	33
Tableau 14 : Teneurs en polyphénols totaux existant dans les extraits EA et EMb.....	35
Tableau 15 : Variation des absorbances et pourcentage de réduction du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique (EM), d'acétate d'éthyle (EA) et du standard (Vit C).....	39
Tableau 16 : L'IC ₅₀ et l'ARP des extraits méthanolique brut (EMb), d'acétate d'éthyle (EA) et du standard.....	40
Tableau 17 : Microorganismes utilisés.....	42
Tableau 18 : Les diamètres des zones d'inhibition exprimé en mm de l'HE, extraits, ATBs et ATFs relatives aux différentes souches microbiennes.....	45

Liste des figures

Figure 1: Structures des composés présents dans l'HE de quelques espèces du genre <i>Satureja</i>	7
Figure 2: Structures des métabolites secondaires isolés des espèces de <i>Satureja</i>	10
Figure 3: Photo de l'espèce <i>Satureja calamintha nepeta</i>	11
Figure 4 : La partie aérienne sèche de l'espèce <i>Satureja calamintha</i>	18
Figure 5 : Protocole de préparation de l'extrait hexanique, d'acétate d'éthyle et méthanolique.....	19
Figure 6 : Protocole de préparation des extraits bruts chloroformique et méthanolique.....	20
Figure 7 : Rendement des extraits de <i>Satureja calamintha</i>	21
Figure 8 : chromatogramme sur CCM des extraits (EH, EA, EMb).	23
Figure 9: montage d'extraction de l'huile essentielle par cleverger.....	27
Figure 10 : Profil chromatographique d'huile essentielle par CPG/SM.....	30
Figure 11 : Résultat de la GC-MS de l'huile essentielle de <i>Satureja calamintha</i>	32
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux...	34
Figure 13 : Teneurs en polyphénols des extraits de <i>Satureja calamintha</i>	35
Figure 14: Réduction du radical libre DPPH.....	36
Figure 15 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH de l'extrait méthanolique (EM), d'acétate d'éthyle (EA) et du standard (VitC).....	39
Figure 16 : L'IC ₅₀ et l'ARP des extraits EA, EMb et de Vit C.....	40
Figure 17 : Illustration de la méthode des antibiogrammes.....	42
Figure 18 : les diamètres des zones d'inhibition d'HE et des extraits relatives aux différentes souches microbiennes.....	46
Figure 19 : les diamètres des zones d'inhibition d'HE, extraits, ATB1, ATB2, ATF1, ATF2, relatives aux différentes souches microbiennes.....	46

Liste des abréviations

Abs c : Absorbance du contrôle.

Abs e : Absorbance de l'échantillon testé.

AcOET : acétate d'éthyle.

ARP : Puissance anti radicalaire

ATB : antibiotique.

ATCC: American Type Culture Collection.

ATF: antifongique.

CHCl₃: chloroforme.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

DPPH: 2, 2-diphényl-2-picryl-hydrazyle.

EA : Extrait d'acétate d'éthyle.

EC : Extrait chloroformique.

EM : Extrait méthanolique.

EMb : Extrait méthanolique brut.

EH : Extrait hexanique.

HE : Huile essentielle.

IC₅₀ : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

MeOH : méthanol.

MH : Mueller-Hinton.

mg : milligramme.

mm : millimètre.

µg : microgramme.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

R_f : Rapport frontal.

SAB : Sabouraud.

UV : Ultra-Violet.

ملخص

يندرج هذا البحث ضمن دراسة نبتة النابطة التي تنتمي الى العائلة الشفوية التي تركز على استخراج الزيت العطرية عن طريق التقطير بالبخار الذي اعطى مردود 1.16 %. كما تم القيام بدراسة فيتوكيميائية لتحديد مختلف المركبات الكيميائية الموجودة في الجزء الهوائي من هذا النبات و تحضير العديد من المستخلصات الجافة من هذا النبات.

تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي في المستخلصات باستعمال طريقة كاشف folin-ciocalteu كانت النتائج كما يلي: 0.230 mg EAC/g و 5.22 في مستخلصات كل من خلاص الايثيل و الميثانول على الترتيب.

الزيت العطرية التي تم الحصول عليها عن طريق GC/MS مكن التحليل الكيميائي بواسطة التقطير بالبخار من التعرف على 38 مركب, حيث المكونات الرئيسية هي:

Pulegone (35.66%), Piperitone oxide (21.60%), Isomenthone (10.43%), D-Limonène (6.25%).

أثبتت دراسة النشاط المضاد للأكسدة المستعملة على كل من مستخلص الميثانول و خلاص الايثيل من خلال طريقة تثبيط الجذر الحر DPPH أن كلا المستخلصين اظهرا نشاطا مضادا للأكسدة.

تقييم النشاط المضاد للبكتيريا ضد الكائنات الحية الدقيقة تم بطريقة انتشار القرص، و اظهرت النتائج ان للزيوت العطرية تأثير قوي جدا لمنع جميع السلالات المختبرة من التكاثر وخاصة على سلالات *Escherichia coli* و *Bacillus cereus* ، في حين أن المستخلصات تظهر تثبيط معتدل.

اظهرت نتائج الفطريات من أن أسيتات الإيثيل و الزيت العطري لهما نشاط مثبط قوي جدا على سلالات *Aspergillus Brasiliensis* و *Candida albicans* ، على عكس المستخلصات الاخرى التي لم يتم تثبيطها إلا قليلا.

الكلمات المفتاحية: *satureja calamintha*, الزيت العطرية, النشاطية ضد الأكسدة , النشاطية ضد الميكروبات , النشاطية ضد الفطريات.

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'activité anti-oxydante et antimicrobienne de l'espèce *Satureja calamintha* qui appartient à la famille des Lamiaceae.

Le screening phytochimique visant à caractériser les différentes familles des composés chimiques contenus dans la partie aérienne, montre la richesse de cette plante en métabolites secondaire.

L'extraction d'huile essentielle par hydrodistillation a permis d'obtenir un rendement de 1.16%.

L'analyse chimique effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS) de l'huile essentielle a permis d'identifier 38 composants dont les constituants majeurs sont : 1-Limonène (6.25%), Isomenthone (10.43%), Pulegone (35.66%), Cis-Piperitone oxide (9.96%), Piperitone oxide (21.60%).

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu, elle est de 0.230 et 5.22 mg EAC/g dans les extraits d'acétate d'éthyle et méthanol respectivement.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante par la méthode du piégeage de radicale libre DPPH des extraits d'acétate d'éthyle et méthanolique a montré que ces deux extraits possèdent un pouvoir antioxydant important.

L'étude *in vitro* du pouvoir inhibiteur de l'huile et des extraits par la méthode de diffusion de disque révèle que l'huile essentielle a exercé une importante activité inhibitrice notamment sur les souches *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*, alors que les extraits présentent une inhibition légère vis-à-vis les souches testées.

Les résultats antifongiques montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'HE possède une activité inhibitrice très forte sur les souches *Aspergillus Brasiliensis* et *Candida albicans*, par contre aux autres extraits qui ont inhibé légèrement.

Mots clés : *Satureja calamintha*, l'huile essentielle, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract

This work aimed to investigate phytochemical and biological activity of aerial parts of *Satureja calamintha* which belongs to the family Lamiaceae.

The phytochemical screening shows that the aerial parts of this plant are rich in secondary metabolites.

Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu method, it was: 0.230 mg EAG/g and 5.22 mg EAG/g for the ethyl acetate and methanol extracts respectively.

The steam distillation of dry aerial parts of *Satureja calamintha* yielded 1.16% of a yellow good smell essential oil.

Gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS) analysis of the essential oils obtained by steam distillation identified about 38 constituents. GC-MS analysis revealed that the major constituents were Pulegone (35.66%), Piperitone oxide (21.60%), Isomenthone (10.43%), D-Limonène (6.25%).

The antioxidant activity of two extracts (ethyl acetate and methanol) was evaluated using the DPPH method; Results indicate that these two extracts efficace.

The evaluation of the antibacterial activity of the oil and of the extracts was assessed by the disk diffusion method reveals that the essential oil has exerted a significant inhibitory activity, in particular on the *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* strains, while the extracts present a mild inhibition of the tested strains.

The antifungal results show that the ethyl acetate and HE possess very strong inhibitory activity on the strains *Aspergillus Brasiliensis* and *Candida albicans*, On the other hand to the other extracts which have inhibited slightly.

Key words: *Satureja calamintha*, essential oil, antioxidant activity, antimicrobial activity, antifungal activity.

Introduction générale

Depuis la nuit des temps, l'homme apprécie les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Elles font partie de l'héritage traditionnel et médical de tous les peuples. Environ 80% de la population mondiale profite des apports de la médecine traditionnelle à base des plantes reconnaissant ainsi les savoirs empiriques de nos ancêtres [1].

Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives.

L'Algérie recèle d'un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes : on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines : industrie alimentaire, conserverie, pharmaceutique, et phytothérapie [2].

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE) connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire. La composition chimique des HE est assez complexe, les composés terpéniques et aromatiques représentant les principaux constituants. La nature de la fonction chimique du composé majoritaire (phénol, alcool, aldéhyde, cétone...) joue un rôle prépondérant dans l'efficacité de leurs activités biologiques.

Au cours de ces dernières années, la recherche de nouvelles molécules bioactives d'origine naturelle a connu un regain d'intérêt dans la plupart des recherches scientifiques.

Le présent travail rentre dans le cadre de la recherche de nouvelles substances naturelles extraites du règne végétal, vise à évaluer les activités biologiques, anti-oxydantes et antimicrobiennes.

C'est dans cette optique que notre étude a été scindée en trois chapitres:

Le premier chapitre, est une synthèse bibliographique sur la famille des Lamiacées, la description botanique et la systématique, ainsi que l'étude antérieure sur le genre et l'espèce.

- Le deuxième chapitre est l'étude de la composition chimique de l'espèce *Satureja calamintha*, en présentant le screening phytochimique ainsi que l'extraction de métabolites secondaires et de l'huile essentielle.

-Le troisième chapitre est consacré à l'étude de l'activité biologique (antioxydant et antimicrobienne) de l'espèce étudiée.

On finalise ce travail par une conclusion générale.

Chapitre I
Recherche
bibliographique

I. Présentation de la famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées (Lamiaceae) ou Labiées (Labiatae) est une importante famille de plantes dicotylédones, qui comprend environ 4000 espèces et près de 210 genres [3].

C'est une famille très importante dans la flore d'Algérie, ces espèces sont souvent des plantes herbacées, ou sous-arbrisseaux à poils glanduleux, en général aromatiques. Leur tige est carrée, certaines espèces sont dressées, d'autres couchées portent des feuilles opposées ou verticillées. Les fleurs bisexuées, irrégulières, groupées à l'aisselle des feuilles en inflorescences plus ou moins allongées ou en inflorescences terminales plus ou moins denses, à calice tubuleux ou en cloche persistant, à corolle à tube très développé, ordinairement caduque et à 2 lèvres (rarement 1). Le fruit sec se séparant en quatre articles contenant chacun une graine [4].

La famille des Lamiacées contient une très large gamme de composés comme les terpénoïdes, les iridoïdes, les composés phénoliques, et les flavonoïdes. Les huiles essentielles et plus précisément les courtes chaînes des terpénoïdes sont responsables de l'odeur et la saveur caractéristique des plantes [3].

Dans la pharmacopée traditionnelle africaine, les plantes de la famille Lamiaceae sont utilisées comme diurétique, antisyphilitique, anti-diarrhéique, cicatrisante, antiseptique et dans le traitement de nombreuses affections telles que les problèmes intestinaux ou encore le météorisme (ballonnement du ventre, dû à des gaz), De nombreuses espèces de cette famille ont confirmé leur intérêt pharmacologique dans la littérature et qui peuvent être citées à titre indicatif dans le tableau 1.

Tableau 1 : Intérêt pharmacologique de quelque espèce de la famille des Lamiacées [3]

Nom scientifique	Activité pharmacologique
<i>Thymus vulgaris</i>	Anti-inflammatoire, fongicide, provoque l'agrégation de plaquettes, antispasmodique.
<i>Satureja khuzistanica</i> Jamzad	Anti hyper lipidémique, antidiabétique, antioxydant.
<i>Melissa officinalis</i> L.	Relaxant, activités antimicrobiennes, agglutination du récepteur, antioxydant, anti-inflammatoire, antiviral (Anti-HIV), cytotoxique, analgésique.

<i>Nepeta cataria L.</i>	Activités antimicrobiennes et répulsives.
<i>Ocimum basilicum L.</i>	Activités antimicrobiennes, antioxydant et anti-inflammatoire.
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Insecticide, antinociceptive, antioxydante, diurétique.
<i>Lavetula stoechas</i>	Anticonvulsante, antispasmodique, calmante.

II. Aperçu bibliographique sur le genre *Satureja*

1. Présentation botanique du genre *Satureja*

Le genre *Satureja* comporte 200 espèces d'herbes et d'arbustes, souvent aromatiques. Tous sont remarquables par leur odeur forte, qui rappelle celle de la menthe [5]. En effet, le terme *Satureja* vient du mot latin 'satura' c'est-à-dire pot à fleur (ornemental).

Cette herbacée est annuelle sous des climats tempérés mais vivaces dans les régions arides, ensoleillées, pierreuses et rocheuses. Beaucoup de ce genre sont bien connus pour leur caractère aromatique et médicinal.

Ce genre est caractérisé par des parties aériennes ayant un goût distinctifs et peuvent être ajoutées à plusieurs préparations culinaires ou utilisées en médecine traditionnelle, pour traiter diverses affections [6].

Ce genre est largement distribué dans la région de la Méditerranée, l'Asie et l'Amérique boréale [7].

2. Place dans la systématique botanique

La classification qu'occupe *Satureja* dans la systématique est la suivante :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes.

Sous-embranchement : Angiospermes.

Classe : Eudicots.

Sous-classe : Astéridées.

Ordre : Lamiales.

Famille : Lamiacées.

Genre : *Satureja (L.)* [4, 8].

3. Propriétés thérapeutiques

Satureja est une plante considérablement utilisée en phytothérapie. En effet, une infusion des extrémités fleuries de cette plante est indiquée en cas de douleurs gastriques d'origine nerveuse, de diarrhée, de crampes abdominales, de parasites intestinaux [9].

En plus de leur utilisation traditionnelle, ce genre possède aussi des propriétés stimulantes, diurétiques, stomachique, tonique [10], antispasmodiques et carminatives [11, 12].

4. Travaux antérieurs sur le genre *Satureja*

De nombreux travaux ont été réalisés sur le genre *Satureja* qu'est caractérisé par la présence des huiles essentielles, des flavonoïdes, des tanins, des acides phénols (acide rosmarinique, acide caféiques) et des saponines [5].

4.1. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles des quelques espèces du genre *Satureja*

La détermination de composition chimique de l'huile essentielle des plantes du genre *Satureja* a fait l'objet de plusieurs travaux, dont nous résumons quelques-uns dans le tableau 2.

Il faut noter que des différences remarquables entre et dans la composition chimique de l'huile essentielle des plantes du genre *Satureja* ont été rapportés [13].

Les constituants majeurs des huiles essentielles dans la plupart des espèces sont : le thymol, le γ -tepinène, le p-cymène, le pulegone, le carvacrol, le menthone, le β -Caryophyllène, le Spathulenol...

Tableau 2 : travaux antérieurs sur la composition chimique des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Satureja*.

Espèce	Origine	Composé	Pourcentage %	Référence
<i>S. thymbra</i>	Turquie	p-cymène (1)	13.0	[14]
		γ -terpinène (2)	22.9	
		thymol (11)	12.8	
		carvacrol (12)	34.6	
		β -Caryophyllène (14)	3.69	
<i>S. thymbra</i> L	Turquie	p-cymène (1)	10.2	[15]
		β -Caryophyllène (14)	6.3	
		γ -terpinène (2)	29.0	
		carvacrol (12)	39.0	
<i>S. montana</i>	Sud-Croatie	α -terpinène (3)	4.9 - 10.6	[16]
	Italie	p-cymène (1)	3 - 11.8	[17]
		thymol (11)	9.92 - 45.2	
	Croatie	p-cymène (1)	12 - 25	[18]
		γ -terpinène (2)	8.0	
		carvacrol (12)	45 - 80	
<i>S. spicigera</i>	Iran	p-cymène (1)	22.1	[19]
		γ -terpinène (2)	13.7	
		thymol (11)	35.1	
<i>S. macrantha</i>	Iran	p-cymène (1)	25.8	[20]
		limonène (4)	16.3	
		carvacrol (12)	8.1	
	Turquie	p-cymène (1)	22.6	[15]
		carvacrol (12)	64.4	
<i>S. cuneifolia</i>	Liban	carvacrol (12)	7.7	[21]
		p-cymène (1)	6.4	
		limonène (4)	8.5	
		α -pinène (5)	10.5	
		β -Cubebène (13)	5.8	
		β -Caryophyllène (14)	6.0	

<i>S. cuneifoli</i> Ten.	Turquie	p-cymène (1)	38.1	[15]
		carvacrol (12)	48.7	
<i>S. hortensis</i>	Turquie	p-cymène (1)	8.97	[22]
		γ -terpinène (2)	18.56	
		carvacrol (12)	13.98	
		thymol (11)	40.54	
<i>S. hortensis</i> L.	Turquie	p-cymène (1)	43.4	[15]
		γ -terpinène (2)	3.2	
		carvacrol (12)	6.0	
		thymol (11)	35.9	
<i>S. Khuzestaniaea</i>	Iran	p-cymène (1)	3.11	[23]
		carvacrol (12)	90.88	
<i>S. aintabensis</i>	Turquie	p-cymène (1)	59.0	[15]
		γ -terpinène (2)	8.4	
		thymol (11)	17.5	
<i>S. brevicalyx</i>	Pérou	pulegone (10)	10.4	[24]
		menthone (8)	12.3	
<i>S. boliviana</i>	Pérou	carvacrol (12)	3.4	
		pulegone (10)	9.7	
		menthone (8)	10.7	
<i>S. forbesii</i> (Benth.) Briq	Cap-Vert	geranial (6)	42.0	
		néral (7)	31.2	
<i>S. punctata</i> (Benth.) Briq	Zimbabwe	geranial (6)	52.5	[26]
		néral (7)	33.4	
<i>S. biflora</i>	Tanzanie	Spathulenol (15)	11.9	[26]
		Bisabolol (16)	8.77	
<i>S. masukensis</i>	Tanzanie	Spathulenol (15)	22.36	[27]
		β -Bourbonene (9)	5.53	
<i>S. pseudosimensis</i>	Tanzanie	Spathulenol (15)	13.3	[27]

Des études biologiques ont montré que les huiles essentielles de *Satureja calamintha*, *Satureja hortensis*, *Satureja thymbra* possèdent une activité antimicrobienne due principalement à la présence du thymol, du carvacrol et de l'alpha-terpinéol [28].

D'autre part, Michaelakis et al. [29] ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja spinosa* L., *Satureja parnassica* subsp. *parnassica* Boiss., *Satureja thymbra* et *Satureja montana* récoltés en Grèce, ainsi que leurs activité insecticide vis-à-vis de *Culex pipiens*.

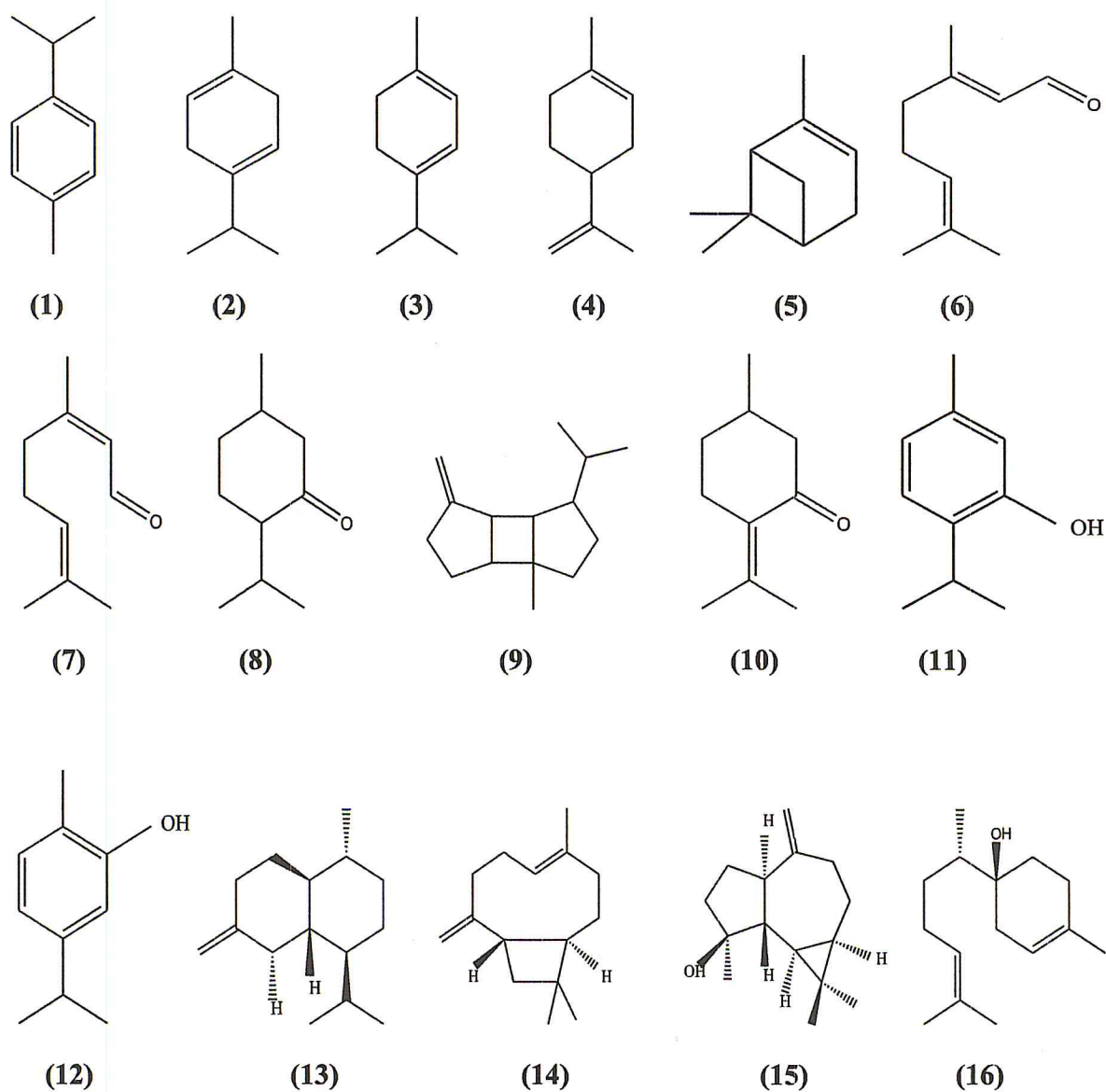


Figure 1: Structures des composés présents dans l'HE de quelques espèces du genre *Satureja*.

4.2. Travaux antérieure sur les métabolites secondaires de quelques espèces du genre *Satureja*

Un grand nombre d'espèces de *Satureja* ont fait, à ce jour, l'objet d'études chimiques et de très nombreux métabolites secondaires ont été isolés, les travaux phytochimiques effectués sur le genre *Satureja* ont permis l'isolement de flavonoïdes et de terpènes.

Gohari et al., [30] ont isolé quatre flavonoïdes à partir de la partie aérienne de l'espèce *Satureja Atropatana Bonge*: le 5,6',3'-trihydroxy-7,8,4'-triméthoxyflavone (17); le lutéoline (18); le 5,6-dihydroxy-7,8,3',4' tetraméthoxyflavone (19) ou le 5- desméthoxynobiletine; le 5,6,4'-trihydroxy-7,8,3'-triméthoxyflavone (20) ou thymonine.

Fransisco et al., [31] ont isolé des flavones lipophiles, 5,6,4'-trihydroxy-7,8,3'-triméthoxyflavone (thymonine) (19), et le 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone (21) de tissus superficiels des feuilles de 24 genres appartenant à la famille des Lamiaceae y compris le genre *Satureja*.

En outre, Hernandez et al. [32] rapportent que l'extrait des flavonoïdes de *Satureja parvifolia* poussant à l'état spontané en Argentine, a présenté une activité inhibitrice sur la croissance des microorganismes à Gram positif et à Gram négatif.

Ćetković et al., [33] ont montré que l'extrait éther de pétrole de l'espèce *Satureja montana* L. subsp. *Kitaibelii* présente une bonne activité antimicrobienne et aucune activité antioxydante.

Mchedlishvili et al., [34] ont montré que les flavonoïdes isolés à partir de l'espèce *Satureja hortensis* ont des propriétés hypolipidémiques.

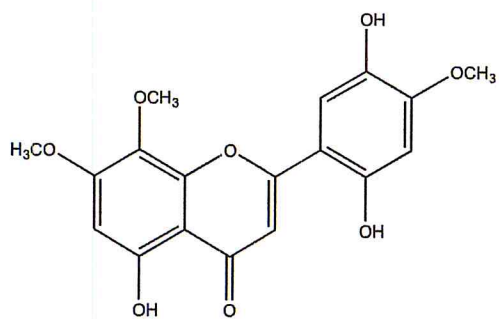
Une étude réalisée sur les feuilles sèche de l'espèce *Satureja gilliesii* a permis d'isoler à partir de l'extrait dichlorométhane CH₂Cl₂, et d'identifier par les méthodes d'analyse spectrales RMN ¹H, ¹³C et SM, deux monoterpènes oxygénés: l'acetylsaturejol (22) et l'isoacetylsaturejol (23), ainsi que deux sesquiterpènes alcools: le (+)-t-cadinol (24) et le (-)-cadin-4-en-1-ol (25) [35].

D'autre part, l'étude menée par Manriquez et al. [36], sur la partie aérienne fraîche sur même espèce *Satureja gilliesii* a conduit à l'isolement d'un diterpène oxygéné de formule

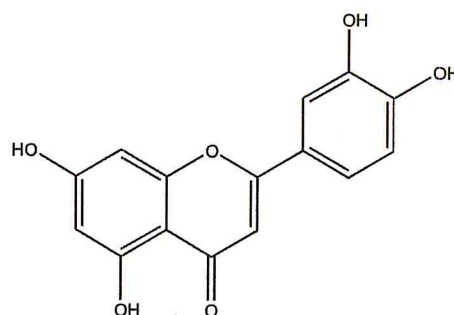
brute $C_{20}H_{34}O_3$. Ce composé a été identifié comme : le 8 α , 13 R-epoxylabd-14-ene-1 α , 5 α – diol (26).

Une étude réalisée sur l'extrait méthanolique de *Satureja parvifolia* a révélé la présence de deux acides triterpéniques : l'acide ursolique (27) et l'acide oléanolique (28), qui ont été isolés pour la première fois de cette espèce. L'activité anti-spasmodique de ces composés a également été démontrée [37].

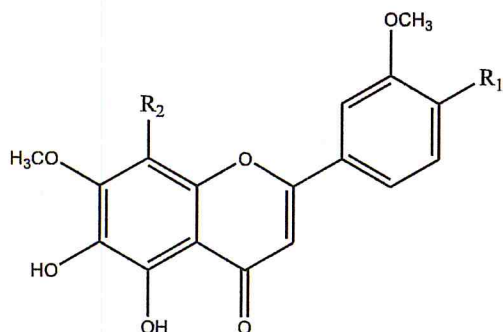
Une autre étude a été effectuée sur l'extrait de dichlorométhane (CH_2Cl_2) des parties aérienne de l'espèce *Satureja khuzistanica* cultivée en Iran, a permis d'isoler et identifier un triterpène (l'acide ursolique) (27) et deux stérols (le β -sitosterol (29) et β -3-O- β -D-glucosyl-sitosterol (30)) [38].



(17)



(18)



	R ₁	R ₂
(19)	OCH ₃	OCH ₃
(20)	OH	OCH ₃
(21)	OH	H

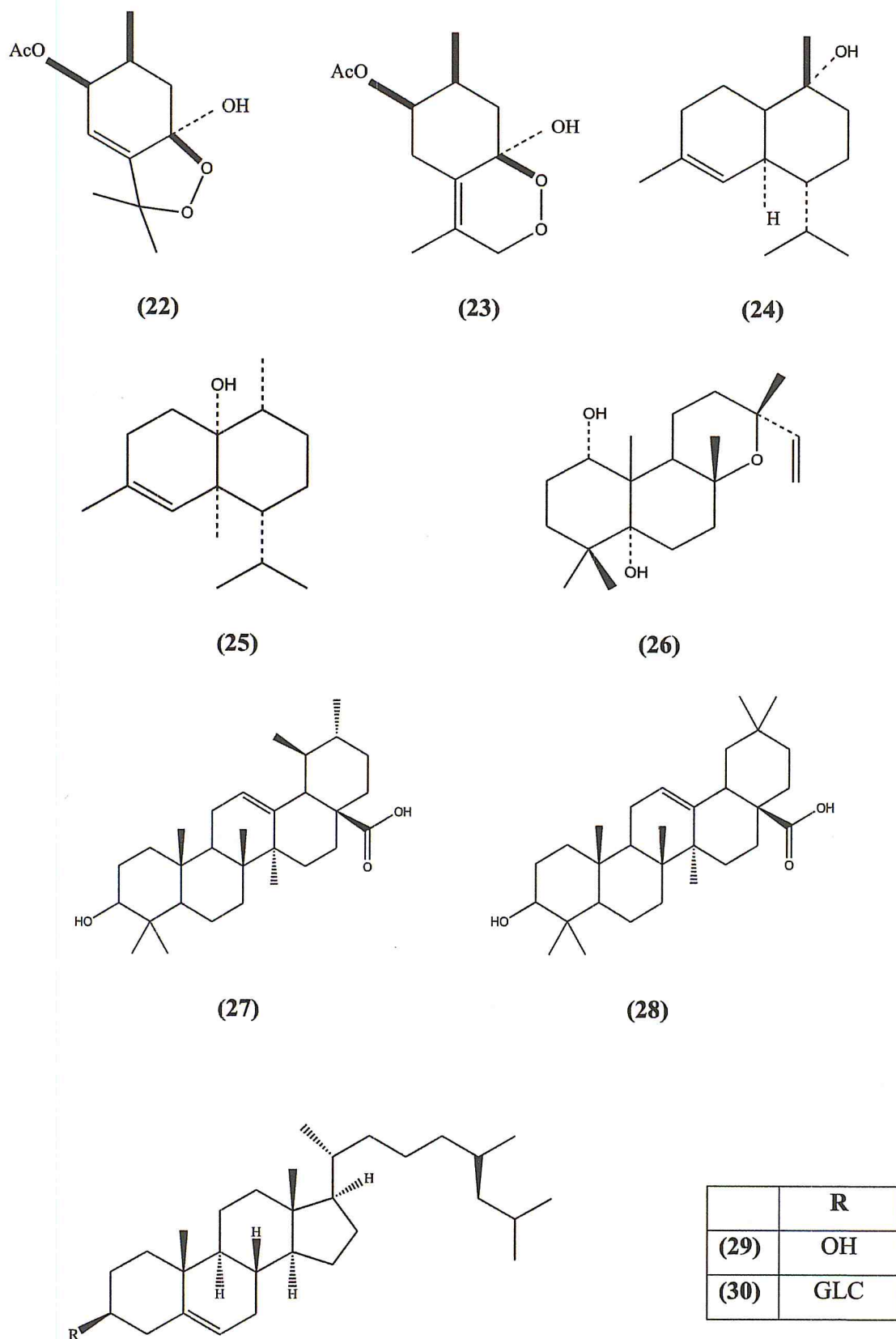


Figure 2: Structures des métabolites secondaires isolés des espèces de *Satureja*.

III. Recherche bibliographique sur l'espèce *Satureja calamintha*

1. Présentation de l'espèce *Satureja calamintha*

1.1. Classification systématique

La classification qu'occupe l'espèce *Satureja calamintha* dans la systématique est la suivante :

Domaine : Eucaryote.

Règne : plante.

Classe : Magnolio.

Ordre : Lamiales.

Famille : Lamiaceae.

Genre : *Satureja*.

Espèce : *Satureja calamintha nepeta* [8].



Figure 3: Photo de l'espèce *Satureja calamintha nepeta*.

Nom commun : Sarriette [39], baume sauvage, pouliot de montagne.

Nom botanique : *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq.

Synonyme : *Calamintha nepeta* [39].

Nom vernaculaire : ketéya, tourte, menta, Nabta.

Nom arabe : نابطة [40].

1.2. Description botanique

L'espèce *Satureja calamintha* regroupe 3 sous-espèces qui sont : *Satureja calamintha* Scheele subsp. *nepeta* (L.) Briq, *S. calamintha* Scheele subsp. *adscendens* (Jord.), *S. calamintha* Scheele subsp. *silvatica* Briq [8].

C'est une petite plante vivace atteint une taille de 30–40 cm de haut au parfum mentholé, et est très ramifiée depuis la base. Elle a des feuilles lancéolées et pointues à leur extrémité.

Les tiges sont plus ou moins velues et molles, elles portent des feuilles opposées, à pétiole moyen, légèrement dentées. Les fleurs, de couleur blanche à mauve, fleurissent de juillet à octobre, d'un joli rose ou pourpre, sont groupées sur un pédoncule commun par deux ou trois. Le fruit est formé de quatre akènes ovales et lisses [10].

1.3. Distribution géographique

La plante pousse à l'état sauvage en Asie, en Europe, et notamment dans le bassin méditerranéen [41].

On rencontre cette espèce dans les sous-bois mais aussi sur les terrains incultes, le bord des routes et dans le tell, surtout en montagne, jusqu'à 1500 mètres d'altitude [8].

1.4. Propriétés thérapeutiques

Satureja calamintha est une excellente plante médicinale utilisée par la population locale sous forme de décoction pour traiter les infections respiratoires bénignes et l'indigestion. Cette espèce constitue un bon remède contre la toux et le rhume, souvent mélangée à d'autres plantes, comme le thym (*Thymus vulgaris*), elle favorise la sudation et fait baisser la fièvre.

Elle est ainsi préconisée pour traiter les infections intestinales, asthénie, manque de concentration, parasites, diarrhée, arthrite, fatigue psychique, douleurs, rhumatismes, maladies infectieuses, cystite, et stress [42].

Satureja calamintha est une plante aromatique, utilisée comme stimulante, antiseptique, tonique [43, 44], antispasmodique, stomachique, carminatif, fébrifuge, sudorifique et expectorante [10].

2. Etude antérieure sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce

Satureja calamintha

La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* a fait l'objet de plusieurs travaux dont lesquels, les auteurs avancent l'existence de différents types chimiques au sein de cette espèce.

Une étude de la composition chimique de l'huile de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* effectuée sur plusieurs échantillons provenant de la Belgique, montre que l'huile essentielle de cette plante est riche en oxyde de pipériténone (37,8%), suivi de pulégone (33,2%) et d'oxyde de pipéritone(17,0) es résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous [45].

Tableau 3 : La composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* récolté en Belgique.

Composés	Pourcentage %	Composés	Pourcentage %
a-pinène	0,2-0,6	trans-hydrate de sabinène	0,1-2,4
3-pinène	0,2-0,8	cis- hydrate de sabinène	t - 0,1
Sabinène	0,1-0,5	Menthone	6,3-8,9
Myrcène	0,3-1,1	Isomenthone	t - 6,7
Limonène	0,7-4,6	Menthol	1,4-7,5
Gis- F3-ocimène	0,1-0,9	Pipériténone	0,4-3,8
trans- 13-ocimène	t - 0,5	f3-caryophyllène	1,4-6,2
3-octanol	0,1-0,3	GermacrèneD	0,4-1,6
a-terpinène	t - 0,5	Oxyde de pipéritone	8,4-17,0
y-terpinène	0,2-0,9	Pulégone	11,5-33,2
Terpinolène	t- 0,3	Oxyde de pipériténone	5,9 - 37,8

D'autres travaux effectués sur l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* récolté à côté d'Urbino (Italie) ont montré que cette huile est caractérisée par une forte teneur en oxyde de piperitone (68.0%). La piperitenone oxide (3.6 %), le limonène (2.0 %) et le caryophyllène (1.3 %) sont également présents en faible proportion [46]. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4: La composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* récolté en Italie.

Composés	Pourcentage %	Composés	Pourcentage %
a-pinène	0.2	Linalol	0.4
Sabinène	0.2	Néo-menthol	0.4
J3-pinène	0.3	oxyde de Piperitone	68.0
3-octanol	2.0	4-hydrixyperitone	0.6
Myrcène	0.3	Thymol	1.2
p-cymène	0.2	Oxyde de Caryophyllène	0.2
1,8-cinéole	0.2	Piperitenone oxide	3.6
Limonène	2.0	Eugénol	0.1
y-terpinène	0.2	caryophyllène	1.3
<i>Trans-hydrate</i> de sabinène	0.2	Carvone	0.2
3-nonanol	0.2	Piperitenone	0.1

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce d'origine Serbe [47], a montré que les composés contenant majoritaires sont : la pulégone (75,5%), de l'oxyde de piperitone (6,0%), de la menthone (5,3%) et du menthol (4,3%).

Enfin, l'huile essentielle d'une population de *Calamintha nepeta* originaire du Maroc réalisées par *Satrani et al.*, [48], contenait le p-cymene (20.9%), γ -terpinene (18.7%), et le thymol (34.94%) comme produits majoritaires.

L'analyse chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Satureja calamintha* récolté en Algérie dans trois régions (Annaba, Jijel et Blida) a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse. Les principaux composants et leurs pourcentages sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau 5: La composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* récolté en Algérie (Annaba [49], Jijel [49] et Blida [50]).

N°	Composés	Pourcentage (%)		
		Annaba	Jijel	Blida
1	α -Thujene	0.52	0.09	–
2	1R- α -Pinene	0.66	0.7	0.2
3	1,2-diisopropenylcyclobutane	4.68	–	–
4	L- β -Pinene	0.58	1.33	0.1
5	3-Octanol	2.32	0.96	0.1
6	α -Terpinene	–	0.27	–
7	(+)-4-Carene	–	0.31	–
8	o-Cymene	0.17	–	–
9	D-Limonene	–	1.94	0.1
10	B-Phellandrene	0.23	0.26	–
11	β -cis-Ocimene	–	0.76	–
12	γ -Terpinene	0.13	0.23	–
13	Cis-Sabinene hydrate	–	0.14	t
14	Cyclohexanone,2 (1methylethylidene)	20.32	9.37	–
15	Menthone	5.97	26.46	0.2
16	3-Octanol-acetate	–	0.35	–
17	Rose oxide	0.89	–	–
18	Pulegone	1.72	14.04	39.5
19	Piperitone oxide	54.71	22.26	1.5
20	Cis-Carveol	–	0.16	–
21	Thymol	1.92	0.26	–
22	Diosphenol	0.32	0.43	–
23	Piperitenone	–	0.2	–
24	Jasmatone	0.33	0.25	–
25	β-Cubebene	1.47	5.51	–
26	β -Elemen	–	0.27	–
27	α -Gurjenene	0.61	–	–
28	γ -Muurolene	–	0.16	–
29	Z- β -Farnesene	–	0.48	–

30	α -Caryophellene	–	0.73	–
31	Elixene	–	1.93	–
32	Allo-aromadendrene	–	0.6	–
33	Caryophyllene	0.49	4.33	–
34	α -Muurolene	–	0.93	–
35	γ -cadinene	–	0.77	–
36	(-)- α -Panasinsen	–	0.23	–
37	α -Cadinene	–	1.84	–
38	Palustrol	0.79	–	–
39	3-Oxo- α -ionone	–	0.25	–
40	Phytol	–	0.56	–
41	Isomenthone	–	–	19.6
42	neo-Menthol	–	–	33.0
43	Eucalyptol	–	–	2.8
44	Palustrol	–	–	0.1
45	Spathulenol	–	–	0.1
46	Caryophyllene oxide	–	–	0.1
47	Isopiperitenone	–	–	t
48	Carvacrol	–	–	0.2
49	Neoisomenthol	–	–	0.1

L'huile essentielle provenant d'Annaba est caractérisée par la présence de: piperitone oxide (54.71%), cyclohexanone,2-(1 methylethylidene)- (20.32%), et menthone (5.97%) comme produits majoritaire, d'autres composés sont également présents dans cette essence, mais à des teneurs relativement faibles : 1,2-diisopropenylcyclobutane (4.68%), 3-octanol (2.32%), thymol (1.92%) et la pulegone (1.72%).

Par ailleurs, les composés majoritaires de l'huile essentielle de l'espèce récoltée dans la région de Jijel sont : la menthone (26.46%), la piperitone oxide (22.26%), la pulegone (14.04%) et la cyclohexanone,2-(1 methylethylidene) (9.37%). d'autres constituants sont également présents avec des pourcentages moins importants à savoir : le β -Cubebene (5.51%), le Caryophyllene (4.33%) et l'Elixene (1.93%).

Enfin, l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce récoltée à Blida a révélé la présence des composés ayant un pourcentage moins important : la Pulegone (39.5%), le neo-Menthol (33.0%), l'Isomenthone (19.6%), l'Eucalyptol (2.8%), la Piperitone oxide (1.5%)

Cette recherche bibliographique nous a permis de montrer la richesse, en termes de diversité structurale, des molécules organiques entrant dans la composition des huiles essentielles et ceux qui ont été isolés du genre *Satureja*, en particulier les flavonoïdes et les terpenoïdes.

D'autre part, les travaux réalisés sur la composition de l'huile essentielles de l'espèce *Satureja calamintha* nous a permis de constater que l'HE de cette espèce est riche en monoterpènes oxygénés suivis des monoterpènes hydrocarbonés puis les sesquiterpènes.

Chapitre II
Etude de la
composition chimique
de l'espèce *Satureja*
calamintha

I. Extraction de métabolites secondaires de l'espèce *Satureja calamintha*

1. Matériel végétal

La plante *Satureja calamintha* a été collectée au mois d'août 2016 dans la région de Constantine.

La plante (feuilles, fleurs), fraîchement récoltée, est laissée sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant quinze jours, puis conservée dans des flacons jusqu'à l'utilisation ultérieure pour les différentes extractions des principes actifs.



Figure 4 : La partie aérienne sèche de l'espèce *Satureja calamintha*.

2. Protocole d'extraction

Pour la préparation des extraits, à partir de la partie aérienne de *Satureja calamintha*, nous avons adoptée deux protocoles :

a- 1^{er} protocole

La matière végétale sèche (40 g) est mise en contact avec l'hexane (780 ml) pendant 6 jours, le solvant est filtré, puis concentré grâce à un évaporateur rotatif à une température de 30°C, on a obtenu l'extrait hexanique (EH). La plante a subi une 2^{ème} macération dans l'acétate d'éthyle (425 ml) pendant 5 jours. Après filtration, le solvant est évaporé à sec, 1.06g de l'extrait acétate d'éthyle ont été obtenus. Le résidu (la plante) a été mise à macérer une autre fois dans le méthanol (340 ml) durant 5 jours, puis le solvant est filtré et évaporé à sec sous pression réduite à 40°C pour donner l'extrait méthanolique.

Le protocole d'extraction est présenté dans la figure 5.

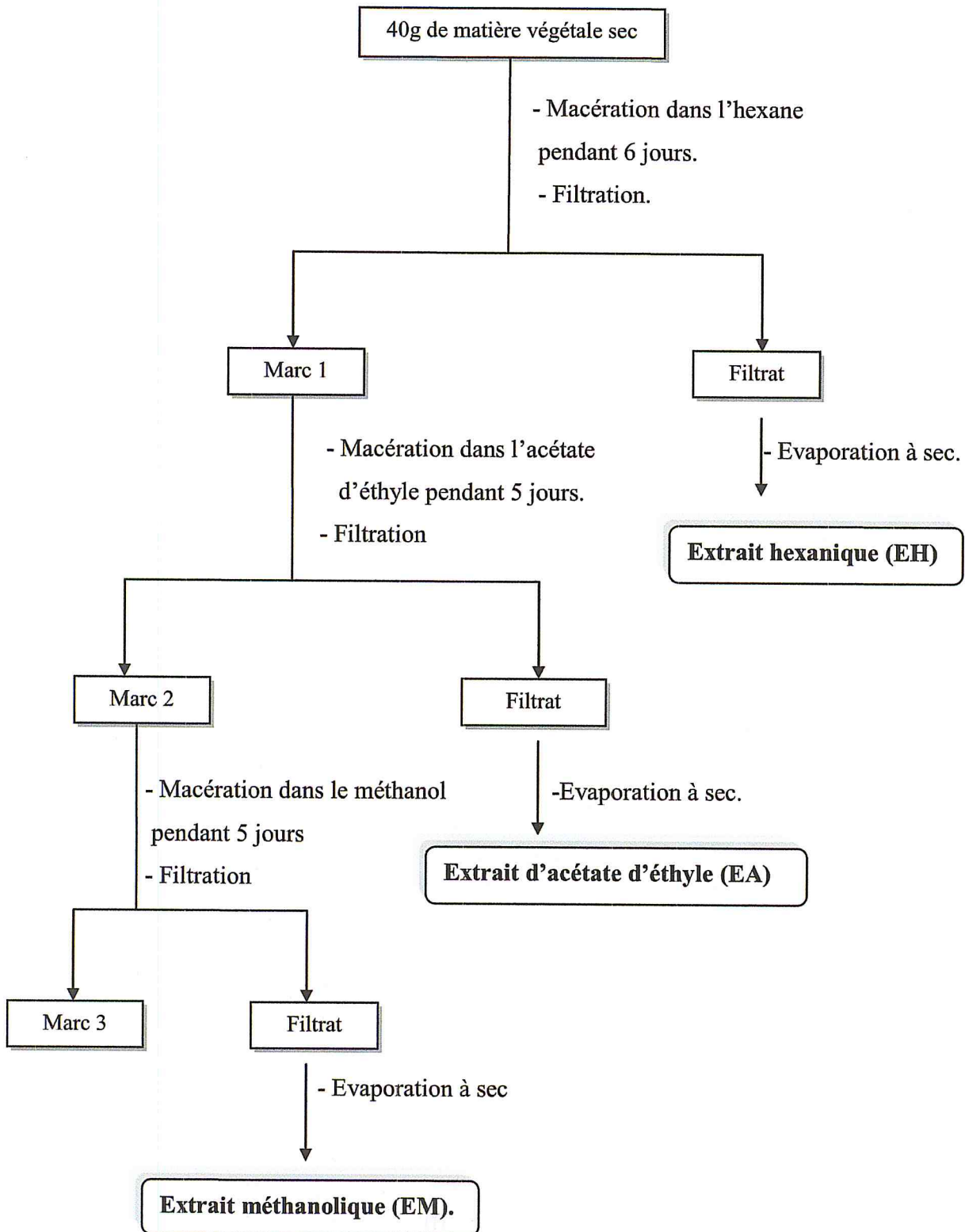


Figure 5 : Protocole adopté pour la préparation de l'extrait hexanique (EH), d'acétate d'éthyle (EA) et méthanolique (EM).

b- 2^{ème} protocole

D'une part l'extrait méthanolique (9 g) de la partie aérienne de la plante a été préparé par une macération, le matériel végétal sec a été macéré dans le méthanol absolu (320 ml) pendant 5 jours. Après filtration et évaporation à sec du solvant, nous avons obtenu 2.79 g de l'extrait méthanolique brut (EMb).

L'extrait chloroformique a été préparé à partir de la macération de 68.3 g de la partie aérienne de la plante dans de chlorforme à la température ambiante pendant 5 jours, ensuite le mélange est filtré sur papier filtre et évaporé à sec.

Ce protocole est schématisé dans la figure ci-dessous.

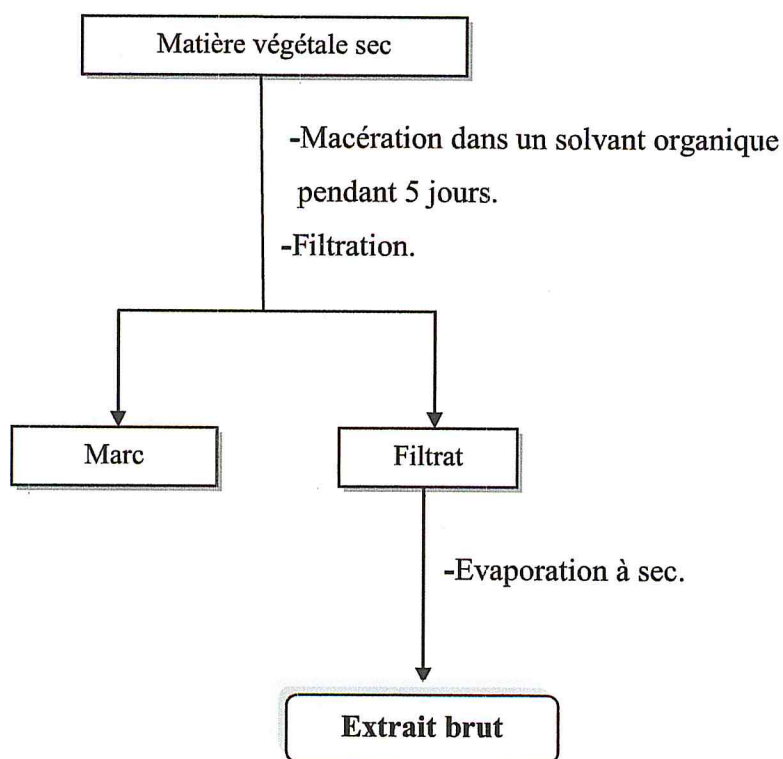


Figure 6 : Protocole adopté pour la préparation des extraits chloroformique (EC) et méthanolique brut (EMb).

3. Calcul du rendement :

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

Le pourcentage en extraits de la plante est calculé par la formule suivante :

$$R\% = (P/P_0) \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

P : Poids en gramme de l'extrait sec résultant.

P₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

Les cinq extraits : L'extrait chloroforme (EC), l'extrait méthanolique brut (EMb), l'extrait hexanique (EH), l'extrait acétate d'éthyle (EA) et l'extrait méthanolique (EM) obtenus sont de couleur et d'aspect différents (tableau 6).

Tableau 6 : Aspect, couleur et rendement de différents extraits de *Satureja calamintha*.

Extraits	Aspect	Couleur	masse (g)	Rendement (%)
EH	Pâteux	Jaune	1.06	2.65
EA	Pâteux	verdâtre	1.87	4.68
EM	visqueux	Vert foncé	3.97	9.93
EC	Pâteux	vert	1.27	1.86
EMb	visqueux	Vert foncé	2.79	31

D'après les résultats obtenus, on remarque que le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait méthanolique brut (31% m/m) et le plus faible celui de l'extrait chloroformique (1.86% m/m). La figure suivante représente le rendement de différents extraits de notre plante.

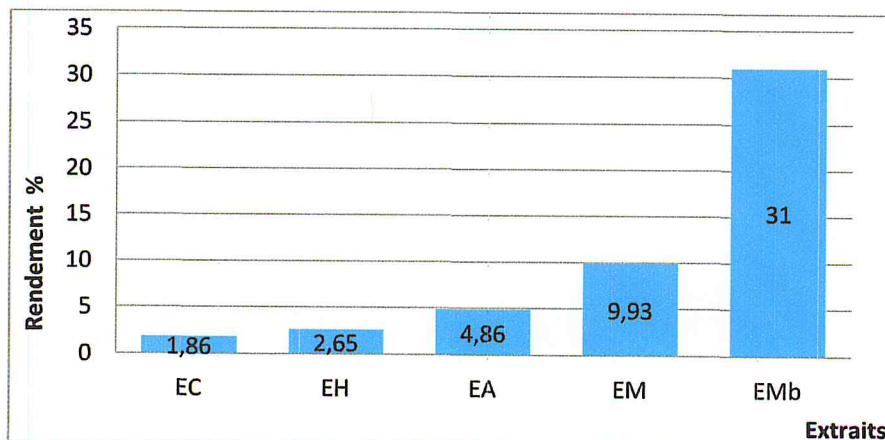


Figure 7 : Rendement des extraits de *Satureja calamintha*.

4. Analyse des extraits par CCM

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple dont le principe est basé sur le phénomène d'adsorption. Elle est utilisée dans la séparation et l'identification des molécules pures, les extraits (mélange complexes de métabolites) et les échantillons biologiques.

Pour mieux voir la richesse de nos extraits en métabolites secondaires, nous avons soumis l'extrait méthanolique, hexanique et acétate d'éthyle à une analyse par chromatographique sur couche mince.

Trois microlitres de chaque extrait sont déposés à des points précis, à 1cm du bord inférieur de la plaque de gel de silice. Après le développement du chromatogramme, et lorsque le front du solvant d'éluion a atteint la ligne supérieure, la plaque a été retirée, séchée et examinée sous la lampe UV à 365nm. La révélation a été réalisée par une solution saturée de NaOH.

Après plusieurs essais nous avons constaté que l'éluant qui donne une bonne séparation des constituants des extraits est un mélange de cyclohexane/acétate d'éthyle ; 2/1 : v/v.

Les résultats obtenus de la chromatographie sur couche mince de différents extraits sont représentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits des feuilles de *Satureja calamintha*.

	Rf	Couleur du spot	
		Avant révélation	Après révélation
EH	0.26	jaune	jaune
	0.33	vert	orange
	0.46	vert	orange
	0.57	jaune	jaune claire
	0.73	jaune	jaune claire
	0.95	jaune	jaune claire
EA	0.26	jaune	orange
	0.44	vert	orange
	0.55	vert	orange
	0.66	jaune	orange
	0.97	jaune	orange

EM	0.26	vert	orange
	0.31	vert	orange
	0.42	vert claire	orange
	0.53	jaune pâle	rose
	0.64	vert	rose claire

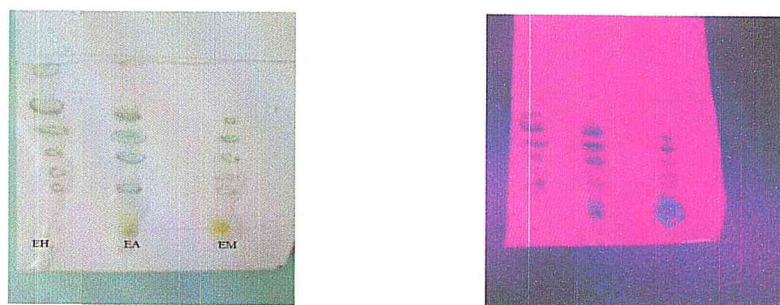


Figure 8 : Chromatogramme sur CCM des extraits (EH, EA, EMb).

Par comparaison avec la littérature [51], la présence des spots de coloration jaune et vert dans les chromatogrammes de nos extraits indique la présence des flavonols et des anthocyanidnes.

5. Screening phytochimique

L'espèce sélectionnée est soumise à un screening phytochimique dans lequel nous avons voulu caractériser un certain nombre de familles de substances naturelles.

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les composés terpéniques, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques [52].

Ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques, ils convient d'explorer ces produits naturels pour leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses [53].

Dans cette partie de ce chapitre, nous présenterons des réactions qui portent sur la recherche des principaux groupes chimiques de la plante. Elles permettent d'avoir des informations préliminaires sur la composition chimique du végétal.

1. Les terpènes et les triterpènes

1.1. Les terpènes

a- Définition

Les terpènes représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires des végétaux. Leur classification est basée sur le nombre de répétition de l'unité de base isoprènes (à 5 atomes de carbone).

Plusieurs des terpènes ont été isolés à partir des fleurs, des tiges, des racines et des différentes parties des plantes [54]. Ils sont surtout reconnus pour leurs actions stimulantes et anti-infectieuses [55].

b- Recherche des terpènes

On prend 0.5g de l'extrait de la plante et on lui ajoute 3ml de chloroforme puis on filtre. Ensuite, on ajoute au filtrat 10 gouttes d'anhydride acétique et 2 gouttes de l'acide sulfurique (H_2SO_4). Le virage de la couleur du bleu au vert indique la présence des terpènes.

1.2. Les triterpènes

a- Définition

Les triterpènes ont la formule moléculaire $C_{30}H_{48}$. Ils résultent de la condensation de six molécules d'isoprène, et dérivant du squalène, par une variété de cyclisations et d'autres modifications [56].

b- Recherche des triterpènes

Il consiste à dissoudre l'extrait dans un mélange d'anhydride acétique /chloroformique (5/5 : V/V), puis on filtre et on traite le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et vert-violette, elle indique alors la présence des composés triterpéniques.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Résultats du test phyochimique pour les terpènes et les triterpènes.

	EMb	EH	EA	EC
Terpènes	+	+	+	+
Triterpènes	+	+	+	+

Généralement, tous les extraits possèdent une teneur importante en terpènes et triterpènes. Une coloration verte-violette apparait indique leurs présence

2. Stéroïdes et des stérols

a- Définition

La majorité des stéroïdes sont des alcools, on les appelle stérols [57], Un stérol est un composé organique possédant un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle et plusieurs cycles accolés, il contient au moins 27 atomes de carbone.

Les stéroïdes ont un potentiel thérapeutique dans domaines les plus divers : antiviraux, insecticides et analgésiques [58].

b- Recherche des stéroïdes et des stérols

Un volume de l'extrait est placé dans erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10ml du chloroforme. Ensuite, on mélange 5ml de la solution chloroformique avec 5ml d'anhydride acétique en y ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, on agite et on laisse la solution se reposer. Un test positif est révèlé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant vert.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Tableau 9 : Résultats du test phytochimique pour les stéroïdes et stérols.

	EH	EC	EA	EMb
Stéroïdes et Stérols	+	traces	+	++

Il est signalé que les stérols et stéroïdes sont présentés en faible quantité dans l'extrait chloroformique alors que d'autres extraits ont une teneur importante en stérols et stéroïdes notamment l'extrait méthanolique brut.

3. Les phénols

a- Définition

Les phénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside [59].

b- Recherche des phénols

L'extrait brut a été mélangé avec 2ml de la solution de FeCl_3 à 2%. Le changement de couleur noir ou bleu-vert suggère la présence des phénols.

Tableau 10 : Résultats du test phytochimique pour les phénols.

	EH	EC	EA	EMb
Phénols	+	traces	+	++

Les composés phénoliques ont montrés leur présence avec une teneur importante dans les extraits étudiés sauf l'extrait chloroformique qui présent à l'état de traces.

4. Les flavonoïdes**a- Définition**

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphenols [60]. Ce sont des polyphenols ayant une structure de base en C6-C3-C6, constituée de deux noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.

Par ailleurs, on attribue aux flavonoïdes de potentielles activités biologiques telles qu'inflammatoires, antimicrobiennes, anti-oxydantes et anti-cancérigènes [61].

b- Recherche des flavonoïdes

Une fraction de l'extrait est traité avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré, et l'observation de la formation de la couleur jaune orange indique la présence des flavonoïdes.

Tableau 11 : Résultats du test phytochimique pour les flavonoïdes.

	EH	EC	EA	EMb
flavonoïdes	-	traces	+	++

Les flavonoïdes sont détectés dans la plante avec une présence importante en extrait méthanolique par rapport aux autres, caractérisées par la coloration jaune orange.

En conclusion, le screening phytochimique réalisé sur les différents extraits de l'espèce *Satureja calamintha* révèle la présence de plusieurs familles de composés chimique.

6. Extraction de l'huile essentielle

1. Principe d'extraction

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle ainsi que pour le contrôle de qualité [62]. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène.

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. En laboratoire le système équipé d'une cohobe qui est généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la Pharmacopée Européenne est le Clevenger [63].

2. Protocole d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle (HE) de l'espèce *Satureja calamintha* a été réalisée par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger. Pour cela, 30 g de la partie aérienne sèches sont introduites dans un ballon de 2 litre rempli d'environ 1L d'eau distillée. Le tout est porté à ébullition (100°C) pendant trois heures. Les vapeurs riches en huile essentielle surmontent la colonne de Clevenger et sont condensées dans le réfrigérant, Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide. L'HE récupérée a été conservée au réfrigérateur dans un flacon en verre opaque hermétiquement fermés à une température de 4°C.

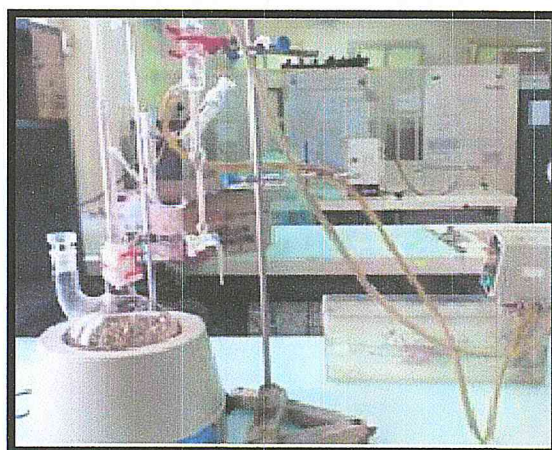


Figure 9 : montage d'extraction de l'huile essentielle par clevenger.

L'huile essentielle de *Satureja calamintha* est très aromatique, elle est caractérisée par un aspect liquide, une couleur jaune pâle et une odeur menthée agréable.

Le rendement obtenu en huile essentielle de notre plante est de l'ordre de 1.16%.

3. Analyse de l'huile essentielle par CPG/SM

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Le couplage CPG/SM est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles et réunit le meilleur de ces deux techniques. Ce couplage répond aux exigences de base de toute analyse et qui sont :

- ✓ La séparation.
- ✓ L'identification.
- ✓ La mesure quantitative.

Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation. Dans la source d'ionisation les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons (dans le cas de l'impact électronique), conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil.

Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus utilisés pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le « piège à ion ».

3.1. Conditions opératoires

Afin de connaître la composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha*, une analyse chromatographique par CPG/SM a été réalisée dans les conditions suivantes :

-Injecteur

Température : 250°C

Mode d'injection : Split 50:1

Volume injecté : 0.2 µl

-Colonne

Type : HP-5MS

Dimensions : long 30 m * D int 0.25 mm * épaisseur film 0.25 µm

Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% diméthylpolysiloxane. (Autre : Spécifier)

-Température du four : 50°C pendant 5 min, 5°C/min jusqu'à 280°C.

Isotherme pendant 20 min.

Durée d'analyse : 71 min

Gaz vecteur : Hélium pureté : N 6

Débit GV : 0.8 ml/min

-Détecteur de masse

Mode d'analyse : Scan TIC (de 30 à 550)

Délai du solvant : 3.5 min

Température de l'interface : 270 °C

Type d'ionisation : Impact électronique

Intensité du filament : 70 év

Type de l'analyseur de masse : Quadripôles

Température de la source : 230 °C

-Equipement :

Chromatographe : Hewlett Packard Agilent 6890 plus

Spectromètre de masse : Hewlett Packard Agilent 5973

3.2. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle

L'analyse chimique de l'huile essentielle a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse. Les principaux composants et leurs pourcentages ont été déterminés ainsi que le temps et les indices de rétention sont représentés dans le tableau suivant.

Le profil chromatographique est illustré dans la figure suivante :

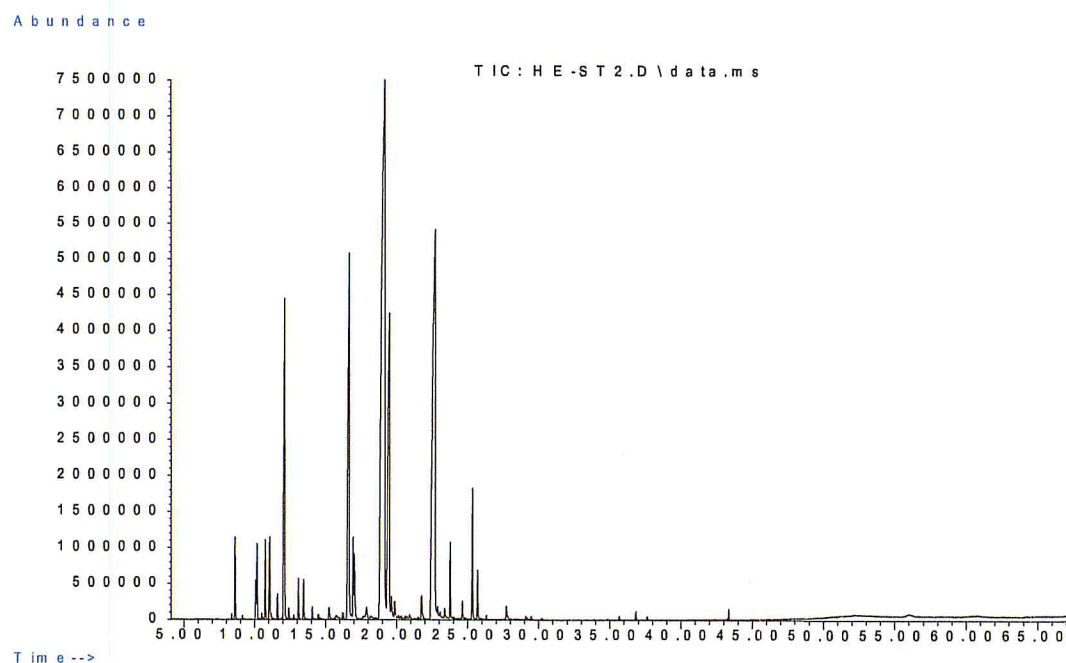


Figure 10 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* par CPG/SM.

Tableau 12 : Résultats d'analyses chromatographiques (CPG/SM) de l'huile essentielle de *Satureja Calamintha*.

N°	Nom du composé	TR	Pourcentage % de composés
1	α -Thujene	8.380	0.0689
2	α -Pinène	8.609	1.0188
3	Camphène	9.131	0.0557
4	β -Pinène	10.160	1.4171
5	1-Octen-3-ol	10.498	0.1118
6	β -Myrcène	10.764	0.9699
7	3-Octanol	11.070	1.3472
8	α -Terpinène	11.623	0.3120
9	1-Limonène	12.108	6.2522
10	Cis-Ocimene	12.419	0.1520
11	β -Ocimene	12.769	0.0586
12	γ -Terpinène	13.096	0.4806
13	Cis-Sabinène hydrate	13.458	0.5680
14	α -Terpinolène	14.071	0.1623
15	Cis- β -Terpinéol	14.491	0.1225
16	NI	15.251	0.2443

17	1-Menthone	16.222	0.1277
18	Isomenthone	16.650	10.4382
19	Isopulegone	16.942	1.1509
20	4- Terpinéol	17.028	1.1498
21	NI	17.888	0.390
22	Pulegone	19.153	35.6673
23	Cis-Piperitone oxide	19.474	9.9618
24	NI	19.631	0.4508
25	NI	19.861	0.2718
26	Piperitenone	21.748	0.5236
27	Piperitone oxide	22.694	21.6051
28	β - Bourbonene	22.875	0.2815
29	NI	23.0506	0.2222
30	NI	23.378	0.2307
31	Trans- β -Caryophyllène	23.768	0.9577
32	α - Humulène	24.627	0.2442
33	D-Germacrene	25.328	1.7398
34	Bicyclogermacrene	25.694	0.6320
35	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	26.313	0.0634
36	Spathulenol	27.711	0.2905
37	Manoyl oxide	36.831	0.1172
38	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	43.350	0.1419

L'analyse a pu mettre en évidence la présence de 38 composants, les produits majoritaires de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* sont : 1-Limonène (6.25%), Isomenthone (10.43%), Pulegone (35.66%), Cis-Piperitone oxide (9.96%), Piperitone oxide (21.60%).

La composition chimique de l'huile essentielle dans cette étude est caractérisée par de fortes teneurs en monoterpènes oxygénés (80.74%) et monoterpènes hydrocarbonés sont présents avec une concentration non négligeable de l'ordre de 11.51%, Cependant, les sesquiterpènes oxygénés sont présents en faibles quantités (0.29%) et les sesquiterpènes hydrocarbonés avec un pourcentage d'ordre 3.67%. Ces résultats sont représentés dans la figure 11.

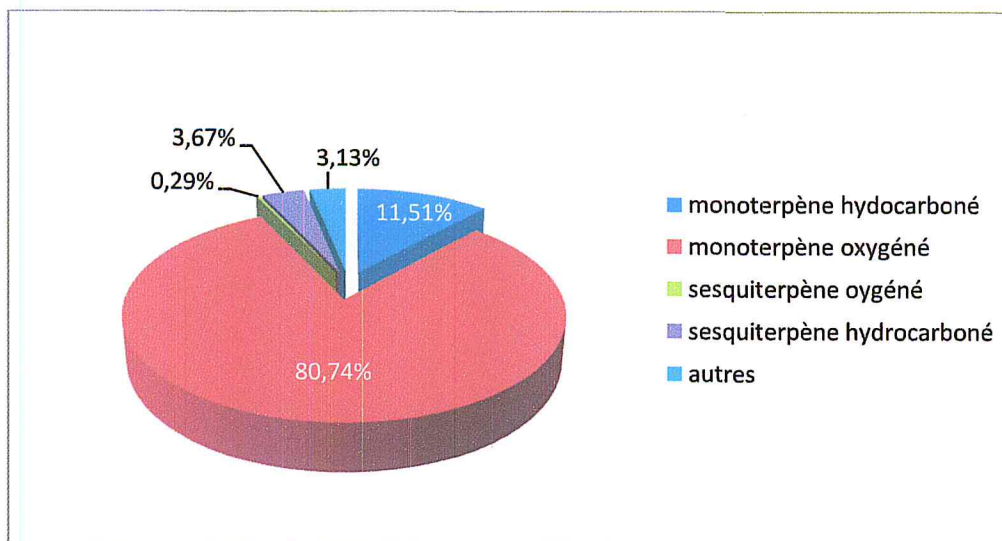


Figure 11 : Histogramme de l'analyse CPG-SM de l'huile essentielle de *Satureja calamintha*.

7. Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvé dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Ils ont caractérisé par leur effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...

Le dosage des polyphénols totaux est effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu [64].

7.1. Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765nm, est proportionnelle à la quantité de polyphenols présents dans l'extrait [65].

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. En milieu alcalin, le réactif du Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu [66].

7.2. Mode opératoire

On introduit 1ml de chaque solution d'extrait dans des tubes à essais secs ; on lui ajoute 5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dans chaque tube ; on agite vigoureusement puis on laisse agir 5 min avant d'ajouter 4 ml de carbonate de sodium à 7.5%.

Après 1 heures d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, on lit les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 765 nm.

On procède la même opération pour l'acide gallique à différentes concentrations en introduisant 1 ml de solution diluée dans une série de tubes et ajout des autres réactifs. Le blanc est représenté par l'eau distillée additionné du Folin-Ciocalteu, et de carbonate de sodium.

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits de *S. calamintha* sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenu en utilisant l'acide gallique comme standard.

✚ Préparation de la solution d'extrait :

2 mg de l'extrait a été solubilisé dans 1ml de méthanol et 6.5 ml d'eau distillé.

✚ Préparation des solutions d'acide gallique :

Les solutions ont été préparé 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.

✚ 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.

Les absorbances de différentes concentrations de l'acide gallique sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.

Concentration (mg/ml)	0	0.0156	0.0313	0.0625	0.125
Absorbance	0.038	0.274	0.438	0.686	1.546

On peut représenter la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 12) en prenant la concentration (mg/ml) en fonction de l'absorbance. Le coefficient de corrélation étant $R^2 = 0,9907$.

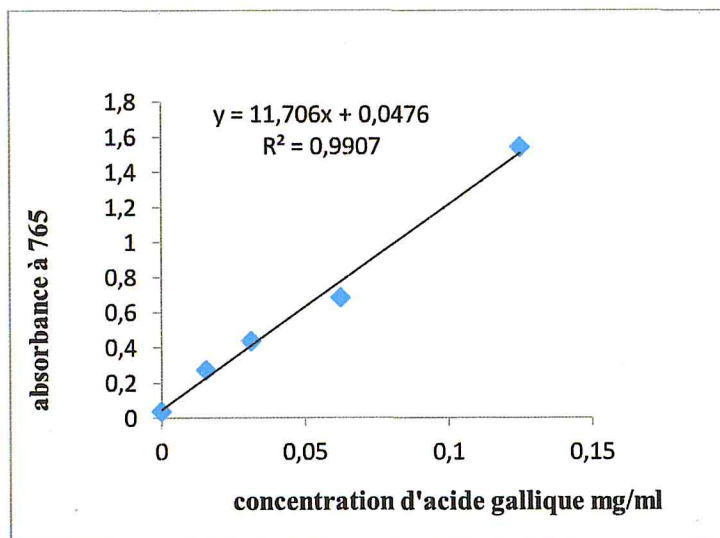


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

Les concentrations des polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ($y = 11,706x + 0,0476$).

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait (mg EAG/g d'extrait) en appliquant la formule suivante :

$$C = (c * V) / m$$

C : La teneur en phénols totaux (mg EAG/g d'extrait).

c : La concentration de l'extrait équivalent à l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : Volume de l'extrait (ml).

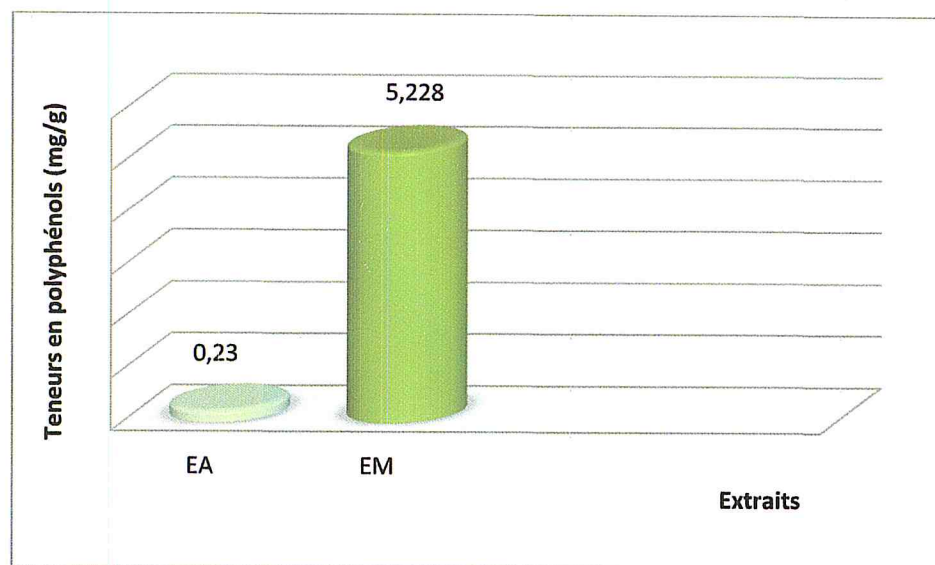
m : Le poids sec d'extrait (g).

7.3. Résultats et discussion

Dans cette étude nous avons déterminés les teneurs en polyphénols totaux dans deux extraits, l'extrait acétate d'éthyle (EA) et l'extrait méthanolique brut (EMb). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau 14 : Teneurs en polyphénols totaux existant dans les extraits EA et EMb

Extraits	Teneurs en polyphénols (mg /g)
EA	0.230
EMb	5.228

**Figure 13** : Teneurs en polyphénols des extraits de *Satureja calamintha*.

L'analyse quantitative de la teneur en polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu montre la présence de quantités importantes de substances phénoliques pour l'extrait méthanolique (5.22 mg /g), dont le taux est presque quatre fois plus que celui de l'extrait d'acétate d'éthyle (0.230 mg /g).

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols, la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

Chapitre III

Etude de l'activité biologique
de l'espèce *Satureja*
calamintha

I. Etude de l'activité anti-oxydante de l'espèce *Satureja calamintha*

L'activité anti-oxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques.

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables d'arrêter ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés sont présentes surtout dans les familles des thiols et des phénols.

Bien que les réactions d'oxydation soient nécessaires à la vie, elles peuvent aussi être destructrices : les plantes et les animaux utilisent et produisent de nombreux antioxydants pour se protéger, tels le glutathion, la vitamine C et la vitamine E, ou des enzymes telles la catalase, la superoxyde dismutase et certaines peroxydases.

1. Principe

Cette méthode est basée sur la réduction d'un radical libre très stable : le 2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en présence d'un antioxydant donneur. Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. La réduction du radical libre (DPPH) par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence d'un donneur d'hydrogène [67].

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune (Figure 14), Le DPPH se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques.

Dans cette partie de ce chapitre nous allons étudier l'activité antioxydant de deux extraits : l'extrait méthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle.

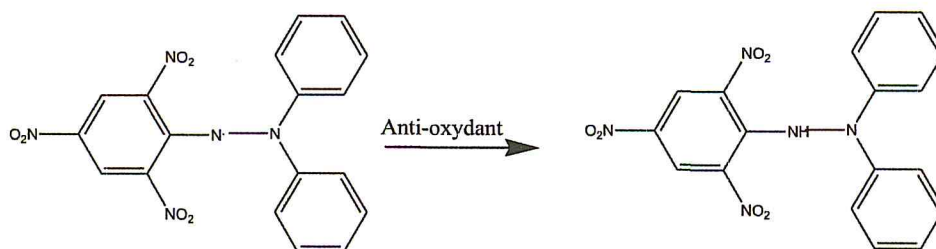


Figure 14 : Réduction du radical libre DPPH.

2. Protocole expérimentale

- Préparation de la solution de DPPH

Une solution méthanolique de 0.004 % de DPPH a été préparé fraîchement avec 4 mg de DPPH dissout dans 100 ml de méthanol.

- Préparation des échantillons

La solution mère de l'extrait est préparée dans le méthanol à une concentration de 5mg/ml. Des dilutions sont réalisées de façon à avoir des concentrations allant de 0.1 à 5 mg/ml.

- Préparation du standard

La solution est représentée par une solution méthanolique d'un antioxydant standardn: vitamine C. l'opération est faite dans les mêmes conditions que les échantillons.

- Mise en œuvre pratique

On introduit 1ml de chaque solution de l'extrait à étudié dans un tube à essai, on lui ajoute 2ml de solution méthanolique de DPPH, puis on le laisser incuber 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Toutes les lectures sont effectuées à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible

Le blanc est représenté par le méthanol, Le témoin négatif est composé de 2 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml de méthanol, et le témoin positif est représenté par une solution méthanolique de vitamine C.

L'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité antiradicalaire en pourcentage ou l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant. Elle est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) suivant cette relation :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{Abs c} - \text{Abs e})}{\text{Abs c}} \times 100$$

Abs c : Absorbance du contrôle négatif.

Abs e : Absorbance de l'échantillon testé.

Nos résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues.

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC_{50} qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH [68].

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire [69].

$$ARP = 1 / IC_{50}$$

ARP : Puissance anti radicalaire

IC_{50} : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

3. Résultats et discussion

Pour étudier l'activité anti-oxydante de l'extrait méthanolique et d'acétate d'éthyle, nous avons retenu la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrazyl) comme un radical libre [70]. Nous avons choisi la méthode DPPH en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité, mais aussi parce que les mesures IC_{50} exprimées en mg/ml sont comparables entre elles et non pas seulement à celle d'une référence.

Pour cette évaluation, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination du pourcentage d'inhibition et d'une autre part la détermination de la réduction relative du radical DPPH a un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH.

Après mesures spectrophotométriques, Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire. A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur de l' IC_{50} pour chaque extrait. Plus la valeur de l' IC_{50} est petite, plus l'extrait possède une bonne activité anti-oxydante.

L'activité est considérée comme une diminution de l'absorbance de l'échantillon par rapport à la solution standard de DPPH.

Les résultats de mesure des pourcentages d'inhibition des extraits étudiés sont illustrés dans le tableau 15 ainsi que dans la figure 15.

Tableau 15 : Variation des absorbances et pourcentage de réduction du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentration de l'extrait méthanolique (EM), d'acétate d'éthyle (EA) et du standard (Vit C).

Concentration mg/ml		0.1	0.125	0.25	0.5	1	2	4	5
EM	absorbance	0.504	0.443	0.283	0.168	0.142	0.081	0.073	0.061
	% d'inhibition	13.99	24.40	51.70	71.33	75.76	86.17	87.54	90.61
EA	absorbance	0.530	0.510	0.494	0.294	0.238	0.170	0.157	0.132
	% d'inhibition	9.55	12.96	15.69	49.82	59.38	70.98	73.20	77.47
Vit C	absorbance	0.314	0.286	0.175	0.084	0.062	0.056	0.042	0.032
	% d'inhibition	46.24	51.19	70.13	85.66	89.41	90.44	92.83	94.53

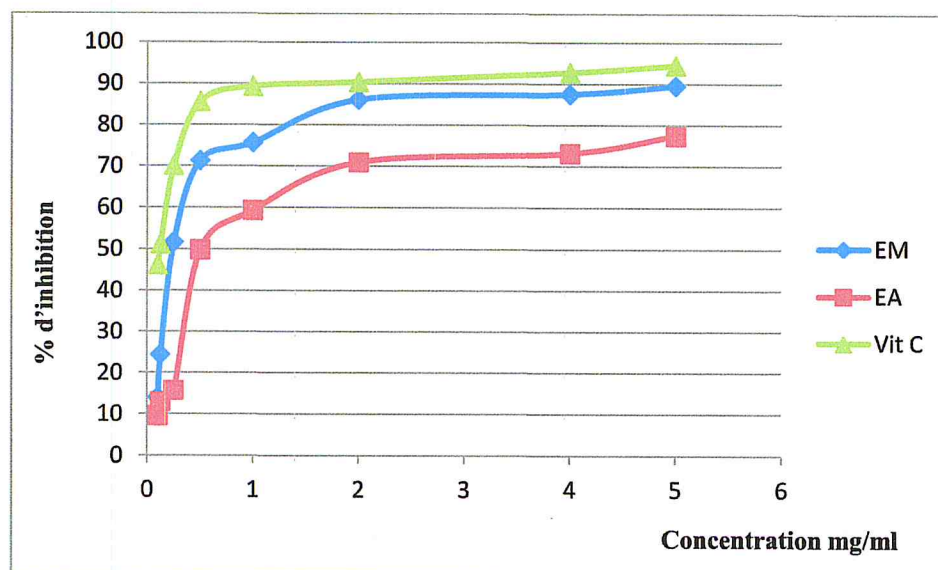


Figure 15 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH' de l'extrait méthanolique (EM), d'acétate d'éthyle (EA) et du standard (Vit C).

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'inhibition est fortement dépendant des concentrations en substrat, et ce pour les extraits ainsi que pour la vitamine C. Plus précisément l'augmentation en concentration de l'échantillon provoque l'élévation de pourcentage d'inhibition du radical libre et par conséquent l'augmentation de l'activité anti-radicalaire.

Pour l'acide ascorbique, on assiste à une augmentation du pourcentage d'inhibition et cette augmentation est proportionnelle à la concentration de la solution jusqu'à la fin de l'expérimentation où le pourcentage d'inhibition arrive à se stabiliser. L' IC_{50} est très importante avec une valeur de 0.29 mg/ml.

L'activité antioxydante des extraits étudiés est exprimée en IC_{50} , et les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 16.

Tableau 16: L' IC_{50} et l'ARP des extraits méthanolique brut (EMb), d'acétate d'éthyle (EA) et du standard.

	IC_{50} (mg/ml)	ARP
EA	0.50	2
EM	0.35	2.85
Vit C	0.29	3.44

Ces résultats sont représentés ainsi sur un histogramme (Figure 16).

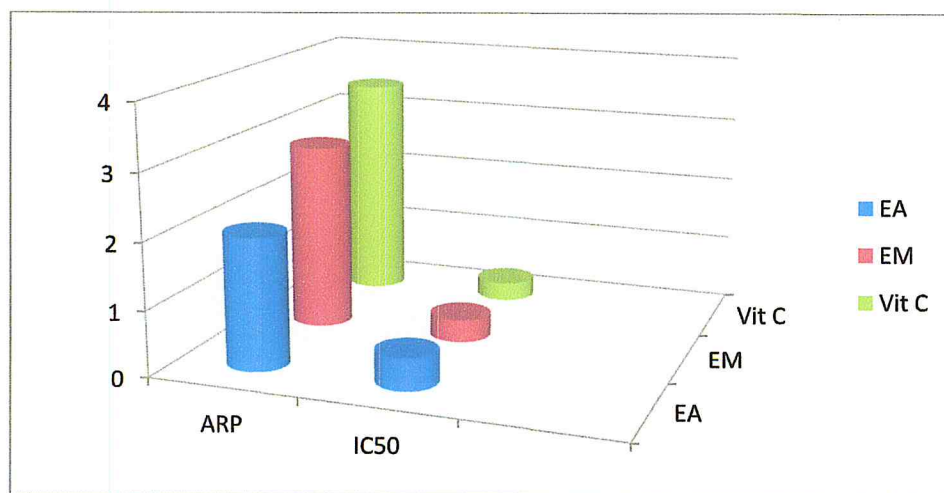


Figure 16 : L' IC_{50} et l'ARP des extraits EA, EMb et de Vit C.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que l'extrait méthanolique et d'acétate d'éthyle possèdent un pouvoir antioxydant importante avec des valeurs d' IC_{50} de l'ordre de 0.35 et 0.50 mg/ml respectivement.

D'après le classement par ordre croissant schématisé dans la figure 3, on remarque que tous les extraits ont un pouvoir antioxydant inférieur à celui de l'antioxydant standard (Vit C). De même les extraits de la même plante présentent des valeurs d'IC₅₀ distinctes.

Des travaux réalisés sur l'extrait méthanolique de *Satureja calamintha* récolté dans la région de Tlemcen ont montré que l'extrait présente une faible activité antiradicalaire avec une valeur d'IC₅₀ de 2.075 mg/ml [71].

II. Etude de l'activité antimicrobienne de l'espèce *Satureja calamintha*

Introduction

Les tests antibactériens et antifongiques ont pour but de rechercher l'activité biologique des feuilles de *Satureja calamintha* vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries, moisissure et levure. Les extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes dont ils sont extraits.

Dans ce chapitre nous allons étudier *in vitro* le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle et des extraits préparé à partir de l'espèce *S. calamintha* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries et 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 sept germes pathogènes d'origine hospitalière dont cinq souches bactériennes (trois de Gram + et deux de Gram -) et deux souches fongiques.

1. Principe de la méthode

1.1. antibiogramme

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongogramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide.

L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante.

Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester [72].

1.2. Principe

La technique consiste à déposer des disques de papier buvard stérile de 9 mm de diamètre imprégnés d'une concentration connue de la substance chimique testée sur une gélose dans des boîtes de pétrie inoculées et uniformémentensemencées 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 pâle apparaît autour du disque, là où la croissance microbienne a été inhibée, cette région s'appelle « zone d'inhibition » ou « halo d'inhibition » (figure 17). 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.

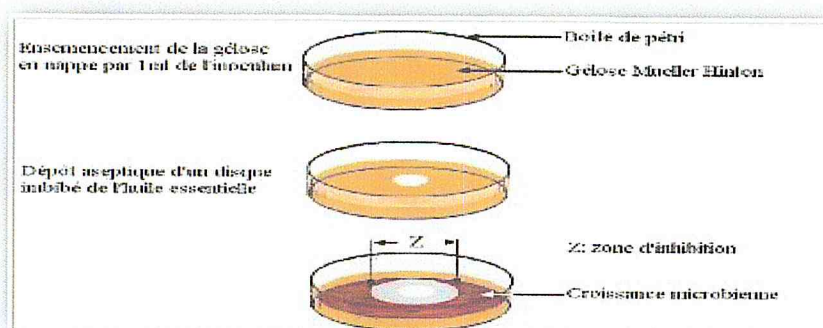


Figure 17 : Illustration de la méthode des antibiogrammes.

2. Microorganismes utilisés

Les souches microbiennes utilisées dans notre étude sont de référence ATCC provenant du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida. En effet, sept souches microbiennes sont utilisées dans notre étude, à savoir, cinq bactéries et deux champignons.

Les souches microbiennes testées sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 17 : Microorganismes utilisés

Souches	Nature de souches	Gram	Références (ATCC)
<i>Bacillus cereus</i>	Bactérie	+	ATCC 10876
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie	+	ATCC 6538
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie	-	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactérie	-	ATCC 2785
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bactérie	-	ATCC 700603
<i>Candida albicans</i>	Levure	/	ATCC 10231
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Moisissure	/	ATCC 16404

3. Antibiotiques et antifongique utilisés

La sensibilité des souches microbiennes a été testée vis-à-vis des antibiotiques (Ciprofloxacine (ATB 1) ; 5 µg/disque, Gentamicine (ATB 2) ; 10 µg/disque) et des antifongiques (Amphotéricine B (ATF 1) ; 0.5 mg/ disque, Métronidazol 0.25 mg/disque) par la méthode de diffusion sur disque.

4. Protocole expérimental

L'activité antimicrobienne a été déterminée par le protocole adaptée par la pharmacopée européenne [73].

✚ Préparation de l'inoculum

Cette méthode consiste à préparer une suspension microbienne en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture microbienne de 18-24h et les introduire dans des tubes à essais avec 9 ml d'eau physiologique stérile, puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

La lecture de la densité optique est effectuée en utilisant un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. La suspension microbienne est obtenue par la mesure de la densité optique (D.O) qui doit être comprise entre 0,08 à 0,1 pour les bactéries et de 1 à 2 pour les levures et les moisissures correspondant à une concentration optimale de 10^7 à 10^8 germes/ml.

✚ 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 Pétri de 90mm de diamètre à raison de 15ml par boite.
- Laisser refroidir et solidifier sur la paillasse

✚ Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries séries.
- Répéter l'opération trois fois, en tournant la boite de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

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

✚ Séchage

Laisser sécher les boîtes de Pétri pendant quelques minutes à température ambiante. Les couvercles des boîtes doivent être fermés.

✚ Préparation de la solution à tester

- Faire dissoudre une quantité de l'extrait dans le DMSO pour avoir la concentration désirée (80 mg/ml). ou l'HE utilisé sans faire dilution.
- Agiter pendant quelques secondes à l'aide d'un vortex.

✚ Déposition 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 déposer à la surface des milieux de culture préalablement coulés. Appuyer doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.
- Laisser les boîtes pendant 30 minutes sur la palliasse à température ambiante pour permettre une bonne diffusion des produits étudiés.

✚ Incubation

- Incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48h à 5 jours pour les levures et moisissures.

✚ Lecture des résultats

La sensibilité des germes au produit est déterminée après incubation, par mesure de diamètre des zones claires 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 [74]

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur ou égale à 28mm.
- Modérément inhibitrice lorsque : $16\text{mm} \leq \text{diamètre de la zone} < 28\text{mm}$.

- Légèrement inhibitrice lorsque : $10\text{mm} \leq \text{diamètre de la zone} < 16\text{mm}$.
- Non inhibitrice lorsque : diamètre de la zone $< 10\text{ mm}$.

NB : Pour le témoin 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.

5. Résultats et discussion

Nous avons testé l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et de l'extrait chloroformique (EC), l'extrait hexanique (EH), l'extrait méthanolique (EM) et de l'extrait d'acétate d'éthyle (EA) vis-à-vis de sept souches microbiennes. Le tableau 19 rapporte les résultats du pourcentage d'inhibition déterminés à partir des diamètres des zones d'inhibition.

Après 24h d'incubation à 37°C pour les souches bactériennes et après 72h d'incubation à 25°C pour les souches fongiques, nous avons observé l'apparition des zones d'inhibition autour des disques. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant

Tableau 18 : Les diamètres des zones d'inhibition exprimé en mm de l'HE, extraits, ATBs et ATFs relatives aux différentes souches microbiennes.

Souches	HE	EA	EC	EH	EM	ATB ₁	ATB ₂	ATF ₁	ATF ₂
<i>Basilus cereus</i>	28	/	/	13	10	40	23	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	/	/	12	10	27	21	/	/
<i>Escherichia coli</i>	26	13	13	12	10	30	29	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	11	13	12	/	34	ND	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21	14	10	11	/	39	26	/	/
<i>Candida albicans</i>	ND	16	12	10	11	/	/	/	16
<i>Aspergillus Brasiliensis</i>	42	29	/	10	10	/	/	13	17

ATB₁ : Ciprofloxacine.

ATB₂ : Gentamicine.

ATF₁ : Amphotéricine B.

ATF₂ : Métronidazol

A l'aide des résultats mentionnés dans le tableau 18, on a pu tracer les histogrammes suivants.

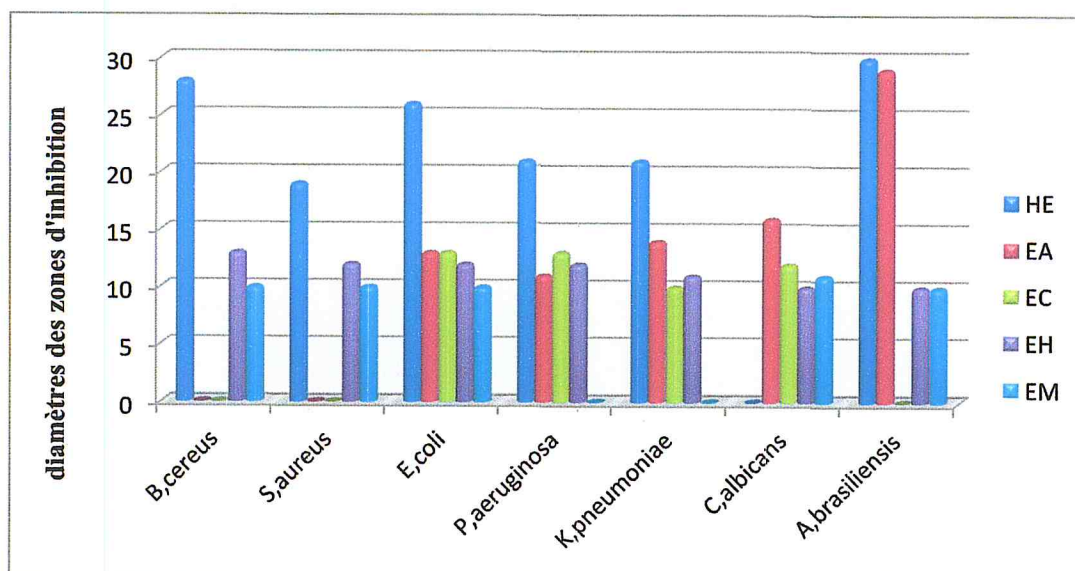


Figure 18 : les diamètres des zones d'inhibition d'HE et des extraits relatifs aux différentes souches microbiennes.

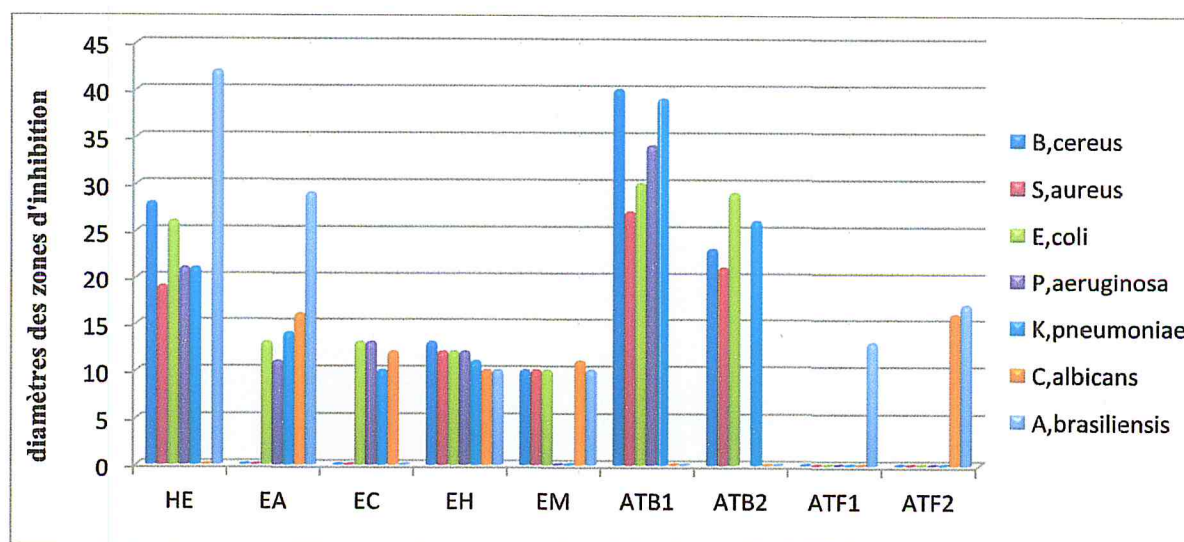


Figure 19 : les diamètres des zones d'inhibition d'HE, extraits, ATB1, ATB2, ATF1, ATF2, relatifs aux différentes souches microbiennes.

On peut constater d'après les résultats représentés dans le tableau 18 et dans la figure 18 et 19 que l'HE de *S. calamintha* a produit des zones d'inhibition plus grandes que les extraits.

Nous avons observé que l'huile essentielle a exercé une importante activité inhibitrice sur les souches *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de 28 mm et 26 mm respectivement, et une inhibition modérée vis-à-vis les souches *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (avec des diamètres de 21 mm), *Staphylococcus aureus* (avec un diamètre de 19 mm). Par contre, les extraits présentent une inhibition légère vis-à-vis les souches testées avec des diamètres d'inhibition qui varient entre 10 à 14 mm. Ce qui nous amène à dire que nos extraits présentent une faible activité antibactérienne par rapport à l'huile essentielle de cette plante.

Les antibiotiques testés ont présenté une bonne activité antibactérienne vis-à-vis tous les bactéries, notamment la Ciprofloxacine qui possède un large spectre d'activités contre les bactéries à Gram- et à Gram+. Il faut noter aussi que la Gentamicine a donné un halo d'inhibition proche à celui de notre l'huile essentielle.

Les résultats obtenus pour les souches fongiques révèlent que la souche *Aspergillus Brasiliensis* a présenté une sensibilité très puissante vis-à-vis l'HE et l'extrait d'acétate d'éthyle avec une zone d'inhibition de 42 mm et 29 mm respectivement et une résistance pour l'extrait chloroformique. Pour la souche *Candida albicans*, à l'exception de l'extrait d'acétate d'éthyle qui a présenté une bonne activité avec un diamètre de 16 mm identique à l'ATF2, les autres extraits ont inhibé légèrement avec un diamètre de 10 à 12 mm.

Pour l'antifongique standard ; nous avons observé que Amphotéricine B a donné un halo d'inhibition de 17 mm, soit un diamètre inférieur à celui de notre l'huile essentielle.

En ce qui concerne le témoin négatif, si les extraits doivent être soumis aux 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.

Pour cela le DMSO a été testé comme solvant, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes.

Conclusion générale

La présente étude a porté sur l'espèce *Satureja calamintha* qui appartient à la famille des Lamiacées, une des familles les plus importantes dans la flore algérienne et les plus utilisées par les thérapeutes traditionnels. Différents aspects de l'espèce ont été étudiés : quelques propriétés phytochimiques, activités anti-oxydante et antimicrobienne des extraits et de l'huile essentielle.

L'extraction de la partie aérienne de la plante par solvant (MeOH, AcOET, CHCl₃, Hexane) a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés, alors que l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation a donné un rendement satisfaisant d'ordre 1.16 %.

L'analyse chimique effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS) de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation a pu mettre en évidence la présence de 38 composants. La GC-MS a révélé que les constituants majeurs sont : 1-Limonène (6.25%), Isomenthone (10.43%), Pulegone (35.66%), Cis-Piperitone oxide (9.96%), Piperitone oxide (21.60%).

L'analyse quantitative de la teneur en polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu montre la présence de quantités importantes de substances phénoliques pour l'extrait méthanolique (5.22 mg/g), dont le taux est presque quatre fois plus que celui de l'extrait d'acétate d'éthyle (0.230 mg/g).

L'étude de l'activité anti-oxydante est effectuée par le test de DPPH. Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique et d'acétate d'éthyle possèdent un pouvoir antioxydant important avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 0.35 et 0.50 mg/ml respectivement.

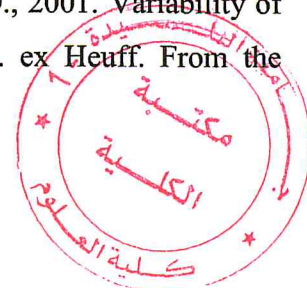
L'étude *in vitro* du pouvoir inhibiteur de l'huile et des extraits par la méthode de diffusion de disque révèle que l'huile essentielle a exercé une importante activité inhibitrice notamment sur les souches *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de 28 mm et 26 mm respectivement, alors que les extraits présentent une inhibition légère vis-à-vis les souches testées avec des diamètres d'inhibition qui varient entre 10 à 14 mm, on peut déduire que nos extraits sont faiblement actifs sur les souches bactériennes testées par rapport à l'huile essentielle de cette plante.

En ce qui concerne le pouvoir antifongique, nos résultats montrent que d'acétate d'éthyle et l'HE possède une activité inhibitrice très forte sur la souche *Aspergillus Brasiliensis*. Pour la souche *Candida albicans*, à l'exception de l'extrait d'acétate d'éthyle qui a présenté une bonne activité avec un diamètre de 16 mm, les autres extraits ont inhibé légèrement avec un diamètre de 10 à 12 mm.

Les espèces *Satureja calamintha* est riche en métabolites secondaires, une exploitation de leurs propriétés anti-oxydante et antimicrobienne implique une recherche plus poussée de ses principes actifs.

Références bibliographiques

- [1] El-Rhaffari L., Zaid A., 2004. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée, Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes, 293- 318.
- [2] Duraffourd C., Lapraz J-C., Chemli R., 1997. La plante médicinale de la tradition à la science, 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222.
- [3] Naghibi F., Mosaddegh M., Motamed S-M, Ghorbani A., 2005. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2, 63-79.
- [4] Guignard J-L., 1998. Abrégé botanique, 2ème Edition Masson. Paris, 199.
- [5] Vârban D.I., Duda M., Vârban R., Muntean S., 2009. Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis L.*, Culture. Bulletin UASVM Agriculture. 66(2), 225- 229.
- [6] Gulluce M., Sokmen M., Daferera D., Agar G., Ozkan H., Kartal N., 2003. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil, methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis L.*, J. Agri.Food. Chem. 51: 3958–3965.
- [7] Skoc̃ibus'ic'M., Bezic' N., Dunkic V., 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. Food. Chem.96: 20–28.
- [8] Quezel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 788-789.
- [9] Padrini F., Lucheron M. T., 1996. Le grand livre des huiles essentielles Guide pratique pour retrouver vitalité bien être et beauté avec les essences et l'aramassage énergétique avec plus de 100 photographies, Ed. DeVecchi. 15p.
- [10] Baba Aissa F., 2000. Encyclopedie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique d'Orient et d'Occident, Ed. Librairie moderne Rouiba. 46p.
- [11] Lamendin H., 2007. Soignez votre bouche par les plantes : remède d'hier et aujourd'hui, 5ème Ed. L'Harmattan. Paris. 34p.
- [12] Perrucci S., Mancianti F., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I., Macchioni G., 1994. In vitro antifungal activity of essential oils against some isolated of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*, *Planta Medica*, 60, 184-187.
- [13] Slavkovska V., Jancic J, Bojovic S., Milosavljevic S., Djokovic D., 2001. Variability of essential oils of *Satureja montana L.* and *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. From the central part of the Balkan peninsula, *Phytochemistry*, 57(1):71-76.



- [14] Mehmet Ozturk., 2012. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil, *Food Chemistry* 134, 48–54.
- [15] Ayse Dilek Azaz., Mine Kürkcüoğlu., Fatih Satil., K. Hüsnü Can Baser., Gülendamar Tümen., 2005. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of some *Satureja* essential oils, *Flavour Fragr. J.*, 20, 587–591.
- [16] N. Bezić., I. Samanić., V. Dunkić., V. Besendorfer., J. Puizina., 2009. Essential oil composition and internal transcribed spacer (ITS) sequence variability of four South-Croatian *Satureja* species (Lamiaceae), *Molecules* 14, 925–938.
- [17] D. Fraternali., L. Giamperi., A. Bucchini., D. Ricci., F. Epifano., S. Genovese., M. Curini., 2007. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Satureja montana* from Central Italy, *Chem. Nat. Compd.* 43, 622–624.
- [18] J. Bruneton., 2009. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*, 4e éd. Tech et Doc Paris, 1269 p.
- [19] F. Sefidkon., Z. Jamzad., 2004. Essential oil composition of *Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss. from Iran. *Flav. Fragr. J.*, 19, 571-573.
- [20] F. Sefidkon., Z. Jamzad, 2005. Chemical composition of the essential of three Iranian *Satureja* species (*S. mutica*, *S. macrantha* and *S. intermedia*), *Food Chem.*, 91, 1-4.
- [21] M. Milos., A. Radonic., N. Bezic., V. Dunkic., 2001. Localities and seasonal variations in the chemical composition of essential oils of *Satureja montana* L. and *S. cuneifolia* Ten. *Flav. Fragr. J.*, 16, 157-160.
- [22] Adiguzel A., Ozer H., Kilic H., Cetin B., 2007. Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* on foodborne bacteria and fungi. *Czech J. Food Sci.*, 25: 81–89.
- [23] Hossein Saghi., Abbas Bahador., Davoud Esmaeili., 2014. Study of inhibition of *aphA6* gene in *acinetobacter baumannii* by *satureja* and thyme essence with rt-pcr technique *The International Journal of Biotechnology*, 3(9), 115-122.
- [24] Marilú Roxana Soto-Vásquez., Paúl Alan Arkin Alvarado-García., 2016. Aromatherapy with two essential oils from *Satureja* genre and mindfulness meditation to reduce anxiety in humans, *Journal of Traditional and Complementary Medicine* xxx, 1e5.
- [25] R. Ortet., E. L. Regalado., O. P. Thomas., J. A. Pino., M. D. Fernández., 2010. Composition and Antioxidant Properties of the Essential Oil from the Endemic Cape Verdean *Satureja forbesii*, *GIFC*, CP-57.

- [26] Lameck S. Chagonda., Jean-Claude Chalchat., 2005. The composition of the leaf essential oil of *Satureja punctata* (Benth.) Briq. from Zimbabwe, *Flavour Fragr. J.*, 20, 316-317.
- [27] K. Vagionas., K. Graikou., O. Ngassapa., D. Runyoro., I. Chinou., 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania *Food Chemistry*, 103, 319–324.
- [28] Mihajilov-Krstev T., Radnović D., Kitić D., Zlatković B., Ristić M., Branković S. ; 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Cent. Eur. J. Biol.*, 4(3), 411–416.
- [29] Michaelakis A., Spiridon A.T., Georgios Koliopoulos G., Nikos G.C. ; 2007. Essential Oils of *Satureja* Species : Insecticidal Effect on *Culex pipiens* Larvae (Diptera: Culicidae). *Molecules*, 12, 2567-2578.
- [30] Gohari A.R., Saeidnia S., Gohari M.R., Moradi-Afrapoli F., Malmir M., Hadjiakhoondi A. ; 2010. Bioactive flavonoids from *Satureja atropatana* Bonge. *Natural Product Research*, 23, 609-14.
- [31] Francisco A., Tomas-Barber N., Syed Z-H., Maria I-G., 1988. The Distribution of Methylated Flavones in the Lamiaceae, *Biochemical Systematics and Ecology*, 16, 43-46.
- [32] Hernandez N.E., Tereschuk M.L., Abdala L.R., 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina), *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 317-322.
- [33] Ćetković G.S., Ćanadanović-Brunet J., Djilas S.M., Tumbas V.T., Markov S.L., Ćetković D.D., 2007. Antioxidant Potential, Lipid Peroxidation Inhibition and Antimicrobial Activities of *Satureja Montana* L. subsp. *Kitaibelii* Extracts. *Int. J. Mol. Sci.*, 8(10), 1013-1027.
- [34] Mchedlishvili D., Kuchukashvili Z., Tabatadze T., Davitaia G., 2005. Influence of flavonoids isolated from *Saturejahortensis* L. on hypercholesterolemic rabbits. *Indian Journal Pharmacol.*, 37, 259-260.
- [35] CECILIA LABBE., MARIANO CASTILLO., JOSEPH D. CONNOLLY., 1993. Mono and sesquiterpenoids from *satureja gilliesii*, *phytochemistry*, Vol. 34, No. 2, pp. 441- 44.
- [36] V. MANRIQUEZ, C. LABBE, a M. CASTILLO, M. CASTILLO, O. WRRRKE, 1997. 1 α , 5 α - Dihydroxymanoyl Oxide, a Novel Diterpene from *Satureja gilliesii*, *Acta Cryst*, C53, 624-626.

- [37] V. Baren., I. Anao., L. Di Lira., S. Debenedetti., P. Houghton., S. Croft., V. Martino., 2009. Triterpenic acids and flavonoids from *Satureja parvifolia*, Evaluation of their antiprotozoal activity, *Nat Prd Res*, 23(17), 1609-14.
- [38] F.M. Moghaddam., M.M. Farimani., S. Salahvarzi., A. Gholamreza., 2007. Chemical constituents of Dichloromethane Extract of Cultivated *Satureja Khuzistanica*, *Evid Based Complement Alternat Med*, 4(1), 95-98.
- [39] T. Adzet., J. Passet., 1972. Chemotaxonomie du genre *Satureja-calamintha*, *Rivista Italiana ERROS*, 54,482,486.
- [40] A. Pérez., V. Negueruela., L. Saez., 1993. The volatiles of two *Calamintha* species growing in Spain, *Calamintha sylvatica* Bromf, and *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Acta Horticulturae*, 333, 255,260.
- [41] Gualbo R., Sesé J. A., Villar L., 1993. Nouvelle localité de *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Labiatae) dans les Pyrénées espagnoles. *Le monde des plantes*, 447, 7-11.
- [42] Buronzo AM., 2008. *Le Grand Guide des Huiles essentielles*. Ed. HACHETTE Pratique. P, 235.
- [43] E. Pablo., R. Bonilla., A. Jorge., M.L. Nancy., H. Beltran., A. Alba., 2011. Chemical composition and pharmacological activity of ethanol extract of *Satureja sericea* (goyal), J. aguedo, L. Tinco, F. Rios *Recherches en sciences*, 14 (1), 14-20.
- [44] E. Lizarraga., L. R. Abdala., 2004. Compuestos Fenolicos Mayoritarios en *Satureja boliviana* (Benth) Briq. (Lamiaceae), *Loi sur l'agriculture*, Buenos Aires, 23(2), 198-200.
- [45] De Pooter H. L., Goetghebeur P., Schamp N., 1987. Variability in composition of the essential oil of *Calamintha nepeta*. *J of Phytochemistry*, 26: 3355 - 3356.
- [46] Fraternali D., Giamperi L., Ricci D., Manuta A., 1998. Composition of essential oil as taxonomic Marker for *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta*. *J. of Essential Oil Research*, 10: 568-570.
- [47] Kitic D., Stojanovic G., Palic R., Randjelovic V., 2005. Chemical composition and microbial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta* var. *subisodonda* (Borb.) Hayek from Serbia. *J. Essent. Oil. Res.* 17: 701-703.
- [48] Satrani B., Farah A., Fechtal M., Talbi M., Blaghen M., Chaouch A., 2001. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du Maroc. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 94(956): 241-250.
- [49] LABIOD Ryma., 2016, Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de doctorat université BADJI MOKHTAR-ANNABA.

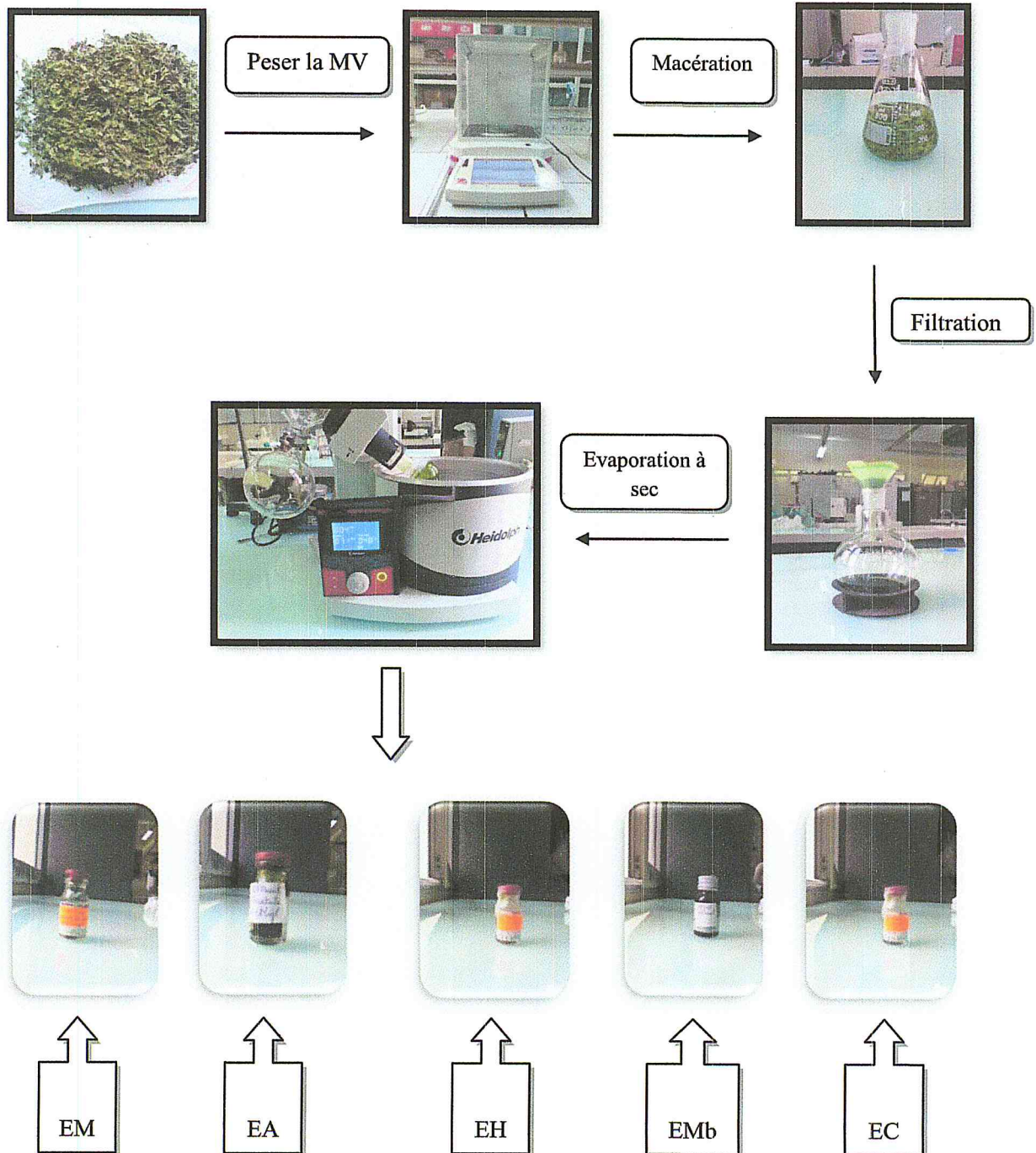
- [50] Kerbouche L., Hazzit M., Baaliouamer O., 2013. Essential Oil of *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq. from Algeria: Analysis, Antimicrobial and Antioxidant Activities, *Journal of Biologically Active Products from Nature*. Volume. 3, Issue 4.
- [51] M. Ferhat., 2009. Recherche des substances bio-actives de *centaurea microcarpa* coss et dur, Université de M'sila.
- [52] AR. Gohari., S. Saeidni., MR. Gohari., F. Moradi-Afrapoli., M. Malmir., A. Hadjiakhoondi., 2006. Bioactive flavonoids from *Satureja atropanta* Bonge, *Flav.fragr. J*, 6, 510-512.
- [53] N. Benayad., 2008. Utilisation des huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines comme insecticides pour lutter contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées (blé, maïs, riz), Rabat-Maroc.
- [54] Havsteen B., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochem Pharmacol*, 32,1141–8.
- [55] Z. Hellal., 2010. Contribution à l'étude des propriétés antibactérienne et antioxydant de certaines huiles essentielles extraites des citrus application sur la sardine (*sardina pilchardus*), Université Mouloud mammeri de tizi-ouzou.
- [56] Benavides, A., Bassarello, C., Montoro, P., Vilegas, W., Piacente, S., Pizza, C., 2007. Flavonoids and isoflavonoids from *Gynierium sagittatum*, *Phytochemistry* 68, 1277–1284.
- [57] K. Bouhadjera., 2006. Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales saharienne *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L, Université abou bekr belkaid.
- [58] J.C. Gaignautl., D. Bidet., M. Gaillard., J. Perronnet., 1997. Stérols et stéroïde, Paris, Ellipses, 11-31.
- [59] J. Bruneton., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie – plantes médicinales – 3^{ème} Ed Technique et documentations, Paris, 227-310-312-313-314, 494.
- [60] A. Seyoum., K. Asres., F.K. El-Fiky, 2006. Structure-radical scavenging activity relationships, *Phytochemistry*, 67, 2058-2070.
- [61] J. Bruneton., 2009. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales, Ed Lavoisier, Paris of flavonoids, 273-277, 366-377, 502-506.
- [62] Pharmacopée Européenne 1 Conseil de l'Europe, Maisonneuve S.A. 1996. Editions, Sainte Ruffine.
- [63] American Perfumer & Essential Oil Review., 1928. Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type J.F.Clevenger, 467-503.

- [64] Gulluce M., Aslan A., Sokmen M., Sahin F., Adiguzel A., Agar G., Sokmen A., 2006. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine*. 13: 515–521.
- [65] Boizot N., Charpentier JP., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra.79-82.
- [66] Daels-rakotoarison D., 1999. Extraits polyphénoliques d'aubepine, de cola et d'eglantier. Thèse de doctorat. Université de Lille II. France. P : 64.
- [67] Burits M., Bucar F., 2000. Antioxydant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 14: 323-328.
- [68] Samarth R.M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A.; 2008. Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract *Food Chemistry*, 106, 868-873.
- [69] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.; 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft and Technology*, 28, 25-30.
- [70] Licina BZ., Stefanovic OD., Vasic SM., Radojevic ID., Dekic MS., Comic LR., 2013. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. *Food Control*. 33: 498-504.
- [71] Bougandoura N., Bendimerad N., 2012. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*. 09, 14-19.
- [72] Broadasky T. F., Lewis C., Eble T.E., 1976. Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr.*, 123, 33-44.
- [73] Pharmacopée européenne., 2002. Direction de la qualité du médicament, Council of Europe, 2623p.
- [74] C. Mutai., C. Vafias., D. Abatis., V. Roussis., 2009. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extract and lupine triterpenes, *Journal of Ethnopharmacology*, 10, 1016-1050.

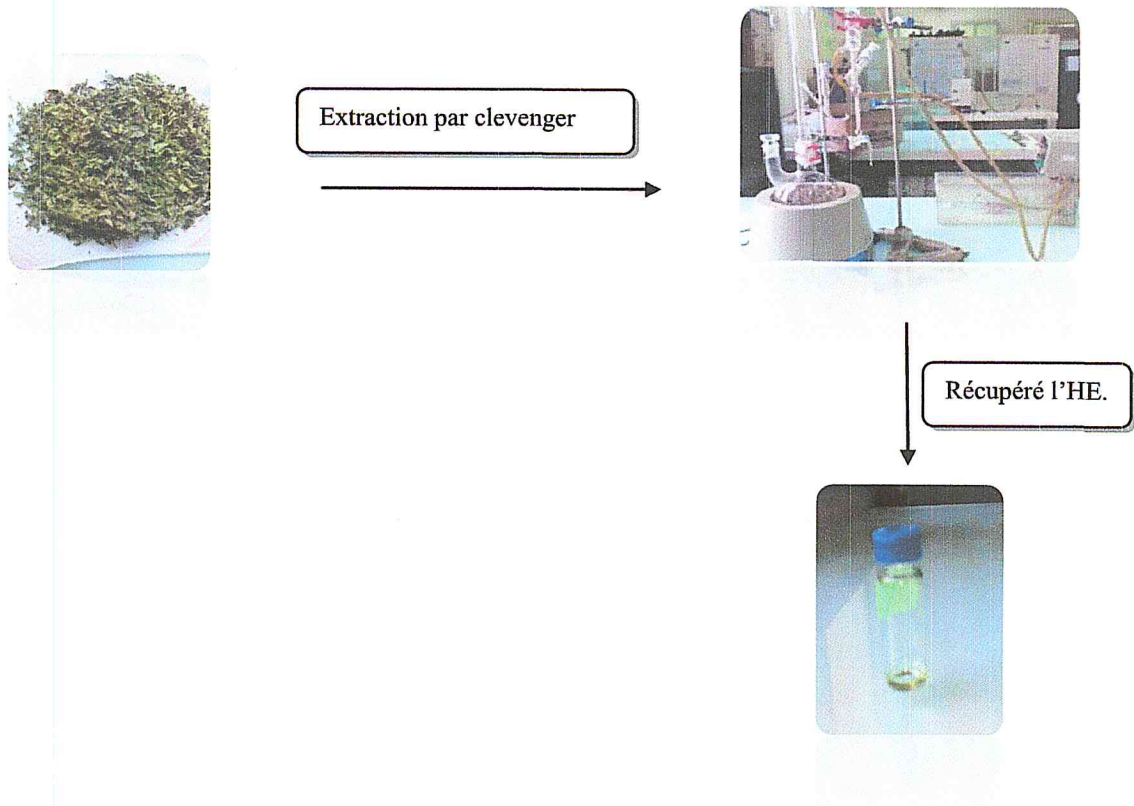
Annexes

Annexes

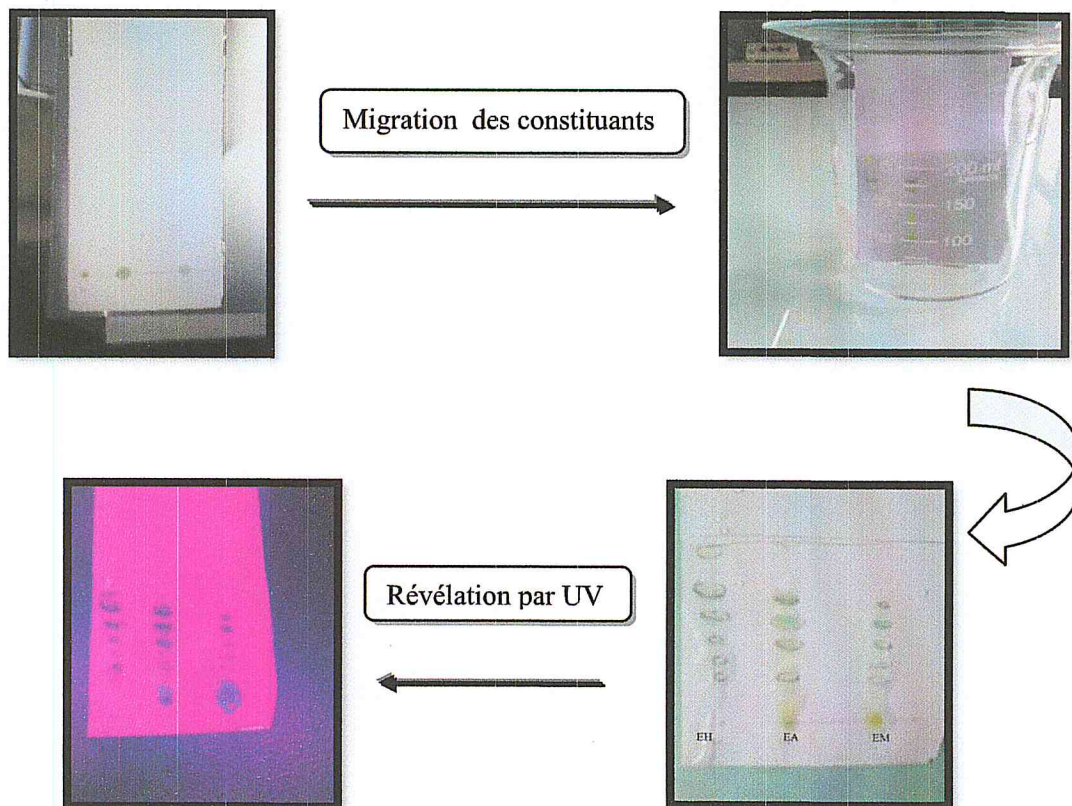
1- Protocole d'extraction des extraits :



2- Protocol d'extraction l'HE



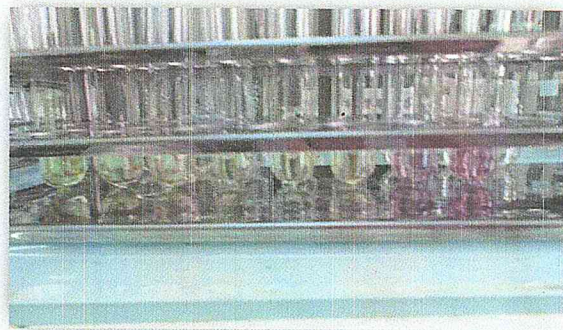
3- Analyse des extraits par CCM :



4- Résultat du dosage des polyphénols

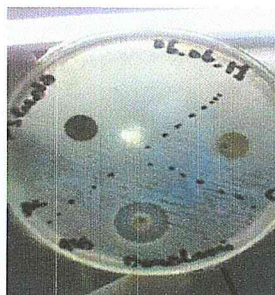


5- Résultat de l'activité anti-oxydante

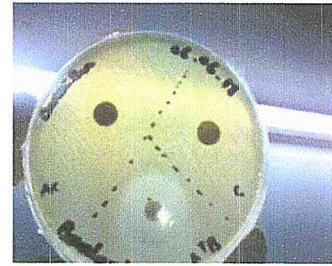
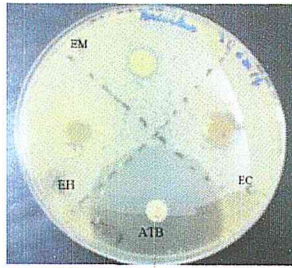
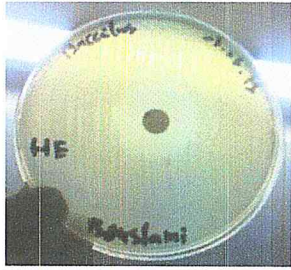


6- Résultats de l'activité antimicrobienne (tel que : M : extrait méthanilique
HE : Huile essentielle, C : extrait chloroformique, AC : extrait acetate d'ethyle,
H : extrait hexanique).

La souche *Pseudomonas aeruginosa*



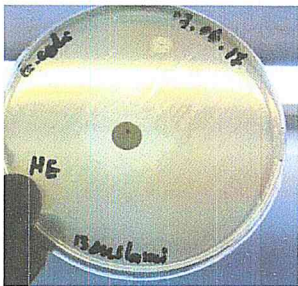
La souche *Basilus cereus*



La souche *Klebsiella pneumoniae*



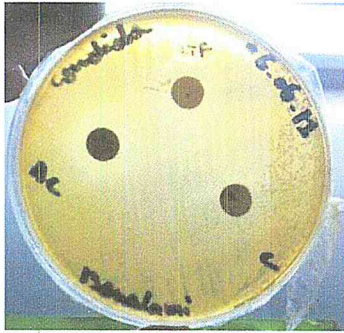
La souche *Escherichia coli*



La souche *Staphylococcus aureus*



La souche *Candida albicans*



La souche *Aspergillus Brasiliensis*

