



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ferhat Abbas Sétif 1



Faculté des Sciences

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Matière

Département : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Présenté par :

RAMDANE Mohamed Mawloud

BELAMRI Zineddine

THÈME

Etude comparative de la composition chimique et de l'activité antioxydante d'une plante médicinale récoltée dans différentes régions d'Algérie.

Devant le jury composé de :

Présidente	Dr. BELAHLOU Hadjer	Université Ferhat Abbas Sétif 1
Encadreur	Dr. MEZACHE Nadjat	Université Ferhat Abbas Sétif 1
Examinatrice	Pr. BOUASLA Souad	Université Ferhat Abbas Sétif 1
Invitée	Dr. MOUSSAOUI Naima	Université Ferhat Abbas Sétif 1

Promotion : 2025/2026

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier à travers ce mémoire toutes les personnes qui m'ont, de près ou de loin, aidé et soutenu dans mon projet et la rédaction de mon mémoire, et notamment les enseignants énumérés ci-dessous.

*Je tiens ainsi pour commencer, à exprimer toute ma gratitude à mon encadreur **Dr. Nadjet MEZACHE** pour m'avoir proposé ce thème, et pour avoir effectué un suivi régulier de projet dispensé de précieux conseils avec toujours beaucoup d'enthousiasme. Ce fut un plaisir de collaborer avec elle. Je la remercie vivement d'avoir dirigé ce travail et veiller à ce qu'il soit mené à terme.*

Je tiens à exprimer également ma gratitude aux membres du jury qui nous font un grand honneur, tout en acceptant de juger ce travail.

*Je tiens à saluer tout particulièrement **Pr. Khalissa CHENITI**, Chef de département des études de base à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, pour son soutien institutionnel déterminant et ses démarches facilitatrices qui ont grandement contribué à la réussite et à l'avancement de ce projet au sein des laboratoires de recherche.*

*Mes sincères remerciements vont au **Pr. Salha DAHAMNA** de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de nous avoir accueillie dans son laboratoire « Plantes médicinales et molécules bioactives » et pour son aide pratique.*

*Mes sincères remerciements vont aussi à **Samira GHEDJATI** Ingénieur de laboratoires de recherche de la Faculté de Science de la Nature et de la Vie.*

Je remercie aussi bien sincèrement toute ma famille et tous mes amis qui m'ont soutenu dans mon projet même, ainsi que mes collègues et amis de l'équipe du laboratoire de chimie pharmaceutique.

Merci à vous tous.

DEDICACES

Je dédie ce mémoire :

À mes très chers parents, qui ont toujours été mon plus grand soutien. Pour leurs sacrifices quotidiens, leurs prières protectrices, leur confiance déterminée et leur amour sans limite.

À mes chères sœurs dont la présence, l'affection et les encouragements ont éclairé chacune des étapes de mon parcours, leur soutien indéfectible et pour tous les moments de réconfort.

À mes enseignants pour le savoir transmis, pour leur présence, l'esprit cultivé et les valeurs académiques partagées.

À mes précieux amis de la promotion de Master 2 « Chimie pharmaceutique » et compagnons de route, qui ont partagé avec moi les joies, les défis, les longues journées passées au laboratoire et les moments saillants de cette aventure universitaire.

RAMDANE Med Mawloud

DEDICACES

Louange à Allah qui m'a accordé la force, la patience, la santé et la détermination nécessaires à l'accomplissement de ce travail. Par sa grâce et sa miséricorde, j'ai pu surmonter les difficultés et mener à bien ce projet.

Je dédie ce mémoire :

À mes chers parents, qui ont toujours été mon plus grand soutien. Pour leurs sacrifices quotidiens, leurs prières constantes, leur confiance inébranlable et leur amour infini, je prie Dieu que ce modeste travail témoigne de tout le respect, l'affection et la gratitude éternelle que je leur dois.

À toute ma famille, mes amis et tous ceux qui ont cru en moi et m'ont encouragé à poursuivre mes rêves.

Belamri Zineddine

Table des matières

Liste des tableaux

Tableau I.1. Exemple de structures des terpénoïdes	6
Tableau I.2. Quelques exemples de structures chimiques des stéroïdes	7
Tableau I.3. Exemples de structures chimiques des alcaloïdes.....	8
Tableau I.4. Exemple de quelques acides phénoliques	9
Tableau I.5. Classification et exemples structuraux des principales familles de flavonoïdes	10
Tableau I.6. Fluorescences des flavonoïdes sous la lumière UV (365 nm)	12
Tableau I.7. Classification générale des coumarines présentes dans les aliments et les plantes.....	13
Tableau I.8. Anthraquinones biologiquement actives présentes dans les espèces végétales	14
Tableau I.9. Exemple de structure chimique de tanins condensés	15
Tableau I.10. Espèces de la famille des Lamiaceae d'intérêt en médecine traditionnelle.....	22
Tableau I.11. Position systématique de la famille des Lamiaceae.....	22
Tableau I.12. Molécules des principales classes de métabolites secondaires de cette famille.....	24
Tableau I.13. Classification et formules chimiques des principales ERO et ERA	28
Tableau II.1. Systèmes de solvants utilisés pour la CCM de gel de silice.....	51
Tableau II.2. La relation entre le R _f et la structure des flavonoïdes	53
Tableau III.1. Criblage phytochimique de la poudre végétale de PS, PB et PD	63
Tableau III.2. Résultats des analyses phytochimiques des échantillons PD, PB et PS	64
Tableau III.3. Valeurs de l'indice de mousse des échantillons PD, PB et PS	66
Tableau III.4. Rendements des extraits par macération dans le mélange MeOH/Eau (7:3 V/V).....	73
Tableau III.5. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits hydrométhanoliques.....	75
Tableau III.6. Pourcentages d'inhibition du DPPH pour les trois extraits et le BHA	78
Tableau III.7. Valeurs des IC ₅₀ et de l'efficacité anti-radicalaire (EA) des extraits	79
Tableau III.8. Pourcentages d'inhibition du cation radical ABTS ^{•+} pour les trois extraits et le BHT	83
Tableau III.9. Valeurs de l'IC ₅₀ et de l'efficacité antiradicalaire (EA) par le test à l'ABTS ^{•+}	85

Liste des figures

Figure I.1. Unité principale isoprénique.....	6
Figure I.2. Noyau stéroïdien tétracyclique	7
Figure I.3. Structure chimique du noyau phénol.....	9
Figure I.4. Structure chimique du 2-phénylchromane.....	10
Figure I.5. Structure chimique du noyau 2H-1-benzopyran-2-one	12
Figure I.6. Exemples de structures chimiques des tanins hydrolysables.....	15
Figure I.7. Exemples de structures chimiques des saponosides	16
Figure I.8. Principales voies de biosynthèse des composés phénoliques chez les végétaux.....	17
Figure I.9. Structures chimiques de la lignine par condensation d'unités phénylpropaniques.....	17
Figure I.10. Structures du phloroglucinol et d'un phlorotannin tétramérique.....	18
Figure I.11. Morphologie florale : (A) <i>Eplingiella cuniloides</i> , (B) <i>Salvia exserta</i> , (C) <i>Lavandula</i>	21
Figure I.12. Carte de répartition géographique mondiale de la famille des Lamiaceae.....	23
Figure I.13. Origines endogènes et exogènes des radicaux libres et leurs caractéristiques.....	27
Figure II.1. Réaction des stérols en milieu acide fort (Liebermann-Burchardt)	40
Figure II.2. La réaction des proto-alcaloïdes en milieu acide.....	41
Figure II.3. Réaction de chélation du perchlorure ferrique avec les phénols.....	43
Figure II.4. La réaction des tanins catéchiques avec le formol en milieu acide	43
Figure II.5. La réaction à la cyanidine avec les flavonoïdes	44
Figure II.6. Réaction des coumarines en milieu basique	45
Figure II.7. Effet de la variation de pH sur les anthocyanes	46
Figure II.8. Réaction des anthraquinones en milieu acide	47
Figure II.9. Schéma général de l'extraction par macération à froid de la plante médicinale étudiée	50
Figure II.10. Principe du spectrophotomètre UV-visible monofaisceau.....	54
Figure II.11. Schéma expérimental du dosage des polyphénols totaux	55
Figure II.12. Complexes stables et labiles entre les flavonoïdes et AlCl ₃	56
Figure II.13. Protocole suivi pour réaliser le dosage des flavonoïdes.....	56
Figure II.14. Réaction chimique de la réduction de la forme radicale du DPPH.....	57
Figure II.15. Protocole du test de l'activité anti-radicalaire au DPPH.....	58
Figure II.16. Mécanisme de formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant	59
Figure II.17. Protocole suivi pour réaliser l'activité du piégeage du cation radical ABTS ^{•+}	60

Figure III.1. CCM des extraits de PS, PB et PD dans les systèmes SI et SII (UV 365 nm)	67
Figure III.2. CCM des extraits hydrométhanologiques des plantes dans le système SI	68
Figure III.3. CCM des extraits hydrométhanologiques des plantes dans le système SII	68
Figure III.4. Complexes stables et labiles entre les flavonoïdes et AlCl ₃	69
Figure III.5. CCM des extraits HMeOH développée dans le système SIII	69
Figure III.6. CCM des extraits HMeOH développée dans le système SII	70
Figure III.7. CCM des extraits HMeOH développée dans le système SIII	70
Figure III.8. CCM des extraits HMeOH développée dans le système SIV	71
Figure III.9. Réaction de l'ammoniac sur les coumarines	71
Figure III.10. CCM des extraits (SI), révélée au réactif de Dragendorff (visible)	72
Figure III.11. CCM des extraits de PS, PB et PD développée dans le système SV	72
Figure III.12. CCM des extraits de PS, PB et PD développée dans le système SVI	73
Figure III.13. Rendements des extraits hydrométhanologiques obtenus par macération	74
Figure III.14. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	74
Figure III.15. Courbe d'étalonnage de la quercétine	75
Figure III.16. Quantité de polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait)	76
Figure III.17. Quantité de flavonoïdes totaux (mg EQ/g d'extrait)	76
Figure III.18. Spectrophotomètre UV-visible utilisé pour la mesure des absorbances	76
Figure III.19. % d'inhibition du DPPH en présence des trois extraits HMeOH	77
Figure III.20. Pourcentage d'inhibition du DPPH en présence du BHA	77
Figure III.21. Résultats du test au DPPH en présence des trois extraits HMeOH	79
Figure III.22. Histogramme de la concentration inhibitrice à 50% (IC ₅₀) pour le DPPH	81
Figure III.23. Corrélation entre les flavonoïdes totaux et l'efficacité anti-radicalaire (DPPH)	81
Figure III.24. % d'inhibition du cation radical ABTS ^{•+} en présence des trois extraits	82
Figure III.25. Pourcentage d'inhibition du cation radical ABTS ^{•+} en présence du BHT	83
Figure III.26. Résultats du test à l'ABTS ^{•+}	84
Figure III.27. Histogramme de la concentration inhibitrice à 50% (IC ₅₀) pour l'ABTS ^{•+}	86
Figure III.28. Corrélation entre les flavonoïdes totaux et l'efficacité anti-radicalaire (ABTS ^{•+})	86

Liste des abréviations

A : Absorbance

ABTS : 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

APG : *Angiosperm Phylogeny Group* (Classification phylogénétique des plantes)

AcOEt : Acétate d'éthyle

AcOH : Acide acétique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

BHT : Butylhydroxytoluène

BHA : Butylhydroxyanisole

CCM : Chromatographie sur couche mince

CHCl₃ : Chloroforme

CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance

4CL : 4-coumarate-CoA ligase

C4H : Cinnamate 4-hydroxylase

DCM : Dichlorométhane

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EA : Efficacité antiradicalaire

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ERA : Espèces Réactives de l'Azote

ET : *Electron Transfer* (Transfert d'un unique électron)

FeCl₃ : Perchlorure ferrique

HCHO : Formol

HCl : Acide chlorhydrique

Hg : Mercure

HMeOH : Extrait hydrométhanolique

H₂O : Eau

H₂SO₄ : Acide sulfurique

H₃PMO₁₂O₄₀ : Phosphomolybdique

H₃PW₁₂O₄₀ : acide phosphotungstique

HAT : *Hydrogen Atom Transfer* (Transfert d'atome d'hydrogène)

I : Intensité

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %

I % : Pourcentage d'inhibition

K₂S₂O₈ : Persulfate de potassium

MeOH : Méthanol

Mg : Magnésium

mg : milligramme

mgEAG /g : mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche

mgEQ /g : mg équivalent quercétine par gramme de matière sèche

mL : millilitre

MS : Spectrométrie de masse

NaOH : Hydroxyde de sodium

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NH₃ : Ammoniaque

nm : Nanomètre

O₂^{•-} : Radical anion superoxyde

OH : Groupement hydroxyle

•OH : Radical hydroxyle

O₂ : Dioxygène

pH : potentiel d'hydrogène

Pt : Platine

PV : Poudre Végétale

PB : Plante de la station de Batna

PD : Plante de la station de Djelfa

PS : Plante de la station de Sétif

PAL : Phénylalanine ammonia-lyase

R : Rendement

R_f : Rapport frontal

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROO• : Radicales Peroxydes

T : Transmittance

UV : Ultra-violet

UV-B : Rayonnements ultraviolets B

Zn : Zinc

μL : Microlitre

Introduction

Depuis l'Antiquité, les plantes médicinales occupent une place importante dans le traitement de nombreuses maladies. Grâce à leurs propriétés thérapeutiques, elles constituent encore aujourd'hui une source précieuse de substances naturelles utilisées dans différents domaines tels que la phytothérapie, l'aromathérapie, les produits nutraceutiques et les cosméceutiques. L'intérêt croissant porté aux plantes médicinales est principalement lié à la richesse de leurs constituants bioactifs ainsi qu'à la diversité structurale de leurs molécules naturelles, reconnues pour leurs nombreuses activités biologiques.

Les propriétés médicinales des plantes sont essentiellement attribuées à la présence de métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et d'autres composés phénoliques [1]. Ces substances jouent un rôle important dans la protection des organismes vivants contre différents stress biologiques et environnementaux. Plusieurs études ont montré que ces composés possèdent des activités antioxydantes capables de neutraliser les radicaux libres impliqués dans le développement de nombreuses pathologies, notamment le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires, le diabète, les inflammations et certains cancers [2].

L'Algérie possède une flore particulièrement riche et diversifiée grâce à la variété de ses conditions climatiques et géographiques [3]. Cette biodiversité végétale représente une source importante de plantes médicinales présentant un grand intérêt phytochimique et pharmacologique. Ainsi, de nombreux travaux de recherche se sont orientés vers l'étude des espèces végétales algériennes afin de valoriser leurs composés bioactifs et leurs propriétés thérapeutiques potentielles [4, 5].

Dans ce contexte, notre travail porte sur l'étude phytochimique comparative et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits hydrométhanoliques d'une plante médicinale appartenant à la famille des Lamiacées, récoltée dans trois régions différentes de l'Algérie, à savoir Sétif, Batna et Djelfa. Cette étude a pour objectif, dans un premier temps, de réaliser des analyses phytochimiques quantitatives à travers le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes, ainsi que des analyses qualitatives permettant de mettre en évidence les principaux groupes de métabolites secondaires présents dans les extraits étudiés. Dans un second temps, l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits permettra de comparer l'influence de l'origine géographique sur le potentiel antioxydant de cette espèce végétale. Cette approche pourrait contribuer, à long terme, à la valorisation de cette plante médicinale ainsi qu'à l'identification des composés bioactifs responsables de ses propriétés biologiques en vue d'éventuelles applications thérapeutiques.

Introduction

Le présent mémoire est organisé en trois chapitres :

- ✓ Le premier chapitre sera consacré à une synthèse bibliographique portant sur les plantes médicinales, les métabolites secondaires et l'intérêt biologique des composés phénoliques et l'activité antioxydante. Un aperçu général sur la famille des Lamiacées ainsi que sa richesse en métabolites secondaires y sera également présenté.
- ✓ Le deuxième chapitre décrira les différentes méthodes expérimentales utilisées pour l'extraction, les analyses phytochimiques qualitatives et quantitatives ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante.
- ✓ le dernier chapitre sera consacré à la présentation et à la discussion des résultats obtenus.
- ✓ A la fin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Références bibliographiques

- [1] Tešević V., Aljančić I., Milosavjević S., Vajs V., Đorđević I., Jadranin M., Menković N., Matevski V., (2014). Secondary metabolites of three endemic *Centaurea* L. species. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 79(11), 1355–1362.
- [2] Hybertson B. M., Gao B., Bose S. K., McCord J. M., (2011). Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects Medicinal* 32(4–6), 234–46.
- [3] Gaussen H., Leroy H. F., (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2^{ème} Ed., Masson, Paris, France, 426 p.
- [4] Mezache N., Derbré S., Akkal S., Laouer H., Séraphin D., Richomme P., (2009). Fast counter current chromatography of a butanolic fraction from *Senecio giganteus* Desf. (Asteraceae). *Natural Product Communication* 4, 1357-1362.
- [5] Mezache N., Derbré S., Laouer H., Richomme P., Séraphin D., Akkal S., (2019). Senecipyrrolidine, an unusual pyrrolidine alkaloid isolated from *Jacobaea gigantea* (Desf.) Pelsner (Asteraceae). *Natural Product Research* 33(15), 2182–2191.

CHAPITRE I

Revue bibliographique

I. Introduction

I.1. Plantes médicinales et phytothérapie

Les plantes médicinales représentent un pilier des soins de santé fondamental et sont employées depuis des siècles pour traiter diverses maladies humaines [1]. Elles sont riches en molécules bioactives telle que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins et les huiles essentielles, qui leur confèrent des propriétés thérapeutiques variées, confirmées par leur rôle dans la production de médicaments modernes comme la morphine ou l'artémisinine.

L'usage des plantes médicinales remonte à près de 7 000 ans et concerne environ 35 000 espèces à l'échelle mondiale, confirmant l'importance de cette biodiversité [2].

En Afrique, plus de 80 % de la population recourt à la médecine traditionnelle pour les soins primaires [3]. Dans la région de Bougous, située au sein du Parc National d'El Kala dans le Nord-Est de l'Algérie, 164 espèces de plantes sauvages ont été recensées. Parmi elles, 48 présentent un usage médicinal, représentant plus de 29 % de la flore inventoriée [4]. Au Niger, une enquête ethnobotanique a identifié 110 espèces réparties dans 47 familles, avec une prédominance des Fabaceae et des Combretaceae ; les feuilles, écorces et racines sont les organes les plus utilisés, préparés surtout en décoction [5].

I.2. Choix des plantes médicinales et principes actifs

Les végétaux se distinguent par leur capacité à produire une grande diversité de substances naturelles, appelées principes actifs, responsables de leurs effets thérapeutiques.

Le choix des plantes médicinales repose sur une double approche, ethnobotanique, basée sur les usages traditionnels transmis au fil des générations, et scientifique, fondée sur l'étude de leur richesse en métabolites secondaires et sur la synergie des composés bioactifs. Ces substances sont extraites de différentes parties de la plante, comme les racines, les feuilles ou les fleurs, par des préparations telles que la décoction, la macération ou l'infusion [6, 7].

II. Métabolites primaires et secondaires

II.1. Métabolites primaires

Le métabolisme primaire regroupe les processus essentiels à la croissance et à la survie des plantes, notamment la synthèse des glucides, lipides, protéines et acides nucléiques. Ces composés universels assurent la production d'énergie et la formation des structures cellulaires [8].

Une partie de ces métabolites est exsudée par les racines, comme les sucres et les acides aminés, jouant un rôle clé dans l'activité microbienne du sol et le cycle de l'azote [9]. D'autres

sont accumulés dans les fruits, où ils contribuent à leur valeur nutritionnelle [10]. Ainsi, les métabolites primaires participent à la fois aux fonctions vitales de la plante et aux interactions écologiques.

II.2. Métabolites secondaires

II.2.1. Origine et rôle

Le concept de métabolite secondaire a été introduit pour désigner des composés présents seulement chez certaines plantes et absents chez d'autres. Cela signifie qu'ils ne participent pas aux fonctions vitales communes à toutes les espèces végétales, contrairement au métabolisme primaire. Par la suite, il a été démontré que ces composés jouent un rôle important dans l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils reflètent en effet la manière dont les végétaux réagissent aux conditions écologiques dans lesquelles ils évoluent.

Le métabolisme secondaire produit des composés non indispensables à la croissance mais essentiels à l'adaptation et à la défense des plantes. Ces métabolites, souvent spécifiques à certains groupes taxonomiques, jouent un rôle majeur dans les activités biologiques des plantes médicinales [11, 12] et protègent contre les herbivores, les agents pathogènes et les stress environnementaux [13]. En raison de ces propriétés biologiques et de leurs effets physiologiques chez l'homme, ils occupent une place importante dans la pharmacopée traditionnelle et moderne [1].

II.2.2. Classification, propriétés chimiques et biologiques

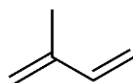
La classification des métabolites secondaires des plantes repose sur leurs propriétés chimiques et les rassemblent en trois groupes de molécules : les terpénoides, les alcaloïdes et les composés phénoliques [14].

II.2.2.1. Terpénoides

- **Définition et activité biologique**

Les terpènes constituent la plus grande classe de métabolites secondaires chez les plantes et sont utilisés depuis l'Antiquité dans la cosmétique, la pharmacie et la nutrition. Ils sont chimiquement dérivés de l'isoprène (C_5H_8) en C_5 , dont les unités répétitives forment des structures linéaires ou cycliques. Cette organisation est à l'origine de la grande diversité des terpènes, tant sur le plan structural que fonctionnel. Selon le nombre d'unités isoprènes qui les composent, ils sont classés en différentes catégories, notamment les monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), triterpènes (C_{30}) et polyterpène. Généralement les

terpénoides sont des stimulants, des anti-inflammatoires, des antifongiques, antitumorales, antiulcéreuses, antirhumatismales et antiasthmatisque [15-17] (Tableau I.1).



Isoprène 1
(Hemiterpène)

Figure I.1 : Unité principale isoprénique.

Tableau I.1 : Exemple de structures chimiques des terpénoides.

Classe	Exemple	Référence
Monoterpènes	Citral <u>2</u>	[18]
Sesquiterpènes	Driménine <u>3</u>	[19]
Diterpènes	Tiglane <u>4</u>	[20]
Triterpènes	Acide oléanolique <u>5</u>	[21]

II.2.2.2. Stéroïdes

▪ Définition et activité biologique

Les stéroïdes sont caractérisés par un noyau tétracyclique. Leur diversité chimique provient des variations dans les chaînes latérales, le degré d'oxydation et la présence de groupements méthyles. Ces composés sont généralement liés à un groupement hydroxyle et sont appelés stérols (**Tableau I.2**). Ils présentent une structure plane et peuvent être glycosylés et sont analogues au cholestérol. Ils jouent un rôle physiologique majeur dans la croissance, le développement et la reproduction des plantes, tout en présentant des propriétés pharmacologiques remarquables, notamment anticancéreuses, immunomodulatrices, anti-inflammatoires et antivirales. Leur importance explique l'intérêt croissant pour leur valorisation dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et nutraceutique [22].

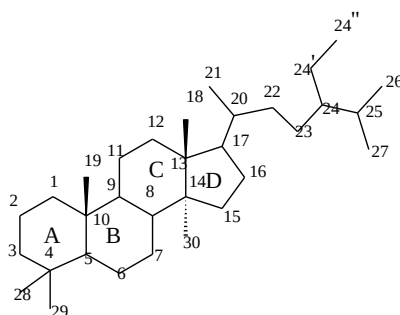


Figure I.2. Noyau stéroïdien tétracyclique **6**.

Tableau I.2 : Quelques exemples de structures chimiques des stéroïdes.

Nom	Structure	Référence
Stigmastérol (Phytostérol) 7		[23]
Ergostérol (Mycostérol / Précurseur de la Vitamine D2) 8		[24]
20-hydroxyecdysone (Ecdystérone) 9		[25]

II.2.2.3. Alcaloïdes

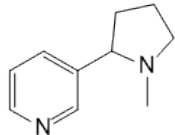
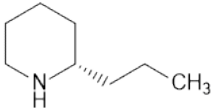
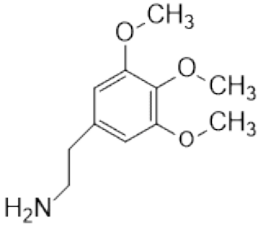
▪ Définition et activité biologique

Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires azotés aux effets pharmacologiques puissants. Ils se distinguent par leurs propriétés sédatives, anticholinergiques, neurosédatives, et antispasmodiques [26].

Généralement, on distingue trois grandes catégories d'alcaloïdes :

- **Alcaloïdes vrais** : ces alcaloïdes correspondants à la classe chimique des dérivés d'acides aminés, possèdent au moins un atome d'azote hétérocyclique et sont pharmacologiquement actif même à faible dose (ex. nicotine).
- **Pseudo-alcaloïdes** : ils présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (ex. coniine).
- **Proto-alcaloïdes** : il s'agit des amines simples dont l'atome d'azote n'est pas inclus dans un cycle hétérocyclique ; ce sont des produits naturels à partir d'acides aminés (ex. mescaline) [27].

Tableau I.3 : Exemples de structures chimiques des alcaloïdes [27].

Classe	Exemple
Alcaloïdes vrais	 Nicotine 10
Pseudo-alcaloïdes	 (S)-coniine 11
Proto-alcaloïdes	 Mescaline 12

II.2.2.4. Composés phénoliques

Les composés phénoliques, ou polyphénols, sont des substances caractéristiques des végétaux, issues de leur métabolisme secondaire [28]. Ils sont présents dans toutes les parties de la plante, des racines jusqu'aux fruits. Leur particularité structurale repose sur un cycle aromatique à six carbones auquel est fixé au moins un groupement hydroxyle. Ce groupement peut être libre ou associé à d'autres fonctions chimiques comme les éthers, les esters ou les formes hétérosidiques [29].

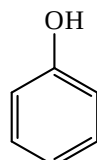


Figure I.3. Structure chimique du noyau phénol **13** [29].

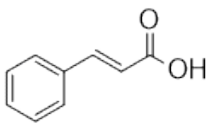
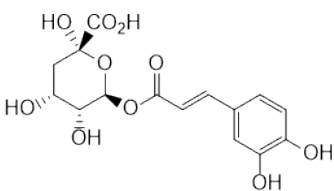
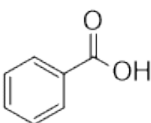
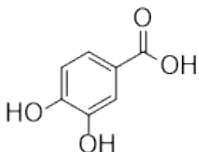
II. 2.2.4.1. Acides phénoliques

▪ Définition et activité biologique

Les acides phénoliques sont largement répandus dans le règne végétal. Sur le plan chimique, ils se caractérisent par la présence d'un noyau aromatique substitué par au moins un groupement hydroxyle et associé à une fonction acide carboxylique.

Ils se divisent en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1) et de l'acide cinnamique (C6-C3) [30]. Les acides phénoliques sont de bons antioxydants et anticancéreux [31].

Tableau I.4 : Exemple de quelques acides phénoliques.

Classe	Structure chimique	Exemple	Référence
Dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3)	 Acide cinnamique 14	 Acide chlorogénique 15	[32]
Dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1)	 Acide benzoïque 16	 Acide protocatéchique 17	[33]

II.2.2.4.2. Flavonoïdes

▪ Définition et activité biologique

Les flavonoïdes sont des composés naturels largement présents dans le règne végétal, Ils participent notamment à la coloration des fleurs et des fruits en leur conférant des teintes variées telles que le brun, le rouge ou le bleu. De nombreuses plantes alimentaires sont reconnues pour leur forte teneur en flavonoïdes [34]. Ils sont connus pour leurs puissantes activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancéreuses, jouant un rôle clé dans la prévention de nombreuses maladies [35]. Ils peuvent aussi agir comme agents pro-oxydants et altérer les protéines, l'ADN et les lipides membranaires [36].

Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane [37].

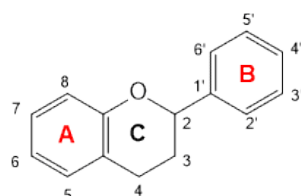
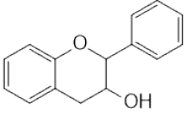
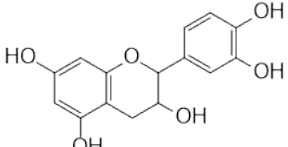
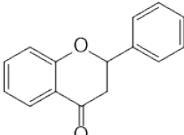
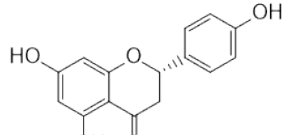
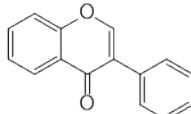
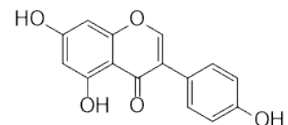
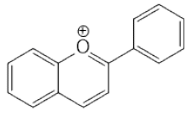
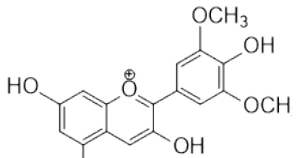


Figure I.4 : Structure chimique de 2-phénylchromane **18**.

Les flavonoïdes est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques, ces molécules ont des structures chimiques variées (**Tableau I.5**) et des caractéristiques propres, principalement leur remarquable fluorescence sous lumière UV (**Tableau I.6**).

Tableau I.5 : Classification et exemples structuraux des principales familles de flavonoïdes.

Classe	Structures chimique	Exemple	Référence
Flavones	 19	 Lutéoline 20	[38]
Flavonols	 21	 Quercétine 22	[39]

Flavan-3-ols	 <u>23</u>	 Epicatechine <u>24</u>	[40]
Flavanones	 <u>25</u>	 Naringénine <u>26</u>	[41]
Isoflavones	 <u>27</u>	 Génistéine <u>28</u>	[42]
Anthocyanidines	 <u>29</u>	 Malvidine <u>30</u>	[43]

▪ Fluorescence sous la lumière UV

L'observation des composés flavonoïdiques sous lumière UV à 365 nm (lampe de Wood) fournit des indications préliminaires sur leur structure chimique. Cette méthode permet notamment de distinguer rapidement les différentes classes de flavonoïdes grâce aux fluorescences caractéristiques qu'ils émettent. Ainsi, certains flavones et flavonols présentent des colorations spécifiques sous UV. Par exemple, l'apigénine (5,7,4'-trihydroxyflavone) se caractérise par une fluorescence noir-violette, tandis que la lutéoline (5,7,3',4'-tétrahydroxyflavone) et les flavonols apparentés présentent généralement une fluorescence jaune. Le **tableau I.6** présente la relation entre la fluorescence observée sous UV et la structure chimique des différents flavonoïdes [44, 45].

Tableau I.6 : Fluorescences des flavonoïdes sous la lumière UV (365 nm).

Fluorescence sous lampe UV	Type de flavonoïdes
Violet - noir	Flavone 5, 6, 7-trihydroxyflavone 5, 7, 8-trihydroxyflavone Flavonol substituée en position 3 (3-OR)
Violet - bleu	Flavone sans 5-OH libre Flavonol 3-OH substituée ou sans 5-OH libre
Jaune ou jaune pale	Flavonol avec 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre.
Orange fluorescent	Isoflavone
Jaune - verre	Aurone

II.2.2.4.3. Coumarines

▪ Définition et activité biologique

Les coumarines constituent une importante classe de métabolites secondaires naturels appartenant au groupe des composés phénoliques. Leur structure chimique repose sur un noyau 2H-1-benzopyran-2-one (ou benzopyrone), résultant de la fusion d'un noyau benzénique avec un cycle α -pyrone [46]. Ces composés sont largement distribués dans le règne végétal et sont particulièrement présents dans plusieurs familles botaniques [47]. Les coumarines sont connues pour leurs multiples activités biologiques. Des études ont montré que ces composés possèdent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancéreuses, ce qui les rend intéressantes pour le domaine pharmaceutique. De même, certaines coumarines ont des propriétés anticoagulantes et antivirales, ce qui renforce encore leur intérêt thérapeutique [48].

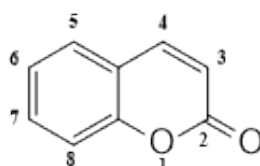
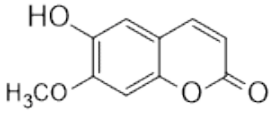
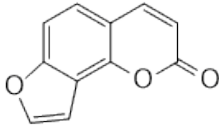
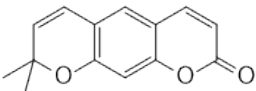
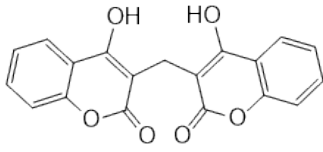
**Figure I.5 :** Structure chimique du noyau 2H-1-benzopyran-2-one 31 [46].

Tableau I.7 : Classification générale des coumarines présentes dans les plantes [47].

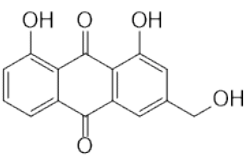
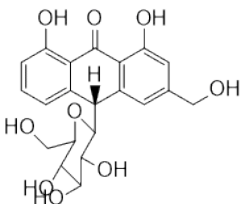
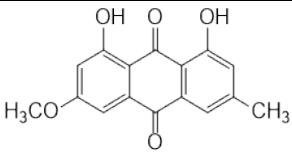
Sous-famille	Exemple de molécule
Coumarines simples	 Scopolétine <u>32</u>
Furanocoumarines	 Angélécine <u>33</u>
Pyranocoumarines	 Xanthylétine <u>34</u>
Dicoumarines	 Dicoumarol <u>35</u>

II.2.2.4.4. Anthraquinones

▪ Définition et activité biologique

Les anthraquinones aussi appelées également anthracenediones, sont des composés appartenant à la famille des quinones et constituent une classe importante de métabolites secondaires [49]. Leur structure chimique est basée sur un noyau anthracène-9,10-dione, formé de trois cycles aromatiques condensés portant deux groupements carbonyle en positions 9 et 10, auxquels peuvent se substituer différents groupes fonctionnels tels que –OH, –CH₃ et –OCH₃ [50]. Les anthraquinones sont une classe importante de composés naturels qui possèdent de multiples activités biologiques. On les connaît surtout pour leurs effets laxatifs, utilisés en thérapeutique. Ils possèdent également des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antioxydantes et anticancéreuses mises en évidence par de nombreuses études [51].

Tableau I.8 : Anthraquinones biologiquement actives présentes dans les espèces végétales [52].

Nom	Exemple	Origine végétale
Aloé-émodyne	 36	<i>Aloe vera, Rheum rhabarbarum</i>
Barbaloin	 37	<i>Aloe vera</i>
Physicon	 38	<i>Rheum officinale</i>

II.2.2.4.5. Tanins

▪ Définition et activité biologique

Les tannins sont des composés polyphénoliques naturels largement répandus dans le règne végétal. Ils se caractérisent par leur capacité à précipiter les protéines et à former des complexes stables avec divers macromolécules. Sur le plan structural, on distingue principalement deux grandes classes les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

Les tanins possèdent de nombreuses activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, antivirales, insecticides, nématocides et anti-inflammatoires. Ces activités sont principalement liées à leur capacité à interagir avec les protéines, les enzymes et certains ions métalliques, ce qui leur confère un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes et un intérêt croissant dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et agronomique [53].

➤ Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters formés entre l'acide gallique ou ses dérivés dimériques (acide digallique, acide ellagique) et un monosaccharide, généralement le glucose.

Ils peuvent être hydrolysés sous l'action d'acides ou d'enzymes telles que la tannase, libérant notamment de l'acide gallique ou de l'acide ellagique. Ces tanins sont principalement rencontrés chez les Angiospermes dicotylédones, notamment dans les sous-classes des Rosidae, Dilleniidae et Hamamelidae. Au niveau cellulaire, ils sont localisés dans les vacuoles ainsi que dans les parois cellulaires [54].

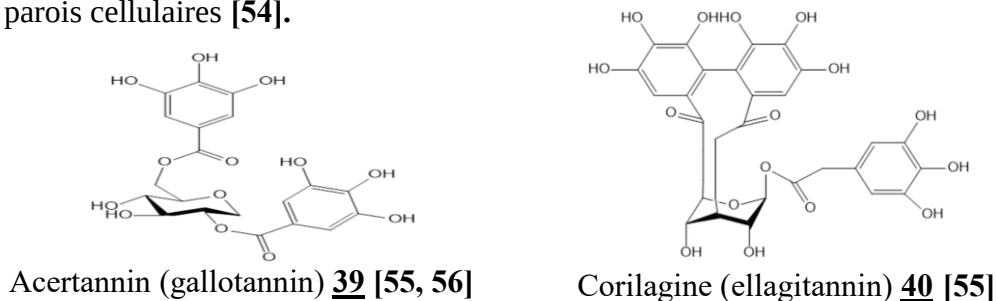
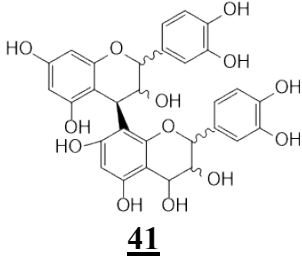
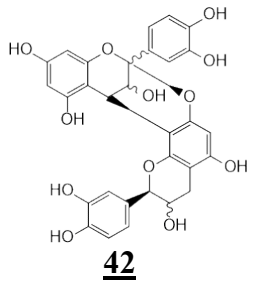


Figure I.6 : Exemples de structures chimiques des tanins hydrolysables.

➤ Tanins condensés

Les tanins condensés, également appelés tanins catéchiques, sont des polymères constitués de polyhydroxyflavan-3-ols. Leurs unités sont généralement reliées entre elles par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent entre les positions C₄ et C₈, et plus rarement entre C₄ et C₆ [57].

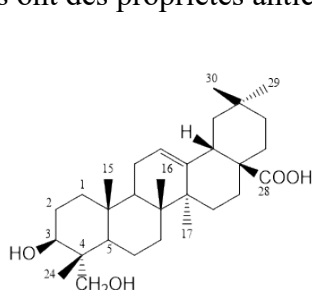
Tableau I.9 : Exemple de structure chimique de tanins condensés [58].

Nom commun	Structure Chimique	Type de Liaison
Procyanidine B2	 41	Type B (Simple)
Proanthocyanidine A1	 42	Type A (Double)

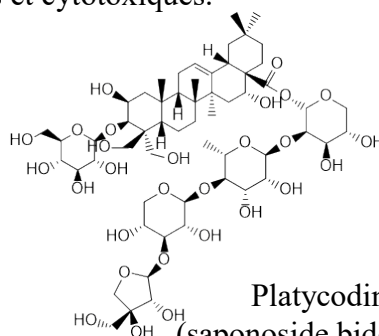
II.2.2.4.6. Saponosides

▪ Définition et activité biologique

Les saponosides sont des hétérosides dérivés de terpènes glycosylés, constitués d'une partie hydrosoluble formée par une ou plusieurs chaînes glucidiques et d'une partie liposoluble appelée aglycone, de nature triterpénique ou stéroïdique [59]. Sur le plan structural, l'aglycone porte généralement un groupement hydroxyle en position 3, le plus souvent en configuration β , qui est le site principal de fixation d'une chaîne osidique. D'autres positions peuvent également être fonctionnalisées, notamment les positions 23 et 24 par des groupements hydroxyle, et les positions 28, 29 et 30 par des fonctions aldéhyde ou acide carboxylique. Selon le nombre de chaînes glucidiques fixées à l'aglycone, on distingue les saponosides monodesmosidiques, qui possèdent une seule chaîne, et les saponosides bidesmosidiques, qui en comportent deux chaînes [60]. Ils ont des propriétés anticancéreuses et cytotoxiques.



Hédéragénine **43**



Platycodine D **44**
(saponoside bidesmosidique)

Figure I.7 : Exemples de structures chimiques des saponosides [60].

II.3. Biosynthèse des composés phénoliques

Chez les plantes, les composés phénoliques sont principalement synthétisés par deux voies métaboliques complémentaires (**Figure I.8**) [61].

La **première est la voie du shikimate** suivie de la voie des phénylpropanoïdes. Tout commence à partir des sucres issus de la photosynthèse. Ces sucres servent à construire une molécule intermédiaire appelée shikimate, qui permet ensuite de former des acides aminés aromatiques comme la phénylalanine. Cette dernière est ensuite transformée par une succession de réactions enzymatiques catalysées par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) et la 4-coumarate-CoA ligase (4CL). Ces étapes permettent la formation de l'acide cinnamique puis du *p*-coumaroyl-CoA, un intermédiaire central du métabolisme phénylpropanoïde. À partir de ce composé, sont biosynthétisés les principaux polyphénols tels que les flavonoïdes, la lignine et les tanins (**Figure I.8**) [62].

La **deuxième est la voie acétate–malonate**. Elle repose sur l'acétyl-CoA, qui est converti en malonyl-CoA. Ces unités servent de précurseurs biosynthétiques pour la formation de structures phénoliques par des réactions de condensation enzymatique. Cette voie participe

notamment à la biosynthèse de certains flavonoïdes, en association avec la voie phénylpropanoïde, ainsi qu'à celle des phlorotannins et d'autres composés phénoliques simples.

Ces deux voies sont reliées et fonctionnent de manière coordonnée. Dans la biosynthèse des flavonoïdes, une fraction de la structure carbonée provient de la voie des phénylpropanoïdes, tandis que l'autre est issue de la voie acétate-malonate, assurant ainsi la diversité structurale des métabolites phénoliques [63].

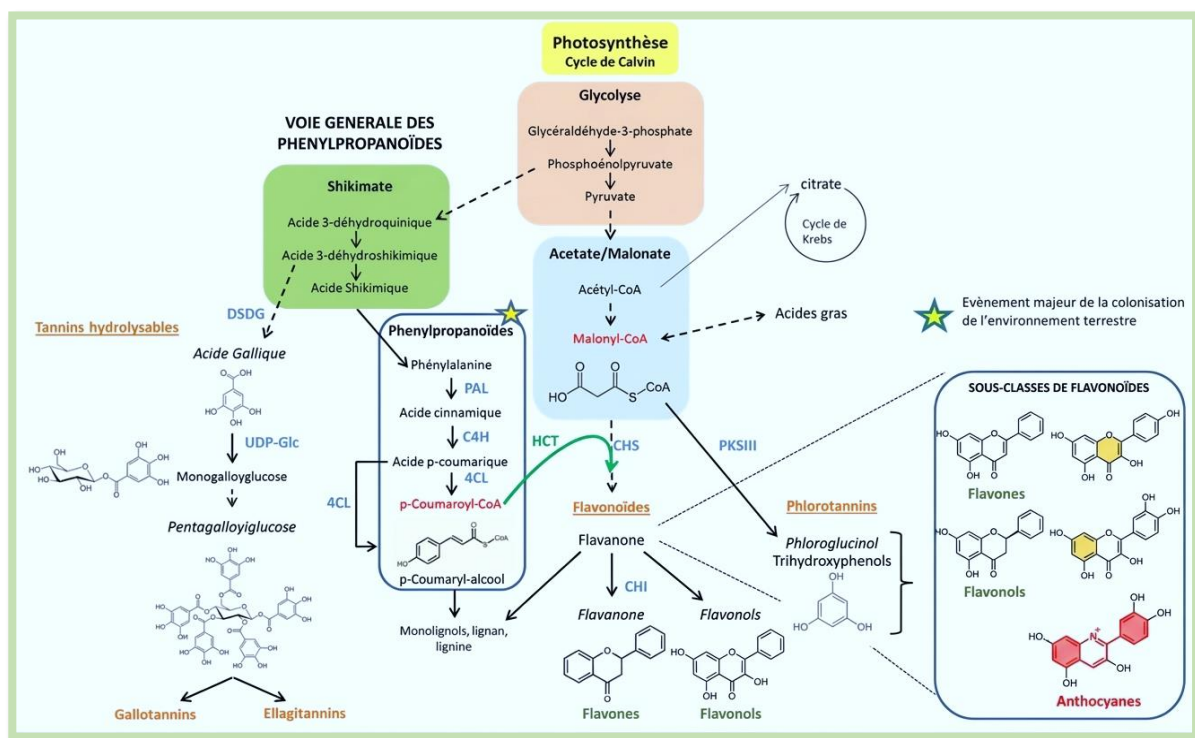


Figure I.8 : Schéma illustrant les principales voies de biosynthèse des composés phénoliques chez les végétaux. Adapté et modifié d'après *Salminen & Karonen (2011)* [61].

Abréviations : **DSDG** : déhydroshikimate déhydrogénase ; **UDP-Glc** : uridine diphosphate glucose ; **PAL** : phénylalanine ammonia-lyase ; **C4H** : cinnamate-4-hydroxylase ; **4CL** : 4-coumaroyl-CoA ligase ; **CHS** : chalcone synthase ; **CHI** : chalcone isomérase ; **PKSIII** : polycétide synthase

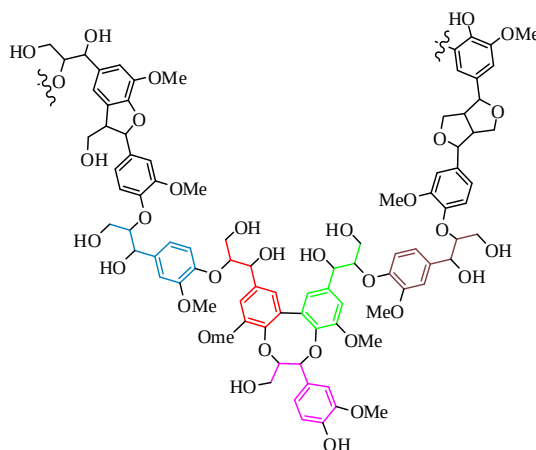


Figure I.9 : Structures chimiques de lignine par condensation d'unité phénylpropaniques [45] [62].

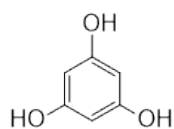
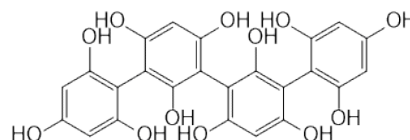
Phloroglucinol **46**Phlorotannin tétramérique **47**

Figure I.10 : Structures du phloroglucinol, unité de base des phlorotannins, et d'un phlorotannin tétramérique constitué de quatre unités de phloroglucinol [63].

II.4. Les composés phénoliques et la santé humaine

Les composés phénoliques sont des composés d'origine végétale largement présents dans l'alimentation, reconnus pour leurs effets protecteurs contre les maladies dégénératives. Leur absorption dépend de leur structure chimique : certains, comme l'acide gallique et les isoflavones, sont facilement assimilés, tandis que d'autres, comme les anthocyanines, présentent une biodisponibilité plus faible.

Ils jouent un rôle important dans la santé humaine grâce à la diversité de leurs activités biologiques. Les polyphénols se distinguent par leur fort pouvoir antioxydant, contribuant à limiter le vieillissement cellulaire et à réduire le risque de maladies chroniques telles que les affections cardiovasculaires, neurodégénératives et certains cancers. Ils possèdent également des effets antiallergiques, anti-inflammatoires, hépatoprotecteurs, antimicrobiens, antiviraux, antibactériens, antitumoraux et vasoprotecteurs [64-66].

Parmi eux, les flavonoïdes et les acides phénoliques jouent un rôle majeur en neutralisant les radicaux libres, ce qui permet de préserver les constituants cellulaires essentiels et de réduire les troubles liés au stress oxydatif, comme le cancer et le diabète. Leur consommation régulière est aussi associée à une action neuroprotectrice, notamment par la préservation de la myéline et la régulation de la lipogenèse face au stress oxydant. Toutefois, leur efficacité reste limitée par leur bioaccessibilité, car le transit gastro-intestinal influence fortement leur stabilité moléculaire et leur potentiel antioxydant final [66].

II.5. Effet des conditions environnementales sur les métabolites secondaires

Les plantes sont constamment en interaction avec leur environnement, et leur croissance, de même que la biosynthèse des métabolites secondaires, sont fortement influencées par divers facteurs écologiques [67]. Ces exigences relèvent de trois grandes catégories : climatiques, édaphiques et géographiques, chaque espèce ayant un profil écologique propre qui détermine ses limites de tolérance et son optimum quant à ces facteurs [68]. Les conditions environnementales influent directement sur la production de métabolites secondaires, ce qui

explique les variations de concentration observées chez des plantes d'une même espèce cultivées dans des régions différentes [69].

Dans leur environnement, les plantes sont soumises à différents types d'influences. On distingue notamment les **facteurs abiotiques**, qui correspondent aux éléments non vivants du milieu tels que la température, la lumière, l'eau, le pH ou les sels minéraux. Ces conditions physiques et chimiques jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement de la plante en influençant la photosynthèse, l'activité enzymatique et la croissance. À côté de ces facteurs, il existe aussi les **facteurs biotiques**, liés aux interactions avec d'autres organismes vivants comme les microorganismes, les insectes ou les autres plantes. Ainsi, le développement et le métabolisme des plantes résultent de l'action combinée des facteurs abiotiques et biotiques.

Parmi les facteurs abiotiques susceptibles d'influencer la biosynthèse des métabolites secondaires chez les plantes, on peut citer les suivants :

II.5.1. Température

La température constitue l'un des principaux facteurs influençant la croissance et la production des plantes médicinales. Des températures trop élevées ou trop basses par rapport à l'optimum (20–25 °C) peuvent réduire l'activité photosynthétique et ralentir la croissance des plantes. Elles sont également susceptibles d'influencer la biosynthèse des métabolites secondaires, avec des effets qui varient selon les espèces végétales.

Par exemple, chez *Panax quinquefolius*, une température élevée augmente la teneur en ginsénosides [70]. À l'inverse, chez *Capsicum annuum*, une baisse de température entraîne une augmentation des composés phénoliques [71].

II.5.2. Stress hydrique

Le déficit hydrique est l'une des causes environnementales majeures pouvant entraîner une augmentation de la concentration de métabolites secondaires chez les plantes médicinales [72]. L'eau est un facteur vital pour les plantes, car elle conditionne leurs activités physiologiques et métaboliques. Le stress hydrique correspond à un manque d'eau qui perturbe leurs fonctions physiologiques, notamment la croissance et la photosynthèse. Il peut aussi modifier la production des métabolites secondaires, avec des effets qui dépendent de l'intensité et de la durée du stress.

Par exemple, chez *Artemisia annua* et *Hypericum brasiliense*, le stress hydrique entraîne une augmentation des composés phénoliques comme l'acide bétulinique, la quercétine et la rutine [73]. À l'inverse, chez la Camomille (*Matricaria chamomilla*), il provoque une

diminution des métabolites secondaires [74]. De même, chez *Glechoma longituba* [75], *Ocimum basilicum* et *Ocimum americanum*, la teneur en flavonoïdes diminue en cas de stress hydrique [76].

II.5.3. La salinité

Le stress salin perturbe le développement des plantes selon deux processus distincts. Dans un premier temps, une forte concentration de sels dans le sol limite la disponibilité de l'eau, compliquant son absorption par les racines. Cet effet osmotique externe affecte rapidement la croissance cellulaire et les processus métaboliques associés. Par la suite, les sels s'accumulent progressivement dans les tissus végétaux jusqu'à atteindre des niveaux toxiques. Contrairement à l'effet osmotique initial, cette toxicité ionique nécessite une accumulation sur le temps long avant d'altérer profondément les fonctions vitales de la plante. Comprendre la biologie moléculaire de ces mécanismes est fondamental pour saisir comment les espèces végétales parviennent à adapter leur métabolisme face à ces contraintes environnementales [77].

II.5.4. Effet du rayonnement solaire

L'interaction entre la plante et son environnement lumineux repose sur un mécanisme fondamental de photoprotection. L'exposition aux rayonnements UV-B induit la biosynthèse de métabolites secondaires spécifiques, tels que les composés phénoliques et les caroténoïdes, qui agissent comme des filtres absorbants [78, 79]. Un changement de paradigme majeur a été opéré dans la littérature récente : alors que les UV-B étaient historiquement perçus uniquement comme un facteur de stress délétère [80, 81]. Ils sont aujourd'hui reconnus pour leurs propriétés régulatrices. À des doses écologiquement représentatives, ces rayonnements agissent comme des signaux moléculaires (éliciteurs) qui déclenchent une restructuration du métabolisme secondaire, favorisant ainsi l'accumulation de molécules à haute valeur antioxydante [82].

III. Famille des Lamiaceae et activités biologiques

III.1. Généralités

Le nom Lamiacées dérive du genre type *Lamium*, issu du grec *laimos* « gorge », en référence à la corolle tubulaire évoquant un gosier ou une bouche béante. Historiquement, cette famille était désignée sous l'appellation Labiées (*Labiatae*), du latin *labium* « lèvre », en allusion à la morphologie bilabiée de leurs fleurs. Ces caractères morphologiques, associés à la tige quadrangulaire, demeurent des critères diagnostiques essentiels pour l'identification de ces taxons [83].

Les Lamiacées constituent une vaste famille de plantes à fleurs de l'ordre des Lamiales, regroupant environ 7200 espèces réparties en près de 236 genres. Elles sont largement répandues dans les régions tempérées et méditerranéennes [84]. Les espèces de cette famille sont des plantes aromatiques utilisées tant en cuisine qu'en parfumerie ou en pharmacie, à l'image de la ballote, du basilic, de la lavande, de la marjolaine et de la mélisse. Cette grande famille, très typique du monde végétal, possède une importance économique majeure en raison de sa richesse en huiles essentielles [85].

Sur le plan morphologique, elles présentent une tige quadrangulaire, des feuilles opposées, simples et dépourvues de stipules, souvent pourvues de glandes sécrétrices responsables des substances aromatiques. Les fleurs, généralement regroupées en verticillastres, sont zygomorphes et possèdent une corolle bilabée. L'androcée compte le plus souvent quatre étamines, et l'ovaire est quadrilobé [85].



Figure I.11 : Exemples de morphologie florale des Lamiaceae ; l'espèce (A) *Eplingiella cuniloides* [86], (B) *Salvia exserta* [87], (C) *Lavandula angustifolia* [88].

III.2. Utilisations traditionnelles et propriétés pharmacologiques des Lamiaceae

Les plantes de la famille des Lamiacées sont utilisées depuis très longtemps dans les médecines traditionnelles de nombreuses régions du monde. Elles sont reconnues pour leur efficacité dans le traitement de nombreux problèmes de santé, tels que les troubles digestifs, les infections, les maladies respiratoires, les inflammations ou encore la cicatrisation des plaies [90, 91]. Ces usages sont étroitement liés à leur richesse en composés bioactifs, notamment les polyphénols et les terpènes.

De nombreuses études scientifiques ont confirmé leurs propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antioxydantes et anti-inflammatoires. Plus récemment, certaines espèces ont également montré un potentiel prometteur dans la prévention des maladies neurodégénératives et dans la lutte contre certains types de cancer [92, 93].

Tableau I.10 : Quelques espèces de la famille des Lamiaceae d'intérêt thérapeutique en médecine traditionnelle [94].

Nom scientifique	Activité pharmacologique
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Insecticide, antinociceptive, antioxydante, diurétique.
<i>Lavetula stoechas</i>	Anticonvulsante, calmante, antispasmodique
<i>Thymus vulgaris</i>	Anti-inflammatoire, fongicide, provoque l'agrégation de plaquettes, antispasmodique.
<i>Satureja khuzistanica Jamzad</i>	Anti hyper lipidémique, antidiabétique, antioxydant
<i>Melissa officinalis L.</i>	Relaxant, activités antimicrobiennes, agglutination du récepteur, antioxydant, anti-inflammatoire, antiviral (AntiHIV), cytotoxique, analgésique.
<i>Nepeta cataria L.</i>	Activités antimicrobiennes et répulsives
<i>Ocimum basilicum L.</i>	Activités antimicrobiennes Antioxydant et anti-inflammatoire
<i>Zhumeria majdae</i>	Anti-nociceptive et anti-inflammatoire

III.3. Position systématique des Lamiaceae

Selon la classification d'APG (Angiosperm Phylogeny Group), la famille Des Lamiaceae appartient à la classification présentée dans le tableau suivant :

Tableau I.11 : Position systématique de la famille des Lamiacées.

Règne	plantae
Embranchement	Phanérogames
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Asterideae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae

III.4. Origine et répartition géographique

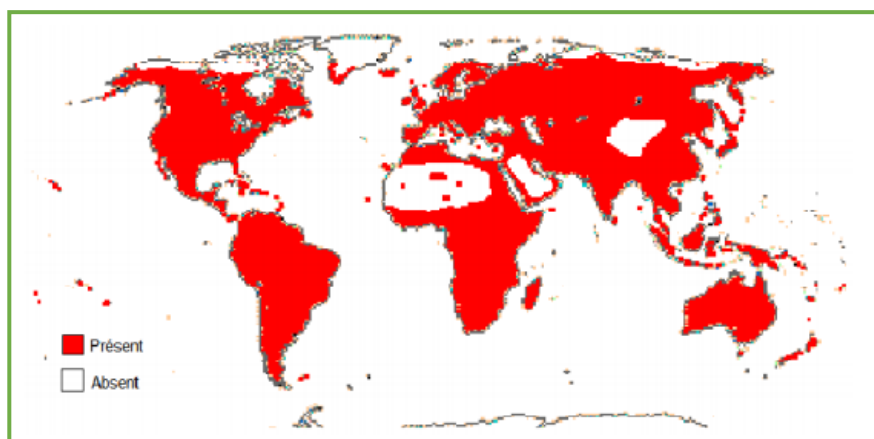


Figure I.12 : Carte de répartition géographique mondiale de la famille des Lamiacées [95].

La famille des Lamiaceae présente une large répartition géographique à travers le monde, colonisant presque tous les écosystèmes terrestres [96]. Bien que le bassin méditerranéen demeure son principal centre historique de diversification, des centres de diversité majeurs sont également identifiés en Asie de l'Est, en Amérique du Sud et dans les régions montagneuses d'Afrique tropicale [97].

En Algérie, la famille des Lamiaceae constitue l'un des piliers de la flore nationale et se distingue par la présence d'un grand nombre d'espèces endémiques. Selon les inventaires botaniques récents, cette famille y est représentée par environ 25 à 30 genres et plus de 150 espèces, parmi celles-ci, on peut citer *Thymus algeriensis* qui sert à soigner les maladies respiratoires, ainsi que la *Marrubium vulgare* qui calme la toux. *Lavandula stoechas* donne sa couleur aux buissons de maquis, la *Salvia algeriensis* est une espèce autochtone, et enfin *La Mentha pulegium* reste un élément indispensable [98].

III.6. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés de la famille

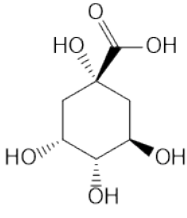
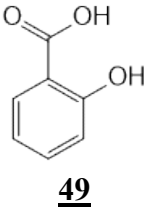
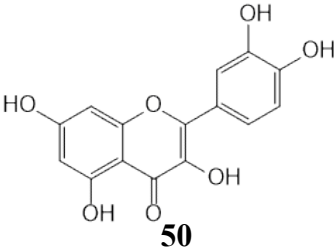
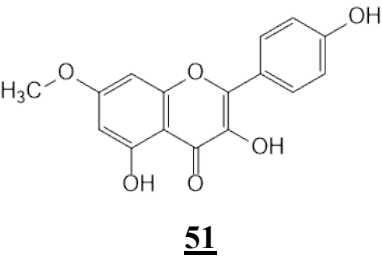
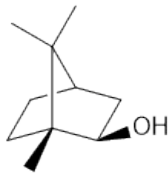
Lamiaceae

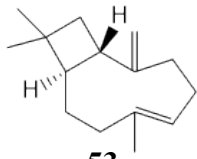
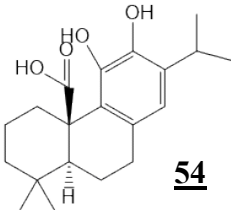
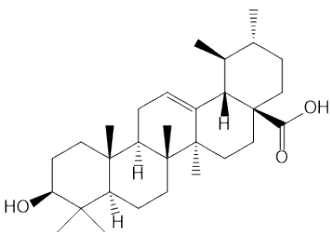
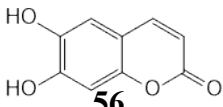
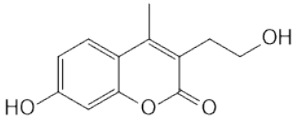
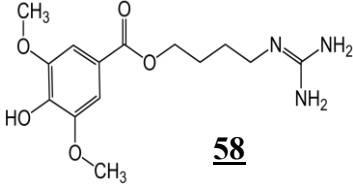
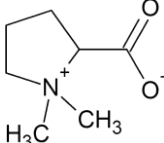
La famille des Lamiaceae fait l'objet de nombreuses investigations scientifiques visant à archiver les registres du passé et à préserver les connaissances sur les usages traditionnels issus d'une longue tradition de médecine populaire [99].

Selon la revue exhaustive de Karageçili et Gülçin (2025), les travaux antérieurs menés sur environ 30 000 taxons documentés [100-103] ont permis d'établir un profil phytochimique complexe. Ce profil est dominé par des phytoconstituants bioactifs majeurs tels que les composés phénoliques [104-106], les terpénoïdes [107, 108] et une quantité substantielle d'huiles volatiles [109].

Ces substances, isolées pour leurs fortes capacités antioxydantes, justifient l'utilisation croissante de cette famille dans les pratiques cliniques actuelles pour le traitement de pathologies lourdes comme le cancer, le diabète et les maladies neurodégénératives [88]. Le **tableau I.12** illustre quelques exemples de molécules des principales classes de métabolites secondaires de cette famille.

Tableau I.12 : Quelques exemples de molécules des principales classes de métabolites secondaires de la famille des Lamiaceae.

Classe Chimique	Molécules isolées	Structures	Références
Acides phénoliques	Acide quinique	 48	[110]
	Acide rosmarinique	 49	
Flavonoïdes	Quercétine	 50	[88]
	Rhamnocitrine	 51	
Monoterpènes (C ₁₀)	Bornéol	 52	[111]

Sesquiterpènes (C₁₅)	Caryophyllène	 53	[112]
Diterpènes (C₂₀)	Acide carnosique	 54	
Triterpènes (C₃₀)	Acide ursolique	 55	
Coumarines	Esculétine	 56	[113, 114]
	Ocimarine	 57	[115]
Alcaloïdes	Léonurine	 58	[116]
	Stachydrine	 59	

IV. Activité antioxydante

L'activité antioxydante (ou capacité antioxydante) se définit comme l'aptitude d'un échantillon à interférer avec les modèles cinétiques de l'autoxydation inhibée et à piéger les espèces oxydantes. L'évaluation chimique de cette activité repose sur deux grands types de mécanismes réactionnels :

- Le transfert d'atome d'hydrogène (HAT) : Ce mécanisme s'appuie sur un schéma réactionnel compétitif où l'antioxydant et le substrat entrent en compétition pour neutraliser les radicaux peroxydes.
- Le transfert d'électron (ET) : Ce mécanisme mesure la capacité de l'antioxydant à réduire un oxydant cible, un processus qui se traduit expérimentalement par un changement de couleur proportionnel à la concentration en antioxydants [117].

IV.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme une rupture de l'équilibre homéostatique entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERO et ERA) et l'efficacité des systèmes de défense antioxydants endogènes chargés de neutraliser leur toxicité [118].

Chez les plantes, le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), comme le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles, et leur neutralisation par les antioxydants. Déclenché par des facteurs environnementaux comme la sécheresse, la salinité ou les températures extrêmes, cet excès d'ERO endommage les lipides, les protéines et les acides nucléiques végétaux, ce qui peut conduire à la mort cellulaire [119].

À long terme, ce phénomène peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement, telles que les cancers ou les maladies cardiovasculaires. Ainsi, afin d'optimiser nos défenses antioxydantes et de diminuer les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides, il convient de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydant chez un individu afin d'y apporter les corrections nécessaires [120].

IV.2. Les radicaux libres

Ils se caractérisent comme des molécules ou des ions instables possédant un électron célibataire sur leur couche externe, ce qui leur confère une forte réactivité et une courte demi-vie, induisant des réactions en chaîne néfastes pour les structures cellulaires [121]. Ils proviennent soit de sources exogènes environnementales (UV, pollution), soit de voies

endogènes comme le métabolisme mitochondrial ou des réactions enzymatiques impliquant le cytochrome P450 [122, 123]. Parmi ces espèces réactives, on distingue principalement les espèces réactives de l'oxygène (ERO), initiées par le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), précurseur du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), lui-même capable de se transformer en radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$), l'entité la plus cytotoxique pour les biomolécules [124, 125]. Parallèlement, les espèces réactives de l'azote (ERA), telles que le monoxyde d'azote, peuvent réagir avec le superoxyde pour générer du peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$), un puissant agent oxydant [126]. Les différentes origines, la classification chimique ainsi que les cibles biologiques majeures de ces entités hautement réactives sont synthétisées et illustrées dans la **figure I.13** ci-dessous [127].

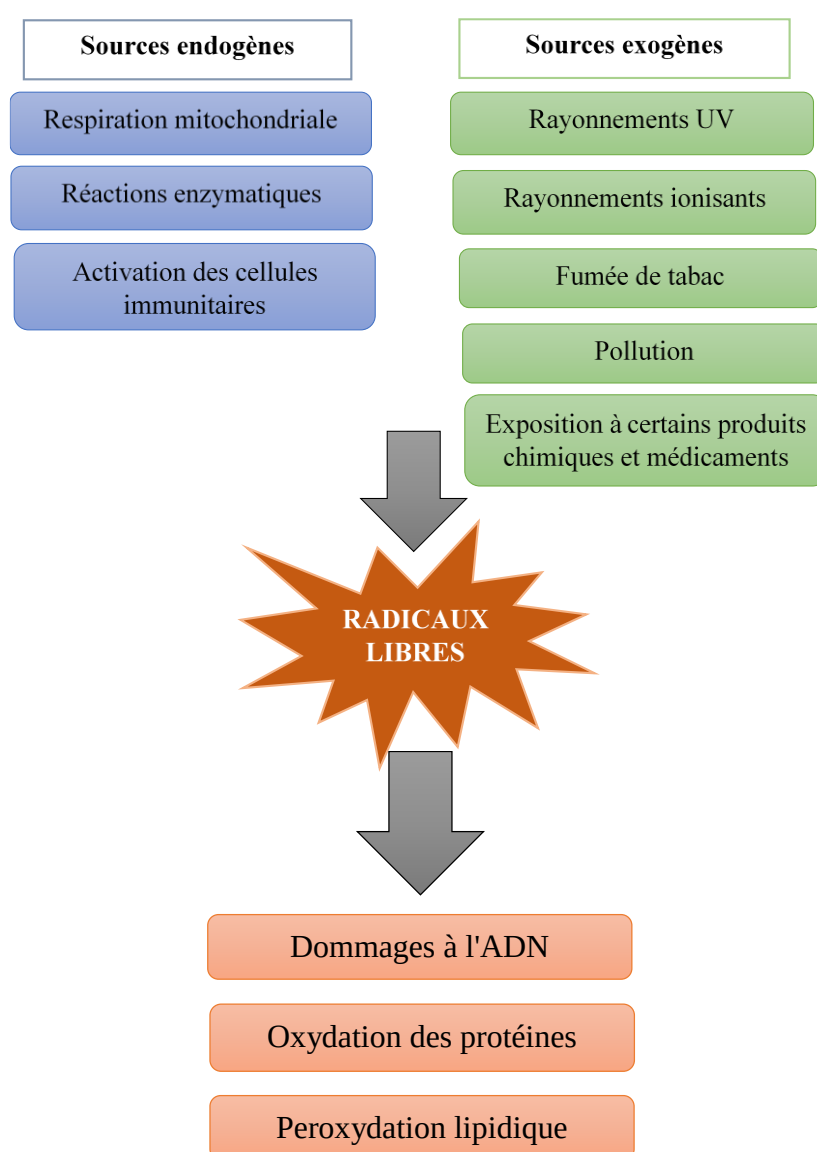


Figure I.13 : Origines endogènes et exogènes des radicaux libres et leurs caractéristiques [127].

IV.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances dotées d'un double rôle protecteur : ils préservent les produits alimentaires et pharmaceutiques de la dégradation oxydative et protègent l'organisme contre les pathologies liées au stress oxydatif. Sur le plan mécanistique, leur action dépend de propriétés cinétiques spécifiques permettant soit de prévenir la formation des radicaux, soit de bloquer les réactions en chaîne (*chain-breaking*), soit d'en accélérer la terminaison (*termination-enhancing*).

De ce fait, l'évaluation *in vitro* de cette capacité (sur des molécules pures ou des extraits végétaux) dépend fortement du milieu de réaction. Elle repose principalement sur deux approches chimiques : les essais de piégeage de radicaux libres (DPPH•, ABTS•⁺) et les mesures du pouvoir réducteur (FRAP, CUPRAC, Folin-Ciocalteu) [128].

Tableau I.13 : Classification et formules chimiques des principales espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) [128].

Espèces radicalaires (Radicaux libres)	Formules	Espèces non-radicalaires	Formules
Radical hydroxyle	HO•	Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Radical superoxyde	O ₂ • ⁻	Oxygène singulet	¹ O ₂
Radical hydroperoxyde	HOO•	Ozone	O ₃
Radical lipidique	L•	Hydroperoxyde lipidique	LOOH
Radical peroxyde lipidique	LOO•	Acide hypochloreux	HOCl
Radical peroxyde	ROO•	Peroxynitrite	ONOO ⁻
Radical alkoxyde lipidique	LO•	Trioxyde de dinitrogène	N ₂ O ₃
Radical dioxyde d'azote	NO ₂ •	Acide nitreux	HNO ₂
Radical monoxyde d'azote	NO•	Chlorure de nitryle	NO ₂ Cl
Cation nitrosyle	NO ⁺	Anion nitroxyde	NO ⁻
Radical thiyle	RS•	Acide peroxynitreux	ONOOH
Radical protéique	P•	Oxyde dialogue (Protoxyde d'azote)	N ₂ O

V. Références bibliographiques

- [1] Latif R., Nawaz T. (2025). Medicinal plants and human health: A comprehensive review of bioactive compounds, therapeutic effects, and applications. *Phytochemistry Reviews*, 24(1), 1–44.
- [2] Hordé P. (2014). Histoire et utilisation des plantes médicinales. Ed. Masson.
- [3] Abdullahi A. (2011). Trends and challenges of traditional medicine in Africa. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(5S), 115–123.
- [4] Lazli A., Beldi M., Ghouri L., Nouri N. E. H. (2019). Étude ethnobotanique et inventaire des plantes médicinales dans la région de Bougous (Parc National d'El Kala, Nord-Est algérien). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 88, 22–43.
- [5] Mounkaila S., Soukaradji B., Morou B., Azia A., Mahamane A., Saadou M. (2017). Inventaire et gestion des plantes médicinales dans quatre localités du Niger. *European Scientific Journal*, 13(24), 498–507.
- [6] Dutertre J.-M. (2011). *Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste*, Thèse de doctorat d'État, Université Bordeaux 2 - Victor Segalen.
- [7] Pelt J.-M. (1980). Les drogues, leur histoire et leurs effets. Éditions Doin.
- [8] Obata T. (2019). Metabolons in plant primary and secondary metabolism. *Phytochemistry Reviews*, 18(6), 1483–1507.
- [9] Franzino T. (2022). *Influence de la nature des métabolites primaires exsudés par les plantes sur la dénitrification dans la rhizosphère*. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1. HAL.
- [10] Menga P., Mundabi-Fal I., Amogu J. J., Ngbolua K. N., Makengo G., Lukoki F. (2023). Étude ethno-botanique, chimique et activité glycophyage *in vitro* de *Synsepalum dulcificum* et *S. stipulatum* en RD Congo. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 11(4), 495–503.
- [11] Hanson J. R. (2003). *Natural products: The secondary metabolites* (Vol. 17, 1st ed., pp. 1–7). Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- [12] Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). Dans B. B. Buchanan, W. Gruissem, & R. L. Jones (Dir.), *Biochemistry and molecular biology of plants*, 1250–1319.

- [13] Salam U., Ullah S., Almilaibary A., El-Serehy H. A. (2023). Plant metabolomics: An overview of the role of primary and secondary metabolites against different environmental stress factors. *Life*, 13(3), 706.
- [14] Latif R., Nawaz T. (2025). Medicinal plants and human health: A comprehensive review of bioactive compounds, therapeutic effects, and applications. *Phytochemistry Reviews*, 25(4), 2299–2342.
- [15] Crozier A., Clifford M. N., Ashihara H. (Eds.). (2006). Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet. Ames, Iowa : Blackwell Publishing Professional.
- [16] Wichtl M., Anton R. (2009). Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique (2nd ed., pp. 38–4). Lavoisier.
- [17] Li C., Zha W., Li W. (2023). Advances in the biosynthesis of terpenoids and their ecological functions in plant resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), Article 11561.
- [18] Behr, A., & Johnen, L. (2009). Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: a critical review. *ChemSusChem: Chemistry & Sustainability Energy & Materials*, 2(12), 1072–1095.
- [19] Huang Y., Valiante V. (2022). Chemical diversity and biosynthesis of drimane-type sesquiterpenes in the fungal kingdom. *ChemBioChem*, 23(17), e202200173.
- [20] Ahmad B., Tian C., Tang J. X., Dumbuya J. S., Li W., Lu J. (2024). Anticancer activities of natural abietic acid. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1392203.
- [21] National Center for Biotechnology Information. (2026). PubChem Compound Summary for CID 10494, *Oleanolic acid*. Retrieved March 26, 2026,
- [22] Obakan Yerlikaya P., Arisan E. D., Mehdizadehtapeh L., Uysal-Onganer P., Coker-Gurkan A. (2023). The use of plant steroids in viral disease treatments: Current status and future perspectives. *European Journal of Biology*, 82(1), 86–94.
- [23] Bakrim S., Benkhaira N., Bourais I., Benali T., Lee L. H., El Omari N., Bouyahya A. (2022). Health benefits and pharmacological properties of stigmasterol. *Antioxidants*, 11(10), Article 1912.
- [24] Liu J., Zeng D., Hu B., Wang W., Hu S., Cifuentes A., Lu W. (2026). Triterpenoids in food and medicine homology substances: Structural diversity, bioactivities, biosynthesis, and strategies for efficient production. *Food Science and Human Wellness*, 15(1), Article 100456.
- [25] Lafont R., Balducci C., Dinan L. (2021). Ecdysteroids. *Encyclopedia*, 1(4), 1267–1302.

- [26] Togola, I., Konaré, M. A., Diakité, M., Diarra, N., Tounkara, F., Sanogo, R., Dembélé, D. (2019). Evaluation de la teneur en alcaloïdes totaux à différents stades de développement de *Datura innoxia* Mill., une plante utilisée dans la médecine traditionnelle au Mali. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 9(2), 200–207.
- [27] Jaber A. (2017). Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes : étude des mécanismes fondamentaux et applications. Thèse de doctorat en chimie analytique, Université d'Angers. Liban.
- [28] Michalska K., Malarza J., Paul W., Stojakowska A., 2019 Natural products from *Tolpis barbata* (L.) Gaertn. (Asteraceae, Cichorieae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 86, 103–922.
- [29] Rajbhar K., Dawda H., Mukundan U. (2015). Polyphenols: Methods of extraction. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 5(1), 1–6.
- [30] Bruneton J. (2008). Acides phénols. In Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales (4th ed., pp. 198–260). Tec & Doc Lavoisier.
- [31] Dai J., Mumper R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313.
- [32] Umbetova A. K., Litvinenko Y. A., Dauletova M. D., Yi L., Yelibayeva N. S., Burasheva G. S., Hua R. (2026). Structural Modification of Phenolic Acids: Modern Approaches to Synthesis and Study of Structure and Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(7), 2977.
- [33] Ștefănescu B. E., Szabo K., Mocan A., Crișan G. (2019). Phenolic compounds from five Ericaceae species leaves and their related bioavailability and health benefits. *Molecules*, 24(11), 2046.
- [34] Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
- [35] Ullah A., Munir S., Badshah S. L., Khan N., Ghani L., Poulson B. G., Emwas A.-H., Jaremko M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, 25(22), 5243.
- [36] Van der Woude H., Alink G.M., Van Rossum B. E. J., Walle K., Van Steeg H., Walle T., Rietjens I. M. C. M. (2005) Formation of Transient Covalent Protein and DNA Adducts by Quercetin in Cells with and without Oxidative Enzyme Activity. *Chemical Research in Toxicology*, 18(12), 1907–1916.
- [37] Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F. and Munné-Bosch S. (2009). *Trends in Plant Science*, 14(3), 125–132.

- [38] Liu, W. N., Shi, J., Fu, Y., & Zhao, X. H. (2019). The stability and activity changes of apigenin and luteolin in human cervical cancer HeLa cells in response to heat treatment and Fe^{2+}/Cu^{2+} addition. *Foods*, 8(8), Article 346.
- [39] Pakade, V., Cukrowska, E., & Chimuka, L. (2013). Metal and flavonol contents of *Moringa oleifera* grown in South Africa. *South African Journal of Science*, 109(3), 1–7.
- [40] Das, A. B., Goud, V. V., & Das, C. (2019). Chapter 9: Phenolic compounds as functional ingredients in beverages. In *Value-added ingredients and enrichments of beverages* (Vol. 14, pp. 285–323). Academic Press.
- [41] Ajdžanović V., Jakovljević V., Milenković D., Konić-Ristić A., Živanović J., Jarić I., & Milošević V. (2015). Positive effects of naringenin on near-surface membrane fluidity in human erythrocytes. *Acta Physiologica Hungarica*, 102(2), 131–136.
- [42] Nakai, S., Fujita, M., & Kamei, Y. (2020). Health promotion effects of soy isoflavones. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 66(6), 502–507.
- [43] Salehi B., Sharifi-Rad J., Cappellini F., Tyagi A. K., El-Baba N. M., Sharopov F., Martorell, M. (2020). The therapeutic potential of anthocyanins: Current approaches based on their molecular mechanism of action. *Frontiers in Pharmacology*, 11, Article 1300.
- [44] Markham, K. R. (1982). Techniques of flavonoid identification (p. 144). Academic Press.
- [45] Harborne J. B., Mabry T. J., Mabry H. (1975). The flavonoids (Tome 1). Academic Press.
- [46] Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., et al. (2016). Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway of the phenylpropanoid metabolism. *Plant Science*, 247, 86–94.
- [47] Kubrak T. P., Makuch-Kocka A., Aebischer D. (2025). Coumarins in anticancer therapy: Mechanisms of action, potential applications and research perspectives. *Pharmaceutics*, 17(5), Article 595.
- [48] Stefanachi A., Leonetti F., Pisani L., Catto M., & Carotti A. (2018). Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. *Molecules*, 23(2), 250.
- [49] Diaz-Muñoz G., Miranda I. L., Sartori S. K., de Rezende D. C., Diaz M. A. (2018). Anthraquinones: An overview. *Studies in Natural Products Chemistry*, 58, 313–338.
- [50] Fouillaud M., Caro Y., Venkatachalam M., Grondin I., Dufossé L. (2018). Anthraquinones. In phenolic compounds in food (pp. 131–172). CRC Press.
- [51] Yang X., Shi Y., Han J., Huang M., Guan J., Hou X. (2020). Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Medicinal Research Reviews*, 40(5), 1881–1911
- [52] Malik E. M., Müller C. E. (2016). Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Medical Research Reviews*, 36(4), 705–748.

- [53] Girard M., Bee G. (2020). Invited review: Tannins as a potential alternative to antibiotics to prevent coliform diarrhea in weaned pigs. *Animal*, 14(1), 95–107.
- [54] Macheix J. J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Edition Les Presse Polytechniques et Universitaires Romandes (p. 1–14). Loussane.
- [55] Okuda T., Ito, H. (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants—hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16(3), 2191–2217.
- [56] Arapitsas P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, 135(3), 1708–1717.
- [57] Gazengel J. M., Orecchoni A. M. (2012). Le préparateur en pharmacie – Guide théorique et pratique, (2nd Ed. pp. 1705). Lavoisier, Paris, France.
- [58] Khanbabae K., van Ree T. (2001). Tannins : Classification and definition. *Natural Product Reports*, 18(6), 641–649.
- [59] Sefrioui M. R., Sbai El Othmani I., Filali H., Derfoufi S., Derraji S., Benmoussa A., Ait Haj Said A. (2021). Evaluation of spermicidal activity of saponosides from *Saponaria officinalis* (Caryophyllaceae), *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae) and *Herniaria glabra* (Caryophyllaceae). *Medicine and Pharmacy Reports*, 94(2), 239–247.
- [60] Bailly C., Vergoten G. (2020). Proposed mechanisms for the extracellular release of PD-L1 by the anticancer saponin platycodin D. *International Immunopharmacology*, 85, Article 106675.
- [61] Salminen J.-P., Karonen M. (2011), Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology*, 25, 325–338.
- [62] Talcott S. U., Howard L. R. (1999). Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2109–2115.
- [63] Heldt H.-W., Piechulla B. (2021). Chapitre 18: Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. In *Plant Biochemistry* (5th ed., pp. 435–451). Academic Press.
- [64] Sarı A., Şahin H., Özsoy N., Özbek Çelik B. (2019). Phenolic compounds and *in vitro* antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activities of *Scorzonera hieraciifolia* Hayek roots. *South African Journal of Botany*, 125, 116–119.
- [65] Senosy, W. R., Kamal, A. M., El-Toumy, S. A., El-Gendy, E. A. (2018). Phenolic compounds and hepatoprotective activity of *Centaurea aegyptiaca* L. on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Advanced Pharmacy Research*, 2(2), 123–132.

- [66] Crozier A., Del Rio D., Clifford M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446–467.
- [67] Brahmi F., Lounis N., Mebarakou S., Guendouze N., Yalaoui-Guellal D., Madani K., Boulekbache-Makhlouf L., Duez, P. (2022). Phenolic variables of Lamiaceae species from Algeria: A review on their chemotaxonomy, ethnomedical uses, and biological activities. *Frontiers in Pharmacology*, 13, Article 911477.
- [68] Flück H. (1955). The influence of environmental factors on the quantity and quality of drugs in medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(1), 361–383.
- [69] Radušienė J., Karpavičienė B., Stanius Ž. (2012). Effect of external and internal factors on essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. *Botanica Lithuanica*, 18(2), 101–108.
- [70] Jochum G. M., Mudge K. W., Thomas R. B. (2007). Elevated temperatures increase leaf senescence and root secondary metabolite concentrations in the understory herb *Panax quinquefolius* (Araliaceae). *American Journal of Botany*, 94(5), 819–826.
- [71] Karatas E., İşlek C., Üstün A. S. (2010). Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Gazi University Journal of Science*, 23(1), 1–6.
- [72] Selmar D., Kleinwächter M. (2013). Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crop Production*, 42, 558–566.
- [73] De Abreu I. N., Mazzafera P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3), 241–248.
- [74] Razmjoo K., Heydarizadeh P., Sabzalian M. R. (2008). Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomilla*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(4), 451–454.
- [75] Zhang L., Wang Q., Guo Q., Chang Q., Zhu Z., Liu L., Xu H. (2012). Growth, physiological characteristics and total flavonoid content of *Glechoma longituba* in response to water stress. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(6), 1015–1024.
- [76] Khalid, K. A. (2006). Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). *International Agrophysics*, 20(4), 289–296.
- [77] Munns R., Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681.
- [78] Treutter D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7, 581–591.

- [79] Caldwell C. R., Britz S. J. (2006). Effect of supplemental ultraviolet radiation on the carotenoid and chlorophyll composition of green house-grown leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 637–644.
- [80] Rozema J., van de Staaij J., Bjorn L. O., Caldwell M. (1997). UV-B as an environmental factor in plant life: Stress and regulation. *Trends in Ecology and Evolution*, 12, 22–28.
- [81] Jansen M. A. K., Gaba V., Greenberg B. M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science*, 3, 131–135.
- [82] Schreiner M., Mewis I., Huyskens-Keil S., Jansen M. A. K., Zrenner R., Winkler J. B., O'Brien N., Krumbein A. (2012). UV-B-Induced Secondary Plant Metabolites - Potential Benefits for Plant and Human Health. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(3), 229–240.
- [83] Couplan F. (2012). Les plantes et leurs noms : Histoires insolites. (p.76). Quae.
- [84] Napoli E., Siracusa L., Ruberto G. (2020). New tricks for old guys: Recent developments in the chemistry, biochemistry, applications and exploitation of selected species from the Lamiaceae Family. *Chemistry & biodiversity*, 17(3), e1900677.
- [85] Guignard J.-L. (2001). Botanique : Systématique moléculaire (12e éd.). Masson.
- [86] Harley R. M., Pastore J. F., Gonçalo S. B., van den Berg C. (2016). Resupinate dimorphy, a novel pollination strategy in two-lipped flowers of *Eplingiella* (Lamiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 31(1), 102–107.
- [87] González-Gallegos J. G., et al. (2020). Richness and distribution of *Salvia* subg. *Calosphaea* (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 181(8), 831–856.
- [88] Karageçili H., Gülçin İ. (2025). The Lamiaceae family plants ethnobotanical properties, ethnopharmacological uses, phytochemical studies and their utilization in public or current clinical practices: A review. *Records of Natural Products*, 19(Special Issue), 466–487.
- [89] Hadjadj K., Benaissa M., Mahammedi M., Ouragh A., Rahmoune A. (2019). L'importance des plantes médicinales pour la population rurale du parc national de Djebel Aïssa (sud-ouest Algérien). *Lejeunia*, 199, 1–21.
- [90] Nieto G. (2017). Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. *Medicines*, 4(3), Article 63.
- [91] Sahinler S. S., Yilmaz B. S., Sarikurkcu C., Tepe B. (2022). The importance of *Lavandula stoechas* L. in pharmacognosy and phytotherapy. *International Journal of Secondary Metabolite*, 9(3), 360–376.
- [92] Uritu C. M., Mihai C. T., Stanciu G. D., et al. (2022). Propriétés thérapeutiques de la famille des Lamiacées : une revue exhaustive. *Molecules*, 27(1), 190.

- [93] Kozics K., Srancikova A., Sedlackova E., *et al.* (2024). *Composés bioactifs de la famille des Lamiacées : avancées récentes concernant les propriétés pharmacologiques et les bienfaits pour la santé. Journal of Herbal Medicine*, 43, 100821.
- [94] Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi Motamed S., Ghorbani, A. (2005). Labiatae family in folk medicine in Iran: From ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2), 63–79.
- [95] Stevens P. F. (2001 onwards). *Angiosperm Phylogeny Website* (Version 14). Missouri Botanical Garden. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- [96] Dupont F., Guignard J. (2015). *Botanique : les familles de plantes* (16e éd., p. 323). Elsevier Masson.
- [97] Zhao F., Chen Y. P., Salmaki Y., Drew B. T., Wilson T. C., Scheen A. C., Xiang C. L. (2021). Classification tribale actualisée des Lamiacées basée sur des données moléculaires phylogénétiques. *BMC Biology*, 19(1), 1–27.
- [98] Miara M. D., Bendif H., Ait Hammou M., Teixidor-Toneu I. (2018). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by nomadic peoples in the Algerian steppe. *Journal of ethnopharmacology*, 219, 248–256.
- [99] Eyong K. O., Krohn K., Hussain H., Folefoc G. N., Nkengfack A. E., Schulz, B., Hu Q. (2005). Newbouldiaquinone and Newbouldiamide: A new naphthoquinone-anthraquinone coupled pigment and a new ceramide from *Newbouldia laevis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(6), 616–619.
- [100] Gülçin İ., Gören A. C., Taslimi P., Alwasel S. H., Kılıç O., Bursal, E. (2020). Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*)-Analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101441.
- [101] Koksall E., Tohma S. H., Kılıç Ö., Alan Y., Aras A., Gulcin İ., Bursal E. (2017). Assessment of antimicrobial and antioxidant activities of *Nepeta trachonitica*-Analysis of its phenolic compounds using HPLC-MS/MS. *Scientia Pharmaceutica*, 85(2), 24.
- [102] Birdane F. M., Cemek M., Birdane Y. O., Gülçin İ., Büyükokuroğlu M. E. (2007). Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 13(4), 607–611
- [103] Tohma H., Altay A., Koksall E., Gören A. C., Gülçin İ. (2019). Measurement of anticancer, antidiabetic and anticholinergic properties of sumac (*Rhus coriaria*)-Analysis of its phenolic compounds by LC MS/MS. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), 1607–1619.

- [104] Sehitoglu H., Han H., Kalin P., Gülçin I., Ozkan A., Aboul-Enein H. Y. (2015). Pistachio (*Pistacia vera* L.) Gum: A potent inhibitor of reactive oxygen species. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 264–269.
- [106] Gülçin İ., Beydemir Ş., Şat İ. G., Küfrevioğlu Ö. İ. (2005). Evaluation of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Acta Alimentaria*, 34(2), 193–202.
- [106] E. Bursal E., Taslimi P., Gören A., Gulcin I. (2020). Assessments of anticholinergic, antidiabetic, antioxidant activities and phenolic content of *Stachys annua*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101711.
- [107] Kızıлтаş H., Ortaakarsu A. B., Bingöl Z., Ertürk A., Gören A. C., Pinar S. M., Gulging İ. (2025). Chemical profiling by LC-HRMS, antioxidant potential, enzyme inhibition, molecular docking and molecular dynamics simulations of *Acantholimon acerosum*. *Journal of Molecular Structure*, 1321(4), 140124.
- [108] Dursun İ., Sağlamtas R., Fettahoğlu K., Zor M., Sinan A., Demirci A., Demir Y., Gulçin İ. (2025). Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of *Tragopogon dubius* and *Tragopogon porrifolium* L. subsp. *longirostris*: Determination of their phytochemical contents by UHPLC-Orbitrap® HRMS analysis. *Food Bioscience*, 63, 105604.
- [109] Sarac A. S., Geyik H., Parlak E. A., Serantoni M. (2007). Electrochemical composite formation of thiophene and N-methylpyrrole polymers on carbon fiber microelectrodes: Morphology, characterization by surface spectroscopy, and electrochemical impedance spectroscopy. *Progress in Organic Coatings*, 59, 28–36.
- [110] Messaouda M. M. (2019). *Etude de l'effet biopesticide de quelques extraits naturels d'une plante appartenant à la famille des Lamiacées*. Doctoral dissertation, Université de Annaba.
- [112] Zhao L., Yang X., Su S., Xie J., Zhang Q., Hou Y., Zhang Y. (2026). The “habitat-phytochemistry-pharmacological effect” nexus: a multidimensional review of ethnomedicinal *Salvia* in China. *Frontiers in Pharmacology*, 17, 1717261.
- [113] Chu C. Y., Tsai Y. Y., Wang C. J., Lin W. L., Tseng T. H. (2001). Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. *European Journal of Pharmacology*, 416(1-2), 25–32.
- [114] Marwat S. K., Khan M. S., Ghulam S., Anwar N., Mustafa G., Usman K. (2011). Phytochemical constituents and pharmacological activities of sweet basil - *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Asian Journal of Chemistry*, 23(9), 3773–3782.
- [115] Singh D., Chaudhuri P. K. (2018). A review on phytochemical and pharmacological properties of Holy basil (*Ocimum sanctum* L.). *Industrial Crops and Products*, 118, 367–382.
- [116] Wojtyniak K., Szymański M., Matławska I. (2013). *Leonurus cardiaca* L. (motherwort): a review of its phytochemistry and pharmacology. *Phytotherapy Research*, 27(8), 1115–1120.

- [117] Huang D., Ou B., Prior R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841–1856.
- [118] Grosso G., Galvano F., Marventano S., Malaguarnera M., Bucolo C., Drago F., Caraci, F. (2014). Omega-3 fatty acids and depression: Scientific evidence and biological mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, Article 313570.
- [119] Xie X., He Z., Chen N., Tang Z., Wang Q., Cai Y. (2019). The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *BioMed Research International*, 2019, Article 9732325.
- [120] Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., Chapelle J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62(10), 628–638.
- [121] Phaniendra A., Jestadi D. B., Periyasamy L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26.
- [122] Chaudhary P., Janmeda P., Docea A. O., Yeskaliyeva B., Abdull Razis A. F., Modu B., Sharifi-Rad J. (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in Chemistry*, 11, Article 1158198.
- [123] Turrens J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335–344.
- [124] Martemucci G., Costagliola C., Mariano M., D'andrea L., Napolitano P., D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78.
- [125] Juan C. A., Pérez de la Lastra J. M., Plou F. J., Pérez-Lebeña E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642
- [126] Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424.
- [127] Chandimali N., Bak S. G., Park E. H., Lim H. J., Won Y. S., Kim E. K., Lee S. J. (2025). Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: A review. *Cell death discovery*, 11(1), 19.
- [128] Gulcin İ. (2025). Antioxidants: a comprehensive review. *Archives of toxicology*, 99(5), 1893-1997.

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal et but de travail

Ce travail porte sur une plante médicinale algérienne appartenant à la famille des Lamiacées. Il a pour objectif de comparer la composition chimique et les activités biologiques de cette plante récoltée dans trois régions différentes d'Algérie, afin d'évaluer l'influence des conditions environnementales sur sa richesse en métabolites secondaires et de contribuer à la valorisation des ressources végétales nationales.

Les objectifs de cette étude reposent sur deux axes complémentaires. Le premier consiste à réaliser une étude phytochimique comparative des échantillons de la plante prélevés dans trois régions différentes d'Algérie. Il s'agit d'identifier leur composition chimique, d'estimer les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux, et d'évaluer leurs activités biologiques, en particulier leur potentiel antioxydant.

Le second axe prolonge naturellement ce travail et s'oriente vers l'isolement et la purification des principaux composés bioactifs, en particulier les polyphénols, à partir des extraits les plus actifs. Il vise également à identifier les molécules responsables des activités biologiques observées.

La plante médicinale a été récoltée en février 2022 dans les régions de Batna (Aurès), Sétif et Djelfa et par la suite identifiée par Dr. DAOUED Nassira de l'Université de Djelfa. Après, les parties aériennes ont ensuite été séchées à l'abri de la lumière et conservées dans de bonnes conditions. Avant leur utilisation, elles ont été broyées afin de servir aux différentes analyses.

II.2. Étude phytochimique qualitative des trois plantes

II.2.1. Approche expérimentale

Le screening phytochimique de la plante a été réalisé sur la partie aérienne des échantillons issus des trois régions étudiées, à savoir Batna (noté PB), Sétif (noté PS) et Djelfa (noté PD), au niveau des laboratoires du Département de Chimie de la Faculté des Sciences de l'Université Ferhat Abbas Sétif-1. Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une analyse phytochimique qualitative visant à identifier les principaux groupes de métabolites secondaires présents dans la poudre végétale obtenue après séchage et broyage.

II.2.2. Stratégie de caractérisation des métabolites secondaires

Afin d'optimiser l'identification des composés et d'assurer une comparaison pertinente entre les trois régions de récolte, les tests phytochimiques ont été organisés selon la nature chimique des métabolites recherchés. Ainsi, les composés ont été regroupés en grandes classes, notamment les composés terpéniques et les stérols, les alcaloïdes et les composés phénoliques.

II.2.2.1. Analyse phytochimique des triterpènes et des stérols

▪ Principe

L'ajout d'acide sulfurique à la solution chloroformique d'un extrait à l'éther éthylique contenant des terpènes et des stérols provoque l'apparition d'un anneau rouge brunâtre ou violacé à l'interface des deux phases. Cette réaction, connue sous le nom de réaction de Liebermann-Burchard, met en évidence la présence des triterpènes et des stérols.

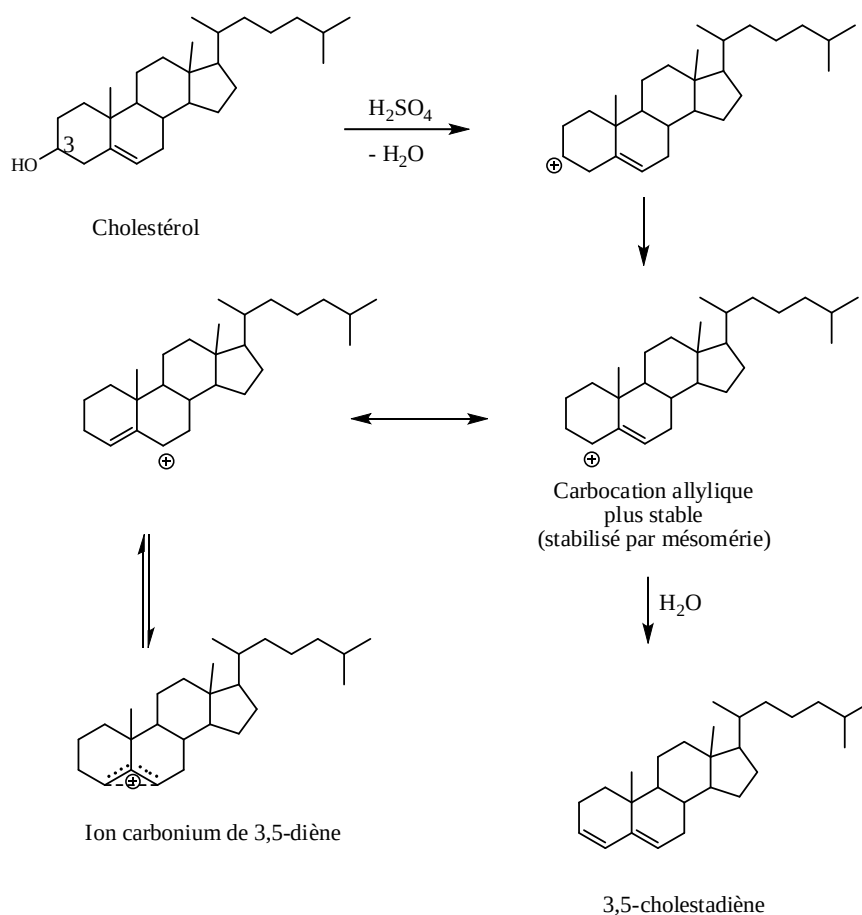


Figure II.1 : Réaction des stérols en milieu acide fort selon la réaction de Liebermann-Borchardt.

▪ Méthode de caractérisation

Chaque poudre végétale (PB, PD et PS), à raison de 1 g, a été mise en contact avec 20 mL d'éther éthylique puis laissée en macération pendant 24 heures. Après filtration, les extraits ont été récupérés et le volume a été ajusté à 20 mL avec de l'éther éthylique [1]. Ensuite, 1 mL de chloroforme a été ajouté à 10 mL de chaque extrait éthéré. La solution obtenue a été répartie dans deux tubes à essai, puis 3 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés délicatement au fond de l'un des tubes, tandis que l'autre a été conservé comme témoin.

- *Principe*

Ces réactions sont réalisées en milieu aqueux acide, condition dans laquelle les alcaloïdes sont le plus solubles, ce qui facilite l'observation de la formation des précipités et améliore la sensibilité du test.

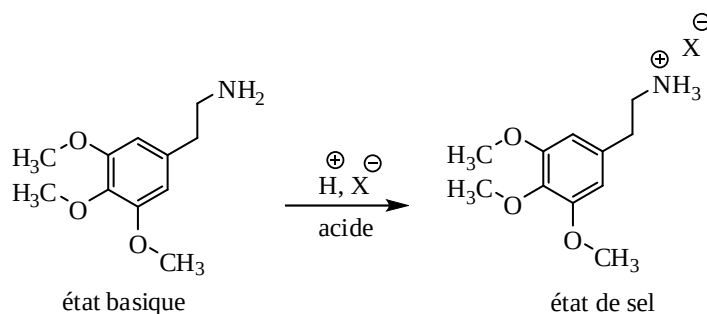


Figure II.2 : La réaction des proto-alcaloïdes en milieu acide.

200 mg de chaque poudre végétale (PD, PB et PS) ont été introduits, puis 10 mL d'acide sulfurique à 10 % ont été ajoutés. Le mélange a été agité pendant 2 minutes avant d'être filtré sur papier filtre. Le filtrat obtenu correspond à une solution aqueuse acide contenant les alcaloïdes totaux [2]. Cette solution a ensuite été répartie dans quatre tubes à essai afin de réaliser les tests de caractérisation. Le premier tube a reçu quelques gouttes du réactif de Dragendorff, le deuxième quelques gouttes du réactif de Bouchardat, le troisième quelques gouttes du réactif de Mayer, tandis que le quatrième a été conservé comme témoin.

La formation des précipités rouge orangé avec le réactif de Dragendorff, brun noirâtre avec le réactif de Bouchardat et jaunâtre avec le réactif de Mayer révèle la présence des alcaloïdes.

II.2.2.3. Analyses phytochimique des saponosides

▪ *Principe*

La mise en évidence des saponosides repose sur leur propriété de former une mousse stable lorsqu'ils sont mis en contact avec l'eau et soumis à une agitation énergique. La présence de cette mousse fine, persistante pendant au moins 10 minutes, constitue un test rapide de détection qualitative.

De plus, leur quantification peut être réalisée par la détermination de l'indice de mousse, qui correspond à la dilution nécessaire pour obtenir, après agitation dans un tube calibré, une hauteur de mousse d'environ 1 cm. Cet indice reflète ainsi la teneur en saponosides de l'échantillon.

▪ *Méthode de caractérisation*

Une masse de 1 g de chaque poudre végétale (PD, PB et PS) a été introduit dans 100 mL d'eau distillée, puis le mélange a été porté à ébullition pendant 30 minutes. Après filtration à chaud, le filtrat a été ajusté à 100 mL afin d'obtenir le décocté. À partir de cette solution, des dilutions successives ont été préparées puis réparties dans 11 tubes calibrés (16 cm/16 mm) destinés aux essais.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Décocté (mL)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Eau distillée (mL)	10	9.5	9	8.5	8	7.5	7	6.5	6	5.5	5

Chaque tube a été bouché avec le doigt et agité en position horizontale pendant 15 secondes. Après, les tubes sont laissés reposer 10 minutes, et la hauteur de mousse est mesurée [3].

▪ *Calcul de l'indice de mousse*

Avant de calculer l'indice de mousse, il est nécessaire de déterminer la concentration correspondant au tube présentant une hauteur de mousse de 1 cm. Cette concentration permet ensuite d'établir la valeur de l'indice de mousse, calculé selon la relation :

$$\text{Indice de mousse} = 1000/X$$

Où X représente le volume (en mL) du décocté contenu dans ce tube.

La présence des saponosides est mise en évidence lorsque l'indice de mousse est supérieur à 100.

Donc

La concentration dans le tube X est =

La concentration initiale de décocté $\times$ la dilution dans le tube =

(Poids de la drogue / V d'eau) $\times$ (V du décocté / V total) = 1g/100 mL $\times$ X mL/10

$$\Rightarrow \text{La concentration dans le tube X} = X/1000$$

II.2.2.4. Analyse phytochimique des composés phénoliques

▪ Principe

Les polyphénols possèdent la capacité de former des complexes colorés avec les sels de métaux lourds. Leur mise en évidence repose sur l'apparition d'une coloration foncée ou la formation d'un précipité noirâtre intense après addition de perchlorure ferrique à l'extrait végétal étudié.

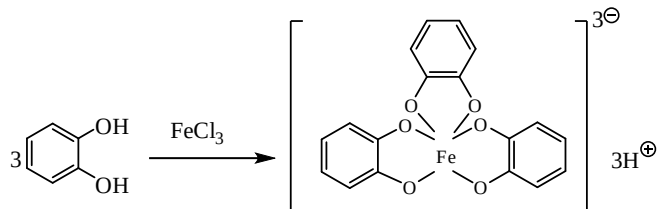


Figure II.3 : Réaction de chélation de perchlorure ferrique avec les phénols.

II.2.2.4.1. Mise en évidence des polyphénols

▪ Méthode de caractérisation

Afin de mettre en évidence la présence des polyphénols dans la poudre végétale issue des trois régions étudiées, 200 mg de chaque poudre végétale (PD, PB et PS) ont été introduits dans un tube à essai. Un mélange de 2 mL d'eau distillée et de 6 mL d'acétone a été ajouté, puis l'ensemble a été chauffé au bain-marie à 60 °C pendant 5 minutes avec agitation discontinue afin de limiter l'évaporation du solvant. Le mélange obtenu a été filtré et le filtrat récupéré. Une partie de ce filtrat a ensuite été répartie dans deux tubes à essai, l'un servant de témoin et l'autre recevant quelques gouttes de perchlorure ferrique à 10 %. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre dans le tube test, en comparaison avec le témoin, confirme la présence des polyphénols [4].

II.2.2.4.2. Mise en évidence des tanins

🌈 Tanins catéchiques

▪ Principe

Seuls les tannins catéchiques se précipitent de leurs solutions par le formol en milieu chlorhydrique.

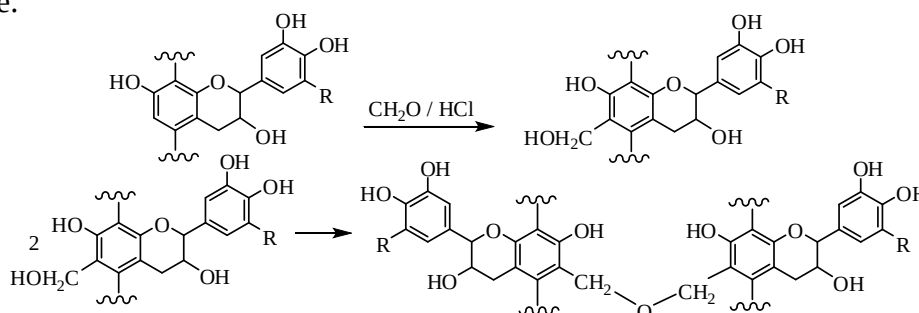


Figure II.4 : La réaction des tanins catéchiques avec le formol en milieu acide.

▪ *Méthode de caractérisation*

10 mL de réactif de Stiasny (HCHO 30%/ HCl: 2v/1v) sont ajoutés aux trois filtrats polyphénoliques et portés au bain marie à 80°C. Les tanins catéchiques sont caractérisés par l'apparition de flocons blancs [1].

🌈 Tanins galliques

▪ *Méthode de caractérisation*

Les filtrats obtenus ont été saturé par 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de solution de perchlorure ferrique à 10 % sont ajoutées. L'apparition d'une teinte bleu noire révèle la présence de tanins galliques [1].

II.2.2.4.3. Mise en évidence des flavonoïdes

▪ *Principe*

Une réaction plus ou moins spécifique, dite réaction à la cyanidine est utilisée. En présence d'hydrogène produit par l'action de l'acide chlorhydrique sur du magnésium (ou du zinc), plusieurs groupes de flavonoïdes développent des colorations variées allant du rouge orangé au violet (rouge ou rouge-orange avec du zinc) (**Figure II.5**).

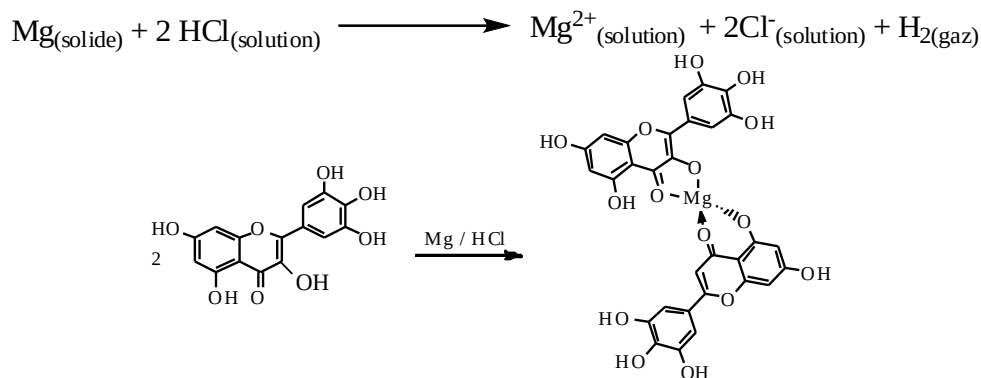


Figure II.5 : La réaction à la cyanidine avec les flavonoïdes.

▪ *Méthode de caractérisation*

300 mg de chaque poudre végétale (PD, PB et PS) ont été introduits dans un tube à essais avec environ 5 mL d'éthanol à 70° et portés au bain- marie à 65°C pendant 15 min puis filtrés à chaud dans un tube à essais (solution extractive alcoolique) [5]. Le filtrat obtenu a été ensuite utilisé pour la réaction de caractérisation : 1 ml d'eau distillée, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et 40 mg de zinc (ou une rognure de magnésium) sont ajoutés au filtrat alcoolique, puis les tubes ont été plongés dans un b cher remplie d'eau froide (pour éviter l'élévation de la température).

II.2.2.4.4. Mise en évidence des coumarines

▪ Principe

Les coumarines ont été mises en évidence par la réaction sur le cycle lactonique en milieu basique, où l'ouverture de ce cycle entraîne la formation d'un dérivé ionisé responsable d'un changement de comportement optique de la solution, observé après basification du milieu.

Ce phénomène se traduit généralement par une décoloration en milieu basique suivie d'une réapparition de la couleur ou d'une précipitation après acidification.

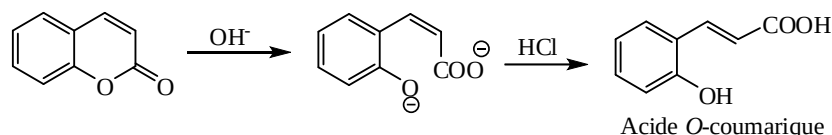


Figure II.6 : Réaction des coumarines en milieu basique.

▪ Méthode de caractérisation

1 g de chaque poudre (PD, PB et PS) a été macéré dans 10 mL d'éthanol pendant 24h. Après filtration, 2 mL de la solution extractive éthanolique ont été introduits dans deux tubes à essai. À partir de cette solution, la mise en évidence des coumarines a été réalisée en traitant l'un des tubes avec 0,5 mL de NaOH à 10% est additionné ; le deuxième tube a servi de témoin, puis les deux tubes sont chauffés au bain-marie jusqu'à ébullition. Après refroidissement, 4 mL d'eau distillée sont rajoutés dans chaque tube à essai.

Si le liquide du tube à essai dans lequel la solution alcaline ajoutée est transparente ou plus transparente par rapport au liquide du tube à essai témoin (sans solution alcaline), alors la réaction révèle la présence des coumarines. Cela peut être affirmé en acidifiant la solution transparente avec quelques gouttes de HCl concentré, ce qui conduit à la formation d'un précipité (ou d'un trouble) et la solution perd sa coloration jaune [5].

II.2.2.4.5. Mise en évidence des anthocyanes

▪ Principe

La détection des anthocyanes repose sur leur sensibilité marquée aux variations du pH à température ambiante. Lorsqu'un extrait contenant ces pigments est placé en milieu acide, la solution prend une teinte rouge plus intense. En augmentant progressivement le pH par addition de soude diluée ou d'ammoniaque, les anthocyanes subissent des transformations structurales conduisant à des formes quinoniques, puis à des structures de type chalcones, responsables de teintes jaunes. Lorsque le milieu est de nouveau acidifié, ces transformations sont réversibles et la coloration rouge réapparaît progressivement, généralement avec une intensité plus faible qu'à l'état initial. (**Figure II.7**).

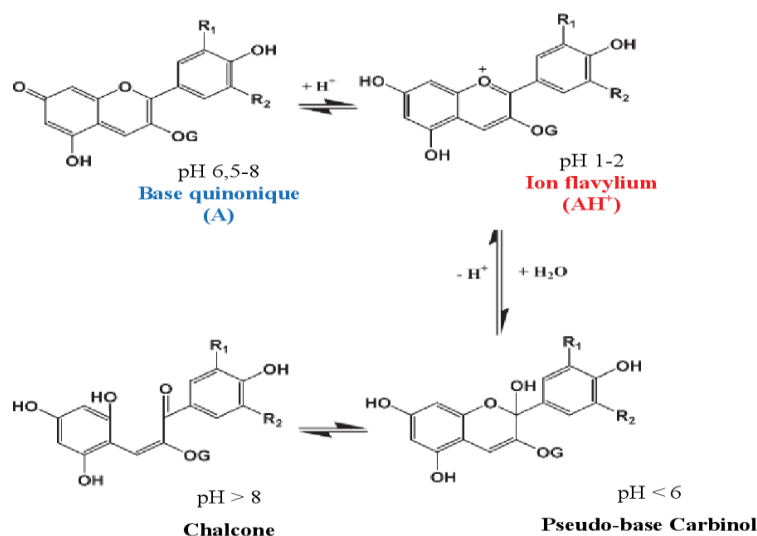


Figure II.7 : Effet de variation de pH sur les anthocyanes.

▪ *Méthode de caractérisation*

5 g de chaque poudre (PD, PB et PS) ont été infusés dans 100 mL d'eau bouillante pendant 15 min puis filtrés. À partir de cet infusé, 2 mL ont été introduits dans un tube à essai avec 2 mL de HCl (2N) puis quelques gouttes d'ammoniac sont ajoutées.

La présence des anthocyanes est révélée par la coloration rouge qui s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé puis jaune en milieu basique [6].

II.2.2.4.6. Mise en évidence des anthraquinones

▪ *Principe*

Les anthraquinones peuvent exister sous forme de génine libre ou sous forme glycosylée. La mise en évidence des dérivés anthracéniques repose sur la réaction de Bornträger. Cette réaction est réalisée en présence d'une solution diluée d'ammoniaque, permettant leur détection.

🌈 Anthraquinones libres

▪ *Méthode de caractérisation*

1 g de chaque poudre végétale (PD, PB et PS) a été introduit dans un tube à essais avec 10 mL de chloroforme et chauffer au bain-marie à 50°C max pendant 3 min, en agitant de temps en temps pour éviter une trop forte évaporation du chloroforme. Le surnageant a été filtré à chaud et complété à 10 mL avec du chloroforme. À partir de cet extrait chloroformique, 1 mL a été prélevé et mélangé avec 1 mL d'ammoniac dilué à 50 %, puis agité. L'apparition d'une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

Anthraquinones combinés : O-hétérosides

La mise en évidence des anthraquinones glycosylées a été réalisée avec modification de la méthode d'extraction [5].

▪ Méthode de caractérisation

1 g de la poudre végétale de chaque poudre végétale (PD, PB et PS) a été macéré dans 10 mL du mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau : 80 : 20 V/V) pendant 24h. Après filtration, la solution extractive hydrométhanolique a été introduite dans deux tubes à essai, dont l'un a été évaporé à sec tandis que le second a servi de témoin. L'extrait brut a été trituré dans 5 mL d'acide chlorhydrique au 1/5 ensuite versé dans un tube à essais et porté au bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement, il a été extrait par 20 mL de chloroforme. Le volume de la fraction chloroformique a été réduit à la moitié puis 0,5 ml de l'ammoniac dilué à 50% a été ajouté. Une coloration rouge plus ou moins intense de la phase aqueuse alcaline indique la présence d'anthraquinones [5].

La réaction proposée pour la mise en évidence des anthraquinones glycosylées est la suivante :

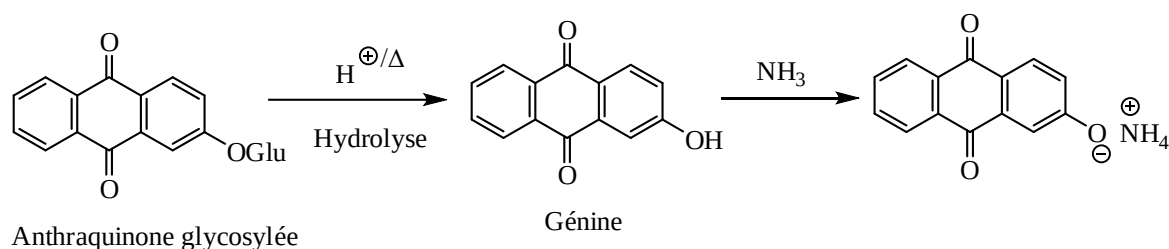


Figure II.8 : Réaction des anthraquinones en milieu acide.

II.3. Méthodologie d'extraction

II.3.1. Extraction des composés phénoliques

Avant toute analyse quantitative, une étape d'extraction est nécessaire afin de solubiliser les composés d'intérêt présents dans la matière végétale. Le choix de la méthode dépend de la nature des métabolites ciblés ainsi que de plusieurs paramètres expérimentaux, tels que le pH, la température, le rapport solide/solvant, la durée d'extraction et le nombre d'extractions successives.

Dans le cadre de cette étude, l'analyse des composés phénoliques et polyphénoliques repose principalement sur des procédés d'extraction de type solide-liquide et liquide-liquide. Ces méthodes sont largement utilisées en raison de leur simplicité et de leur efficacité.

Le choix du solvant est un facteur déterminant. Les solvants polaires, tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et le n-butanol, sont couramment employés pour extraire les composés phénoliques. Toutefois, pour les composés très polaires comme les acides phénoliques (benzoïque et cinnamique) et les polyphénols glycosylés, les solvants organiques purs sont souvent insuffisants. Dans ce cas, des mélanges de solvants, notamment alcool-eau ou acétone-eau, sont privilégiés afin d'améliorer l'efficacité d'extraction [7].

En revanche, les solvants moins polaires, tels que le dichlorométhane, le chloroforme et l'hexane, permettent d'extraire les composés apolaires comme les terpènes et les stérols, ainsi que certains composés de polarité intermédiaire comme les sesquiterpènes lactones. Ils sont également utilisés pour éliminer des substances indésirables telles que la chlorophylle et les cires.

Afin d'optimiser le rendement, les extractions sont généralement répétées plusieurs fois, puis les extraits obtenus sont regroupés. Parmi les principales techniques d'extraction solide-liquide utilisées figurent l'infusion, la macération, la décoction et la lixiviation, dont le choix dépend des propriétés des composés étudiés (*Annexe I.1*).

- ✚ L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Le terme désigne aussi les boissons préparées par cette méthode, comme les tisanes, le thé par exemple.
- ✚ La macération est une méthode d'extraction liquide-solide similaire à l'infusion qui s'effectue à température ambiante. Elle est généralement utilisée pour l'extraction de composés sensibles à la chaleur.
- ✚ La décoction consiste à réaliser l'extraction à température d'ébullition du solvant. Cette opération s'oppose à la macération dans laquelle le solvant d'extraction est froid.
- ✚ Lixiviation : c'est un procédé d'extraction qui consiste à épuiser une substance par le passage de solvants qui entraînent tout ce qui est soluble à travers une poudre [8]. La lixiviation peut être réalisée manuellement (solvant versé à la main), ou de manière continue et automatique, notamment à l'aide d'un extracteur de type Soxhlet, dans lequel le solvant circule en circuit fermé et permet une extraction répétée des composés solubles (*Annexe I.1*).

II.3.2. Préparation des extraits hydrométhanoliques

La préparation d'un extrait de plante comporte plusieurs étapes qui varient selon l'objectif de l'étude. Dans ce travail, l'objectif principal est l'étude des composés phénoliques. La poudre végétale est extraite à l'aide d'un solvant hydroalcoolique constitué de **méthanol et d'eau (70:30 V/V)** en utilisant la macération à température ambiante pour les différentes parties aériennes des trois plantes étudiées.

Par la suite, une comparaison est réalisée entre les compositions phytochimiques ainsi que les teneurs en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux des extraits hydrométhanoliques, en parallèle avec l'évaluation de leurs activités antioxydantes.

L'étude vise également à établir une corrélation entre la teneur en polyphénols et le pouvoir antiradicalaire de ces espèces végétales. Enfin, l'extrait hydrométhanolique le plus actif et le plus rentable est sélectionné afin d'identifier les molécules responsables de son activité antioxydante.

La méthode de Markham (1982) [9] a été suivie pour la préparation des extraits hydroalcooliques (hydrométhanoliques, HMeOH). Ainsi, une prise de 20 g de chaque poudre végétale de la partie aérienne des trois plantes (PD, PB et PS) a été macérée dans 200 mL du mélange hydroalcooliques ; Méthanol/Eau : 70:30 V/V pendant 24 heures puis filtrer.

Le résidu obtenu a été repris pour une deuxième et troisième fois d'extraction avec le même volume du mélange hydrométhanolique et laisser macérer pendant 24 h. Les trois filtrats ont été réunis et concentrés sous pression réduite à 45°C utilisant un rota-vapeur (Büchi, Allemagne) (**Figure II.9**). Les extraits secs hydrométhanoliques, obtenus étaient conservés au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

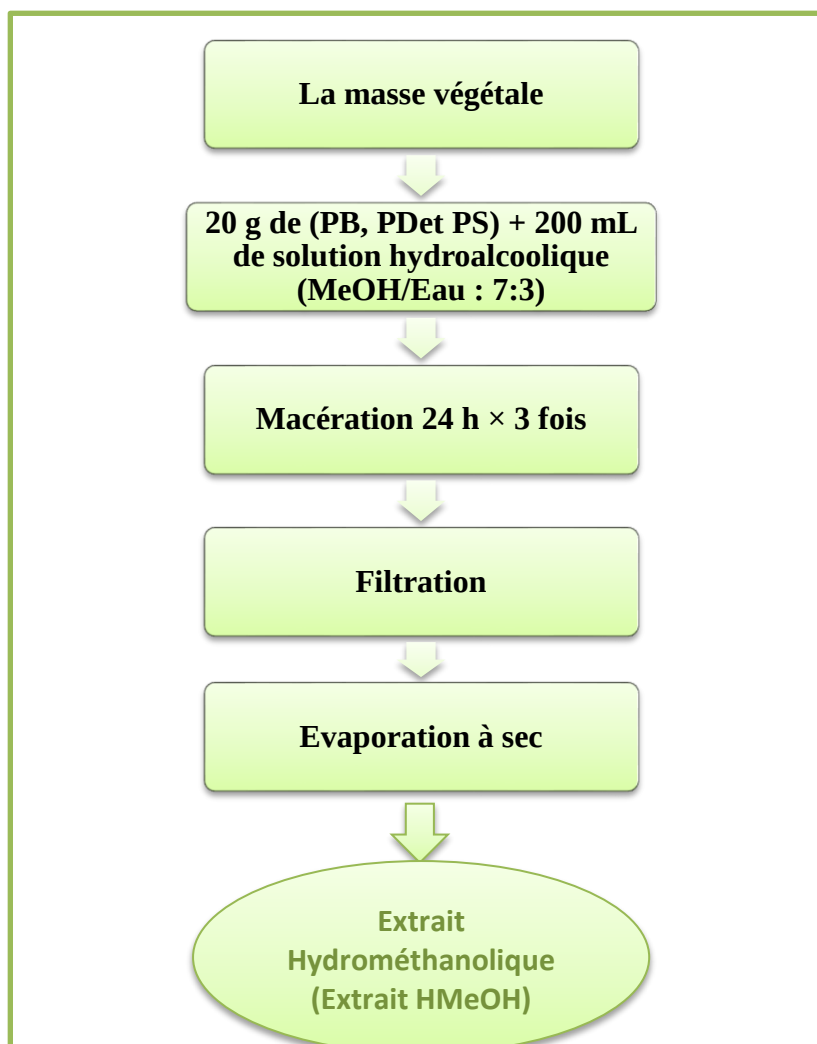


Figure II.9 : Schéma général de l'extraction par macération à froid de la plante médicinale étudiée.

II.4. Détermination de rendement

Le rendement d'extraction correspond au rapport entre la quantité de substances naturelles extraites par un solvant et la quantité initiale de matière végétale utilisée.

Après le choix du solvant approprié, l'extraction a été réalisée par macération dans un mélange méthanol/eau (70:30 V/V). Les rendements des extraits hydrométhanoliques obtenus à partir de la partie aérienne des trois échantillons ont été calculés selon la formule suivante [10] :

$$R (\%) = 100 M_{\text{ext}}/M_{\text{éch.}}$$

Où :

R : est le rendement en %.

M_{ext} : est la masse de l'extrait après évaporation du solvant à sec en g.

M_{éch} : est la masse sèche de la plante en g.

II.5. Analyse chromatographique

La chromatographie est une technique physico chimique utilisée pour séparer et analyser les composants d'un mélange. Elle peut être utilisée à des fins analytiques pour identifier les différentes substances, ou à des fins préparatives pour isoler les constituants d'un mélange. Plusieurs techniques chromatographiques existent en fonction du principe de séparation et de la nature de la phase utilisée (*Annexe I.2*).

II.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour obtenir une vision générale des métabolites contenus dans les extraits hydroalcooliques préparés, des analyses chromatographiques sur couche mince ont été réalisées sur gel de silice (60 F254, Merck) supporté sur feuille d'aluminium. La phase mobile utilisée correspond à différents systèmes de solvants organiques notés **SI**, **SII**, **SIII**, **SIV**, **SV** et **SVI** (**Tableau II.1**) [11, 12].

Tableau II.1 : Systèmes de solvants utilisés pour la CCM de gel de silice.

Systèmes de solvants	Proportions
SI : Dichloromethane (DCM)/Acétate d'éthyle (AcOEt)	9/1
SII : Acétate d'éthyle /Eau/Ac. acétique (AcOH)	9/1/0,5
SIII : Dichloromethane /Acétate d'éthyle	8/2
SIV : Dichloromethane	-
SV : Ether de pétrole/ Acétate d'éthyle	9/1
SVI : n-hexane/ Acétate d'éthyle	9/1

▪ Dépôt de l'échantillon

L'échantillon à analyser est d'abord dissous dans le méthanol à une concentration de 5 mg/mL. Ensuite, une quantité de 10 µL est appliquée sur la plaque chromatographique à l'aide d'une micropipette. Il est également possible de répéter le dépôt plusieurs fois au même endroit afin d'augmenter la concentration de l'échantillon et d'améliorer la détection.

▪ Développement des plaques

Chaque plaque a été déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système de solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque.

▪ Révélation

Après migration chromatographique, la plaque a été laissée sécher à l'air libre avant d'être observée sous une lampe UV à 365 nm afin de visualiser les différentes taches. La révélation a ensuite été effectuée à l'aide de plusieurs réactifs spécifiques, à savoir le chlorure ferrique pour les polyphénols, le chlorure d'aluminium pour les flavonoïdes, le réactif de Dragendorff pour les alcaloïdes, l'ammoniaque pour les coumarines et la vanilline sulfurique pour les terpènes et les stérols. Après pulvérisation des révélateurs, la plaque a de nouveau été séchée à température ambiante avant l'interprétation des résultats [13].

- Le chlorure de fer : une solution de FeCl_3 à 10 % a été préparée dans un mélange $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1).
- Le chlorure d'aluminium : une solution d' AlCl_3 à 1% a été préparée dans l'éthanol.
- L'ammoniaque : une solution d'ammoniaque préparée dans un mélange $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (1:1).
- La vanilline sulfurique : une solution préparée en dissolvant 1 g de vanilline dans 98 mL d'éthanol, puis 2 mL d'acide sulfurique ont été ajoutés.

Chaque substance qui migre est caractérisée par sa fluorescence sous UV et sa coloration après la révélation.

Les flavonoïdes comptent parmi les polyphénols les plus intéressants à identifier. Leur comportement en chromatographie est lié à leur structure chimique, ce qui influence leur migration. Ils deviennent aussi facilement repérables grâce à leur fluorescence sous UV à 365 nm.

Structure des flavonoïdes et le rapport frontal R_f

La valeur du R_f est définie comme suit :

$$R_f = d/D$$

d : distance entre l'origine et la tâche du produit après élution.

D : distance entre l'origine et le front du solvant.

Cette valeur permet d'avoir une idée du flavonoïde ainsi que la nature des substituants. Le **tableau II.2** explique la relation structure - R_f [14].

Tableau II.2 : La relation entre le R_f et la structure des flavonoïdes

Structure des flavonoïdes	R_f
Augmentation de nombre des groupements -OH	Diminution de R_f dans les systèmes organiques
Substitution des -OH par des groupements -CH ₃	Croissement de R_f dans les systèmes organiques
Substitution des -OH par des groupements osidiques	La valeur de R_f diminue dans les systèmes organiques et croit dans les systèmes aqueux

II.6. Analyse quantitative

L'analyse quantitative a été réalisée au sein des laboratoires de recherche de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ferhat Abbas Sétif-1. Cette étape vise à déterminer les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des extraits hydrométhanoliques obtenus à partir des trois plantes étudiées (PD, PB et PS). Pour ce faire, des méthodes colorimétriques couplées à la spectrophotométrie UV-visible ont été employées. Cette technique permet de quantifier les composés d'intérêt à partir de la mesure de l'absorbance des complexes colorés formés lors des réactions spécifiques.

II.6.1. Fondements de la spectrophotométrie UV-visible

La spectrophotométrie UV-visible est une méthode analytique largement utilisée pour le dosage quantitatif des substances en solution. Elle repose sur la mesure de l'absorbance d'un échantillon à une longueur d'onde déterminée. Selon la loi de **Beer-Lambert**, l'absorbance est proportionnelle à la concentration de l'espèce absorbante dans les limites de validité de cette loi. Ainsi, plus la concentration du composé est élevée, plus l'absorbance mesurée est importante. L'absorbance de la solution est définie comme suit :

Lorsqu'un faisceau lumineux d'intensité initiale I_0 traverse une solution colorée, une partie de cette lumière est absorbée par les molécules présentes et l'intensité transmise I devient inférieure à I_0 . L'absorbance (A) est définie par les relations suivantes :

$$A = \text{Log}_{10} (I_0/I), A = -\text{Log } T \quad \text{avec } T = I/I_0$$

Où T représente la **transmittance** de la solution.

- **Principe du dosage par spectrophotométrie UV-visible**

La spectrophotométrie UV-visible exploite la capacité de certaines molécules à absorber l'énergie lumineuse dans les domaines ultraviolet et visible du spectre électromagnétique (200–800 nm). Cette absorption est généralement liée à la présence de groupements chromophores au sein des molécules. Dans le cadre des dosages colorimétriques, les composés phénoliques réagissent avec des réactifs spécifiques pour former des complexes colorés dont l'intensité est proportionnelle à leur concentration.

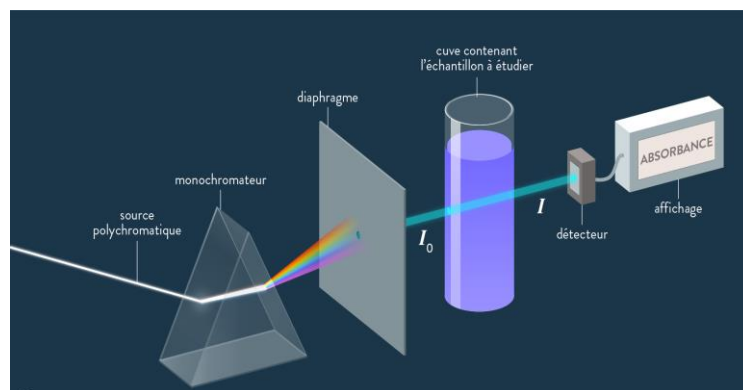


Figure II.10 : Principe du spectrophotomètre UV-visible.

Le spectrophotomètre UV-visible permet alors de mesurer l'absorbance de ces complexes à une longueur d'onde appropriée. L'appareil est constitué d'une source lumineuse, d'un monochromateur sélectionnant la longueur d'onde désirée, d'une cuve contenant l'échantillon et d'un détecteur mesurant l'intensité de la lumière transmise. Les valeurs d'absorbance obtenues sont ensuite utilisées pour déterminer la concentration des composés étudiés à partir de courbes d'étalonnage.

II.6.2. Dosage des composés phénoliques totaux

▪ *Principe*

La quantification des polyphénols totaux a été réalisée selon la méthode de Folin Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'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'oxyde bleu verdâtre de tungstène et de molybdène qui a une absorption maximale à 765 nm [15].

Les polyphénols ont été estimés par la mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV à une longueur d'onde $\lambda = 765$ nm en utilisant l'acide gallique comme référence.

▪ Méthodologie

100 μL de chaque extrait hydrométhanolique (PB, PD et PS) ou bien de solution standard d'acide gallique dissoute dans l'eau (0-180 $\mu\text{g/mL}$) ont été ajoutés à 500 μL de réactif phénolique de Folin-Ciocalteu (dilué en 1/10 dans de l'eau distillé) fraîchement préparé. Après 4 minutes, 400 μL de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) d'une concentration de 7,5% ont été ajoutés au mélange. Après agitation, l'ensemble a été incubé à l'obscurité à une température ambiante pendant 90 min. Le blanc a été préparé de la même façon en remplaçant le réactif de Folin-Ciocalteu par de l'eau distillé.

Les extraits à doser ont été préparé de la même manière et dans les mêmes conditions que la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. La lecture de l'absorbance à 765 nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre Faithful (modèle 752N). La concentration des polyphénols dans l'extrait a été calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique à différentes concentrations (toutes les mesures ont été réalisées en trois répétitions) (**Figure II.11**). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mgEAG/g d'extrait).

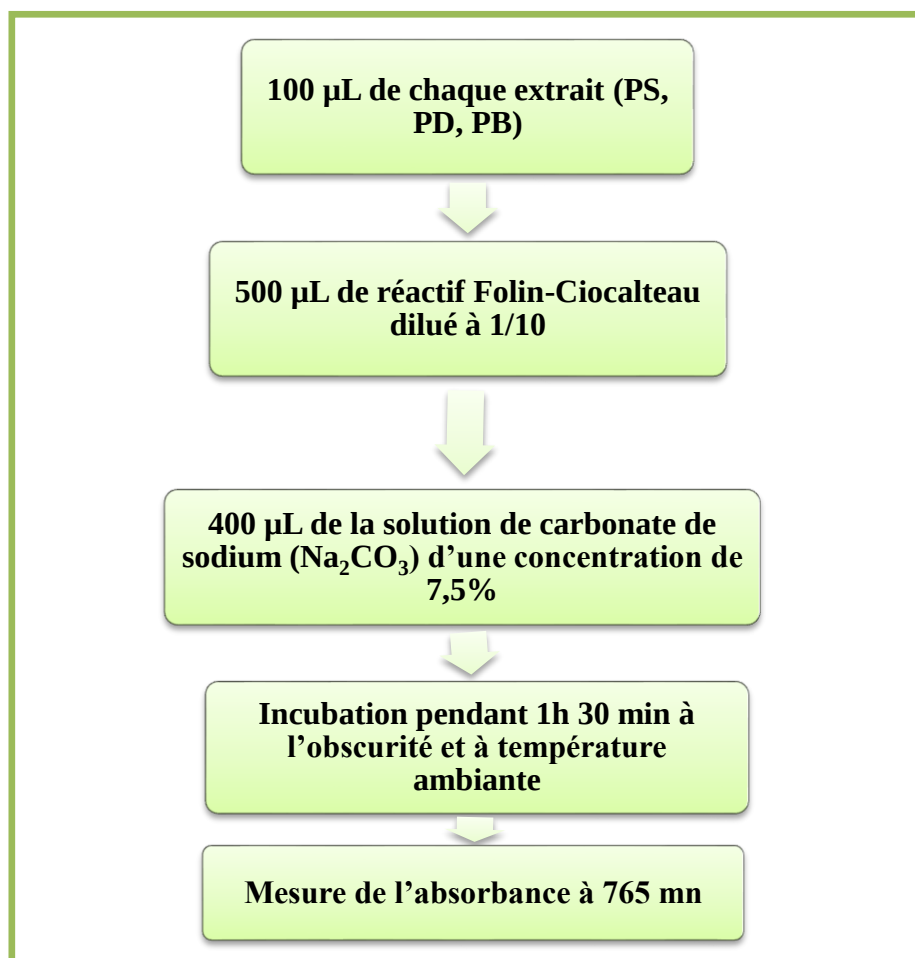


Figure. II.11 : Schéma expérimental du dosage des polyphénols totaux.

II.6.3. Dosage des flavonoïdes totaux

▪ Principe

Dans cette méthode on utilise le chlorure d'aluminium (AlCl_3), ce réactif forme avec les groupements hydroxyles du flavonoïde un complexe très stable, de couleur jaune et absorbe à une longueur d'onde de 430 nm [16].

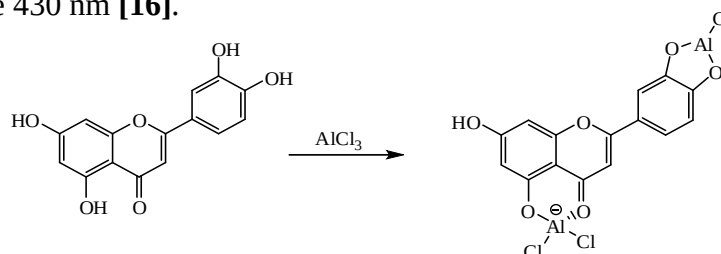


Figure II.12 : Complexes stables et labiles entre les flavonoïdes et AlCl_3 .

Les flavonoïdes sont estimés par spectrophotométrie UV, dont la quercétine est utilisée comme un standard à une longueur d'onde $\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$.

▪ Méthodologie

À 500 μL de chaque extraits hydrométhanoliques (PD, PB et PS) (préparé avec des dilutions convenables dans le méthanol) sont ajoutés 500 μL d' AlCl_3 (2 % dans le méthanol), par contre le blanc a été préparé en remplaçant le réactif AlCl_3 par le méthanol. Après 10 minutes d'incubation, la lecture de l'absorbance a été effectuée à 430 nm (toutes les mesures ont été réalisées en trois répétitions) (**Figure II.13**). Le calcul de la concentration des flavonoïdes a été fait à l'aide d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-50 $\mu\text{g/mL}$). La concentration est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mgEQ/g).

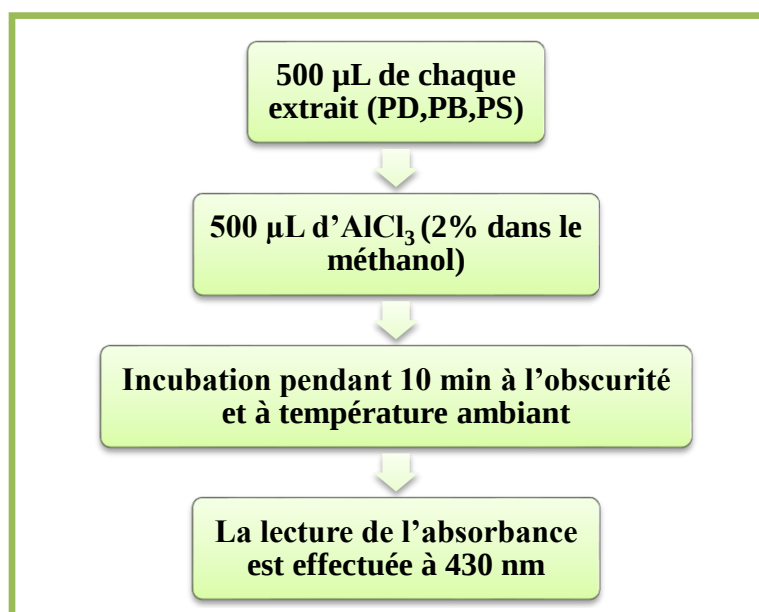


Figure. II.13 : Protocole suivie pour réaliser le dosage des flavonoïdes.

II.7. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydrométhanoliques

L'évaluation de l'activité antioxydante de cette plante a été réalisée au niveau des laboratoires de recherche de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif-1.

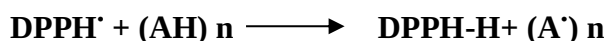
Cette étude in vitro des extraits hydrométhanoliques des trois plantes (PS, PB et PD) a été effectuée en utilisant le test d'**activité anti-radicalaire au DPPH** ainsi que le test de **piégeage du cation radical ABTS^{•+}**.

II.7.1. Activité anti-radicalaire au DPPH

Objectif : Déterminer parmi les extraits Hydrométhanoliques ceux qui ont le plus grand pouvoir piègeur (scavenger) du radical DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Cette activité est à l'origine de l'activité antioxydante.

▪ Principe

Le test au DPPH est évalué par la méthode de Boumerfeg *et al.* 2009 [17]. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



Où AH est un composé capable de céder un H[•] au radical DPPH[•].

Le DPPH[•] est un radical libre, de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton ou de radical H[•] [17].

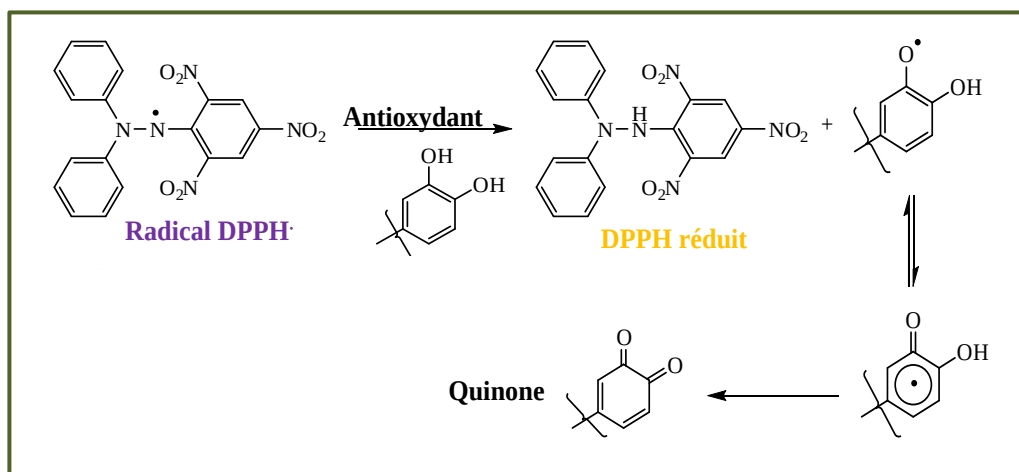


Figure II.14 : Réaction chimique de la réduction de la forme radicale du DPPH.

▪ Méthodologie

Pour réaliser ce test, la solution de DPPH doit être préparée le jour même de la manipulation (0,004%). Des volumes de 50 µL de l'extrait ou des standards (Le contrôle positif comme le BHA ; Butylhydroxyanisole) ont été mélangés avec 1250 µL de solution de DPPH. Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement et laissé reposer à l'obscurité pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 517 nm. Tous les essais ont été effectués trois fois (**Figure II.15**). Le blanc a été préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par du méthanol.

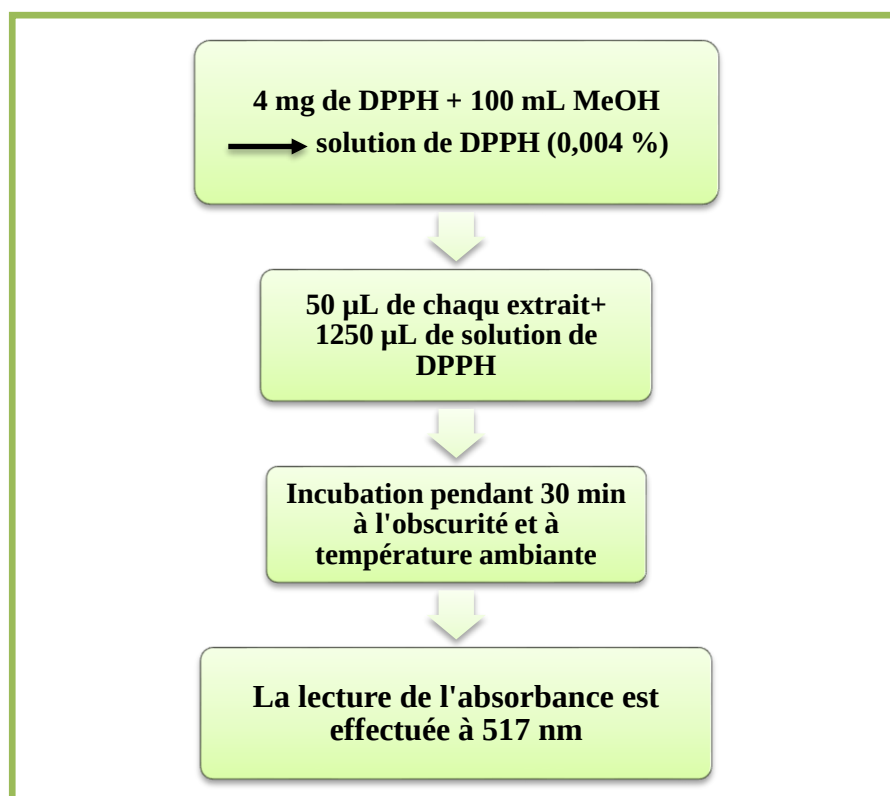


Figure II.15 : Protocol du test de l'activité anti-radicalaire au DPPH.

II.7.1.1. Calcul du pourcentage d'inhibition

Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire (d'inhibition) pour chaque extrait, a été calculé selon l'équation suivante :

$$PI \% = [(A_C - A_E)/A_C] \times 100$$

A_C : Absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif).

A_E : Absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon).

Le contrôle négatif (le blanc) contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui a été remplacé par le même volume de méthanol [18].

II.7.1.2. Détermination d'IC₅₀

L'IC₅₀ est définie comme étant la concentration d'échantillon nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH. La valeur d'IC₅₀ la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée [18].

La valeur IC₅₀ ou bien l'efficacité anti-radicalaire a été calculée comme suit : $EA = 1/IC_{50}$

EA : Efficacité anti-radicalaire.

II.7.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS^{•+}

Objectif : évaluer parmi les extraits hydrométhanoliques ceux présentant la plus forte capacité de neutralisation du cation radical ABTS^{•+}. Cette activité reflète directement le potentiel antioxydant des extraits étudiés.

▪ Principe

L'ABTS, initialement incolore, est oxydé par le persulfate de potassium (K₂S₂O₈) pour former le radical cationique ABTS^{•+}, caractérisé par une coloration bleu-vert. En présence d'un antioxydant, ce radical est réduit, ce qui entraîne une diminution de l'intensité de sa coloration. L'activité antioxydante est évaluée à partir du pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+}, déterminé par la mesure de l'absorbance à 734 nm, longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de ce radical [19, 20].

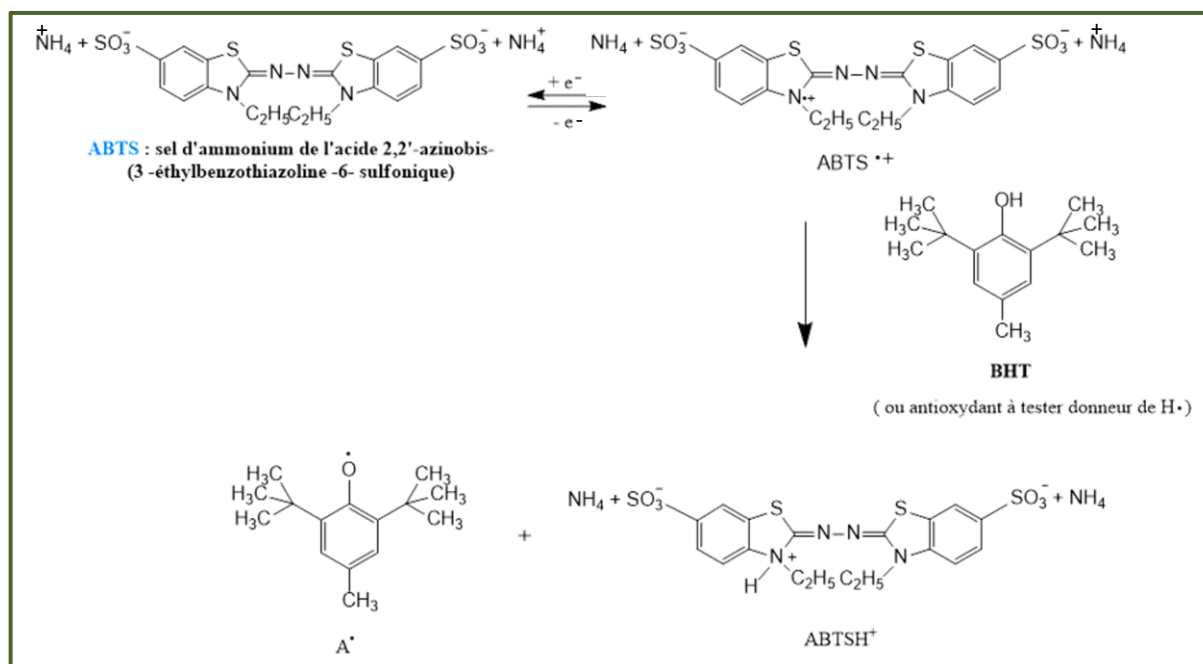
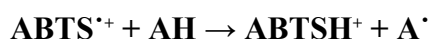


Figure II.16 : Mécanisme de formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H[•] [21].

La solution du radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a été préparée en dissolvant 19,2 mg d'ABTS dans 5 mL d'eau distillée, puis en ajoutant 3,3 mg de persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Le mélange a été maintenu à l'obscurité, à température ambiante, pendant 12 à 16 heures afin de permettre la formation du radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Avant utilisation, la solution obtenue a été diluée avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'une absorbance de $0,70 \pm 0,02$ à 734 nm.

Pour le test antioxydant, des volumes de 40 μL de l'extrait ont été mélangés avec 160 μL de solution d' $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Après une incubation de 10 minutes à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le blanc a été préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par du méthanol. Le butylhydroxytoluène (BHT) a été utilisé comme témoin positif [22].

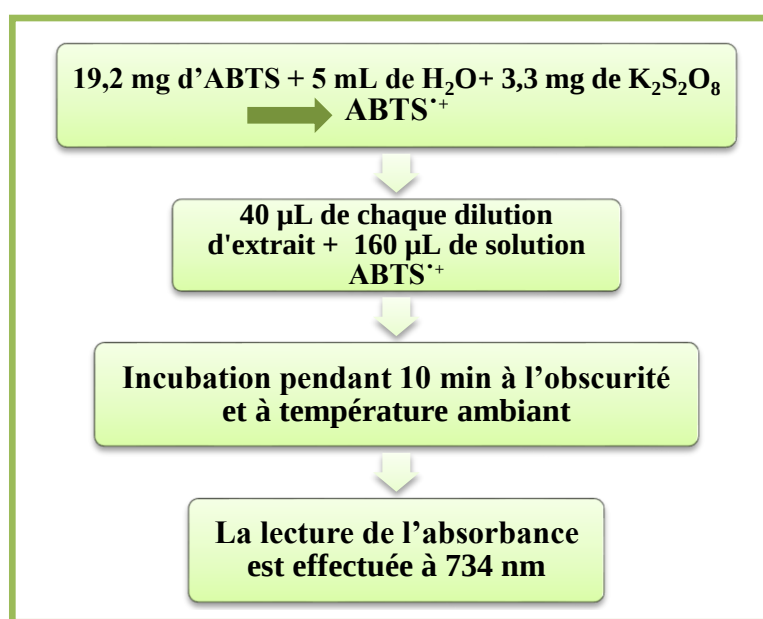


Figure. II.17 : Protocole suivie pour réaliser l'activité du piégeage du cation radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$.

II.7.2.1. Calcul du pourcentage d'inhibition

L'activité du test à l' $\text{ABTS}^{\cdot+}$ est exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{PI \%} = \left[\frac{A_C - A_E}{A_C} \right] \times 100$$

A_C : Absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif).

A_E : Absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon).

Le contrôle négatif (le blanc) contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui a été remplacé par le même volume de méthanol.

II.8. Références bibliographiques

- [1] Karumi Y., Onyeyili P. A., Ogugduaja V. O. (2004). Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *Momordica balsamina* (Baume de la pomme). *Journal of Medical Sciences*, 4(3), 179–182.
- [2] Paris R., Moyse H. (1969). Précis de matière médicale. Masson.
- [3] Ben Khherara S. (2010). Activité bactéricide des huiles essentielles et des flavonoïdes isolés d'une plante médicinale du Nord-Est Algérien : *Salvia officinalis* L. [Thèse de magistère, Université Badji-Mokhtar]. Annaba, Algérie.
- [4] Dohou N., Yani, K., Thahrouch S., Idrissi Hassani L.-M., Badoc A., Gmira N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine : *Thymelaea lythroides*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142, 61–78.
- [5] Békro Y.-A., Mamyrbeko-Békro J. A., Boua B. B., Tra Bi F. H., Éhilé E. E. (2007). Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, 4(2), 217–225.
- [6] Debray M., Jacquemin H., Razafindrambo R. (1971). *Phytochemical screening of Pentadesma butyracea* Sabine (Clusiaceae) acclimated in Benin by GC/MS. Travaux et documents de l'ORSTOM.
- [7] Naczki M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95–111.
- [8] Goris A., Liot A. (1942). Pharmacie galénique (Vol. 2, Tome 1). Masson et Cie.
- [9] Markham K. R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Academic Press.
- [10] Falleh H., Ksourir R., Chaieb K., Karray-Bourouin N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372–379.
- [11] Seghiri R., Boumaza O., Mekkiou R., Benayache S., Mosset P., Quintana J., Estévez F., León F., Bermejo J., Benayache F. (2009). A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochemistry Letters*, 2(3), 114–118.
- [12] Males Z., Medic-Saric M., Bucar F. (1998). Flavonoids of *Guiera senegalensis* J. F. Gmel. – Thin layer chromatography and numerical methods. *Croatica Chemica Acta*, 71(1), 69–79.
- [13] Guy B. K., Janat Akhanovna M.-B., Odette D. D., Jonathan G. S., Yves-Alain B. (2010). On the qualitative phytochemical composition of crude hydromethanolic extracts of the leaves of 6 varieties of *Manihot esculenta* Crantz of Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*, 45(2), 200–211.

- [14] Bandyukova V. A., Shinkareako A. L. (1973). The thin layer chromatography of flavonoids. *Chemistry of Natural Compounds*, 9(1), 17–21.
- [15] Li H., Cheng K. W., Wong C. C., Fan K. W., Chen F., Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771–776.
- [16] Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559.
- [17] Boumerfeg S., Baghiani A., Messaoudi D., Khenouf S., Arrar L. (2009). Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytotherapy Research*, 23(2), 283–288.
- [18] Khoudali S., Benmessaoud Left D., Assaquil A., Zertoubi M., Azzi M., Benaissa M. (2014). Étude de l'activité antioxydante et de l'action corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(3), 887–898
- [19] Moon J-K, Shibamoto T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. J. Agric. Food Chem., 57(5), 1655–1666.
- [20] Osman, A.M, Wong, K.Y, Fernyhough, A. (2006). ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346(1), 321-329
- [21] Françoise M., André D., Laurence D. B., Carine F., Michel B., Fritsch P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S : Médecine Sciences*, 20(1), 39–44.
- [22] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

CHAPITRE III

Résultats et discussion

III.1. Screening chimique

III.1.1. Tests phytochimiques

Le criblage phytochimique a été réalisé afin de mettre en évidence les principales familles de métabolites secondaires présentes dans les trois échantillons végétaux PS, PB et PD. Cette analyse repose sur des réactions qualitatives de caractérisation utilisant des réactifs spécifiques capables de produire des phénomènes de coloration, de précipitation ou de turbidité. L'intensité des réactions observées fournit une indication sur l'abondance relative des composés recherchés.

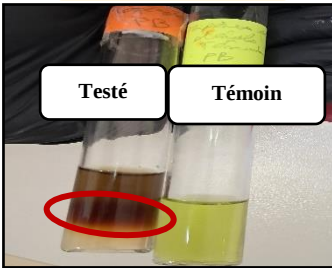
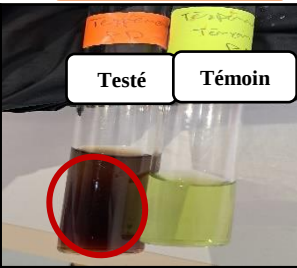
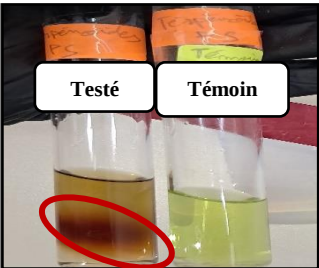
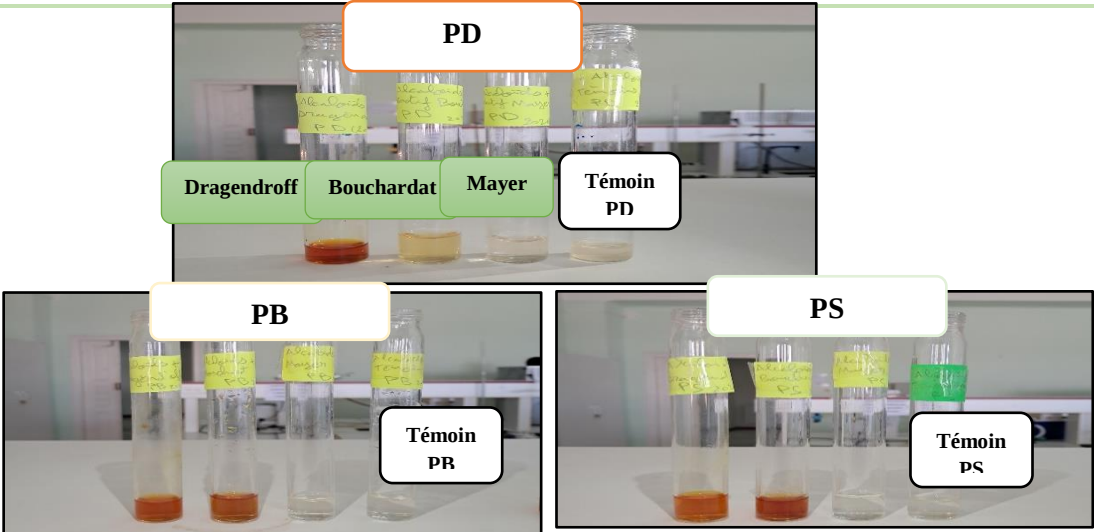
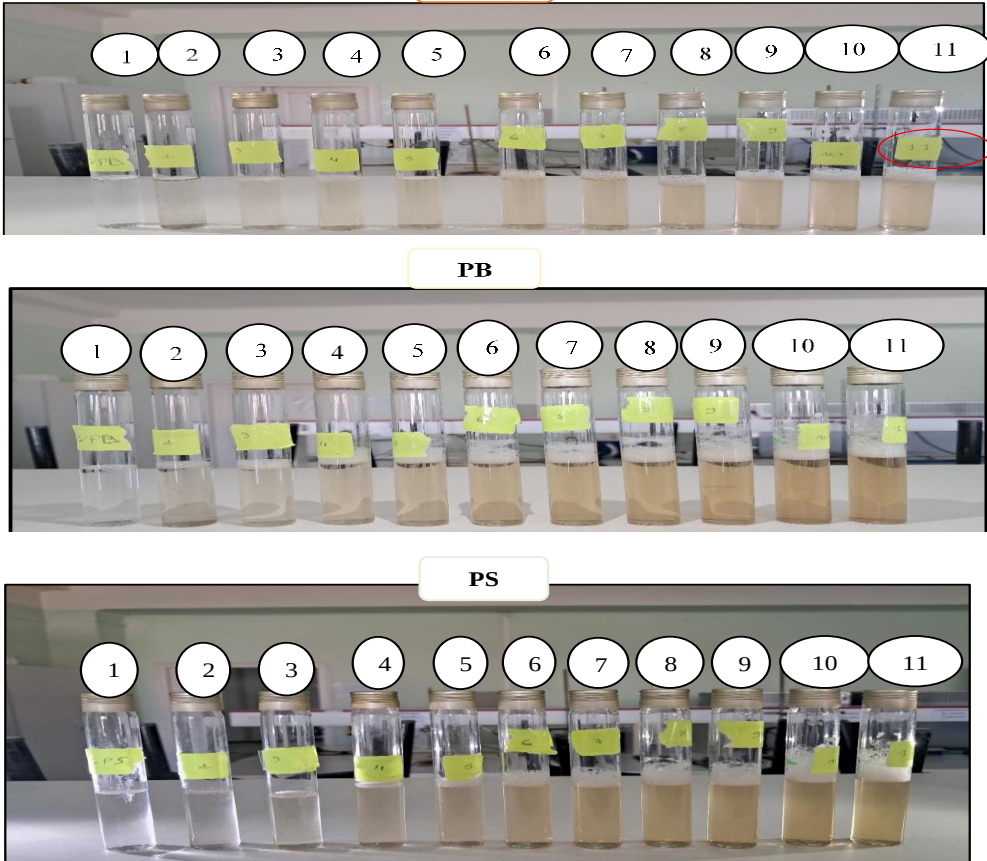
Les résultats obtenus à partir de l'analyse de la poudre végétale des parties aériennes des trois plantes étudiées sont présentés dans les **tableaux III.1** et **III.2**. Ce tableau indique la présence (+) ou l'absence (-) des différents groupes de métabolites secondaires détectés.

Tableau III.1 : Criblage phytochimique de la poudre végétale de PS, PB et PD.

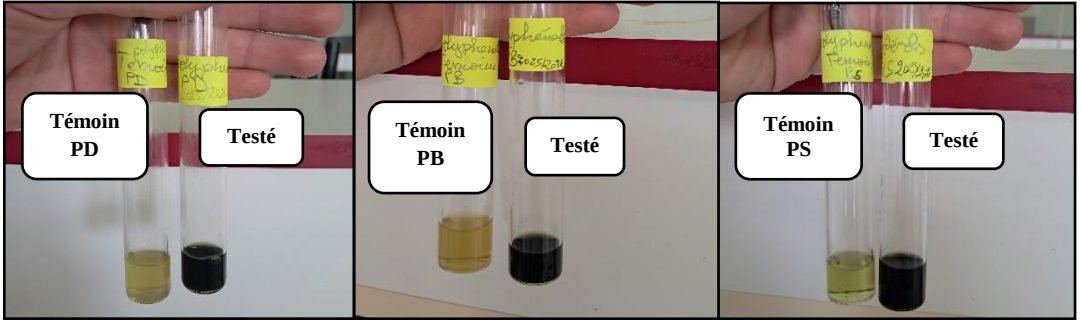
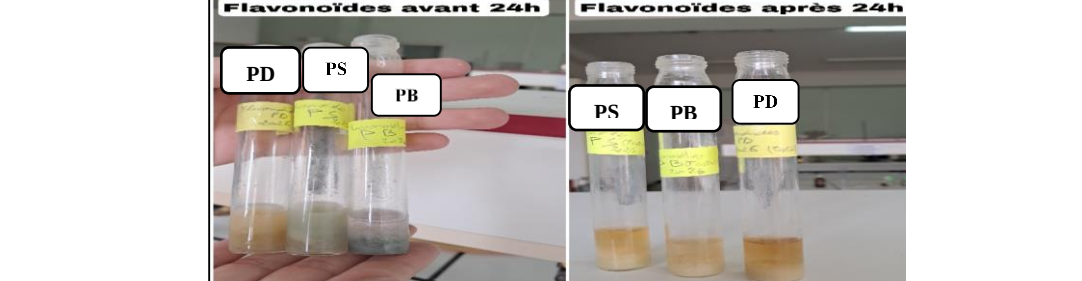
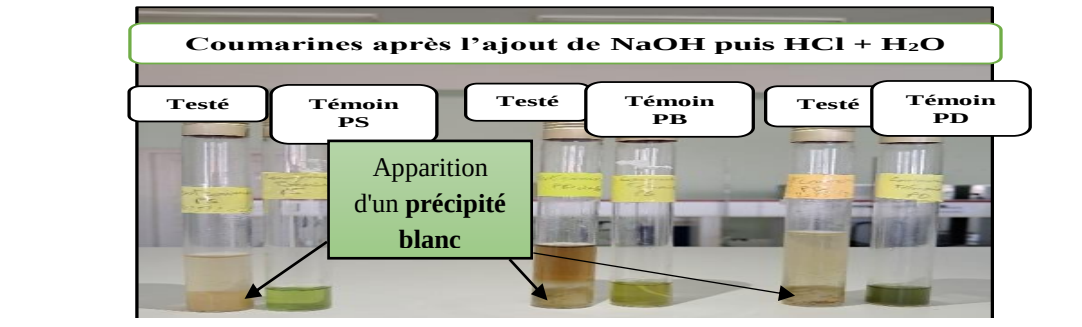
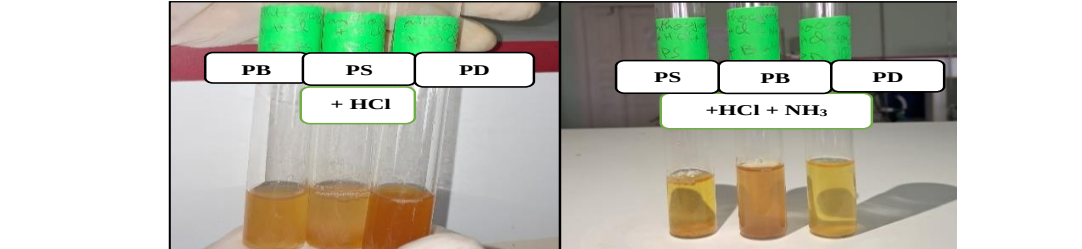
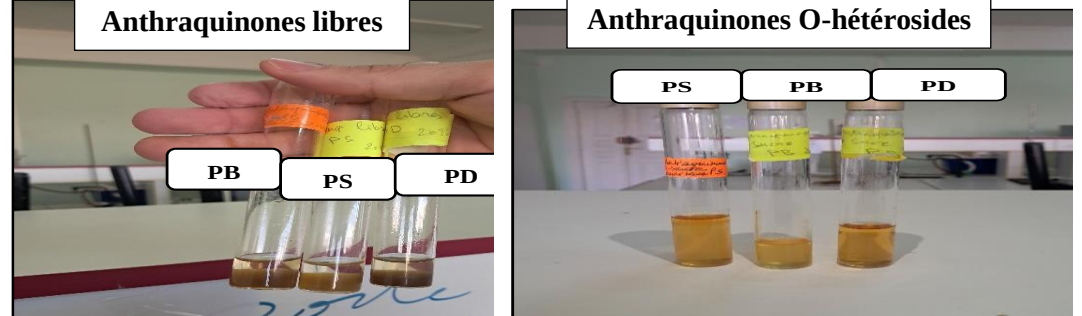
Métabolites secondaires		Observation	PD	PB	PS
Triterpènes et stérols		Formation d'anneau rouge brunâtre en milieu acide	+++	+++	++
Alcaloïdes		Absence de précipitation	-	-	-
Saponosides		Formation d'une mousse persistante (> 1 cm)	+++	+++	+++
Polyphénols		Changement de coloration bleu noirâtre	+++	+++	+++
Tanins catéchiques		Apparition des flocons blancs	+++	+++	+++
Tanins galliques		absence de décoloration bleu-noirâtre , apparition d'une coloration jaune-marron légère .	-	-	-
Flavonoïdes		Changement de coloration en orange	+++	+	+++
Coumarines		Décoloration en milieu basique puis précipitation en milieu acide	++	++	++
Anthocyanes		Changement de coloration en orange / rouge-orange en milieu acide. Coloration jaune en milieu basique	++	+	+
Antraquinones	Anthraquinones libres	Changement de coloration en rouge ou plus au moins rouge en milieu basique	+++	++	+
	Anthraquinones O-hétérosides		+++	+	+++
Coumarines		Décoloration en milieu basique puis précipitation en milieu acide	++	+	++

(-) : Négative, (+) : Faiblement positif, (++) : Positif, (+++) : Fortement positif

Tableau III.2 : Résultats des analyses phytochimiques des échantillons PD, PB et PS.

Métabolites secondaires	résultat		
	PB	PD	PS
Triterpènes et stérols			
Alcaloïdes			
Saponosides			

La suite du tableau III.2 : Résultats des analyses phytochimiques des échantillons PD, PB et PS.

Polyphénols	 Témoin PD Testé Témoin PB Testé Témoin PS Testé
Tanins	 Testé PB Testé PS Testé PD Tanins catéchiques Flocons blancs Testé PD Testé PB Tanins galliques
Flavonoïdes	 Flavonoïdes avant 24h Flavonoïdes après 24h PD PS PB PS PB PD
Coumarines	 Coumarines après l'ajout de NaOH puis HCl + H₂O Testé Témoin PS Testé Témoin PB Testé Témoin PD Apparition d'un précipité blanc
Anthocyanes	 PB PS PD + HCl PS PB PD + HCl + NH₃
Antraquinones	 Anthraquinones libres Anthraquinones O-hétérosides PB PS PD PS PB PD

Selon les résultats du criblage phytochimique présentés dans le **tableau III.1** et **III.2**, les saponosides, les polyphénols et les tanins catéchiques sont fortement présents dans les trois échantillons végétaux (PD, PB et PS), tandis que les alcaloïdes et les tanins galliques sont totalement absents. Les triterpènes et les stérols sont positivement détectés dans l'ensemble des échantillons. Les flavonoïdes, les coumarines, les anthocyanes ainsi que les anthraquinones sont également mis en évidence, mais avec des intensités variables selon la provenance géographique des plantes. Les flavonoïdes sont particulièrement abondants dans l'échantillon PS, alors qu'ils sont faiblement détectés dans PB. Les anthocyanes et les anthraquinones montrent également des variations entre les trois échantillons, avec une accumulation plus importante dans PD [1].

Globalement, les résultats de notre étude révèlent une richesse des trois échantillons végétaux (PD, PB et PS) étudiés en composés phénoliques, en terpènes et stérols et en saponosides, suggérant un potentiel biologique intéressant.

- **Calcul de l'indice de mousse**

Après agitation des décoctés, une mousse persistante a été observée dans les tubes correspondant aux trois échantillons étudiés (PD, PB et PS). L'indice de mousse a été déterminé à partir du tube présentant une hauteur de mousse de 1 cm, puis les valeurs obtenues ont été reportées dans le **tableau III.3**.

Tableau III.3 : Valeurs de l'indice de mousse des échantillons PD, PB et PS.

	PD	PB	PS
Volume de décocté (mL)	3	1,4	1,9
Concentration (g/mL)	0,003	0,0014	0,0019
Indice de mousse	333,33	714,28	526,31

Les résultats montrent que les indices de mousse sont supérieurs à 100 pour les trois poudres végétales, ce qui confirme la présence de saponosides dans l'ensemble des échantillons végétaux étudiés. Toutefois, des différences quantitatives sont observées entre les échantillons. En effet, l'échantillon PB présente l'indice de mousse le plus élevé, suivi de PS puis de PD, suggérant une teneur plus importante en saponosides dans PB et plus faible dans PD.

III.1.2. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM)

L'analyse CCM des extraits hydrométhanoliques (HMeOH) (Méthanol/Eau : 70 : 30 V/V) des plantes PS, PB et PD, obtenus par macération, a été réalisée sur CCM de gel de silice (60 F₂₅₄, Merck) sur feuille d'aluminium et développée dans les deux systèmes de solvants SI et SII (**Figure III.1**). L'analyse montre clairement le même profil chromatographique des trois extraits HMeOH, ce qui suggère une composition chimique analogue.

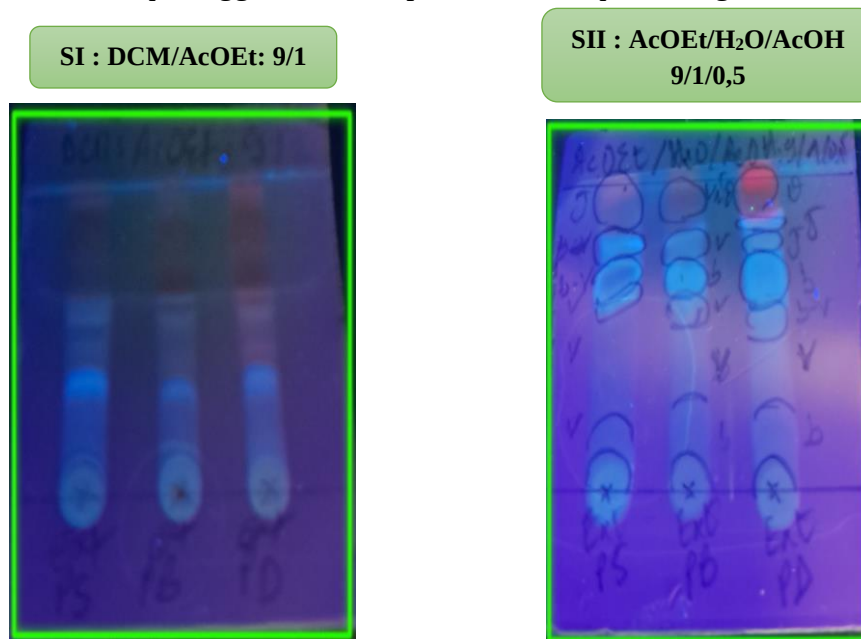


Figure III.1 : CCM des extraits hydrométhanoliques obtenus par macération de PS, PB et PD, développées dans les systèmes de solvants SI et SII visualisées sous UV/365 nm.

III.1.2.1. Détection des flavonoïdes

L'analyse par CCM a confirmé la présence de flavonoïdes dans les extraits hydrométhanoliques des échantillons PS, PB et PD (**Figures III.2 et III.3**). Les chromatogrammes obtenus avec les systèmes d'élution SI et SII révèlent des profils globalement similaires sous UV à 365 nm, avec l'apparition de taches de différentes couleurs suggérant la présence de composés phénoliques. Toutefois, le système SI a offert une meilleure séparation chromatographique et une visualisation plus nette des taches.

Les flavonoïdes sont fluorescents comme d'autres métabolites secondaires sous UV/366 nm. Markham et Harborne [2, 3] ont montré que les flavonol avec 3-OH libre prennent une coloration jaune ou jaune pâle, et lorsque 3-OH est substituée, ils prennent une coloration violette-noire. Les flavones libres ou bien méthylés se décèlent sous forme de taches violettes-noires et violettes-bleues sans 5-OH libre. Les flavanols et les auronos se caractérisent par l'apparition de taches jaunes-vertes et les isoflavone sont orange fluorescent.

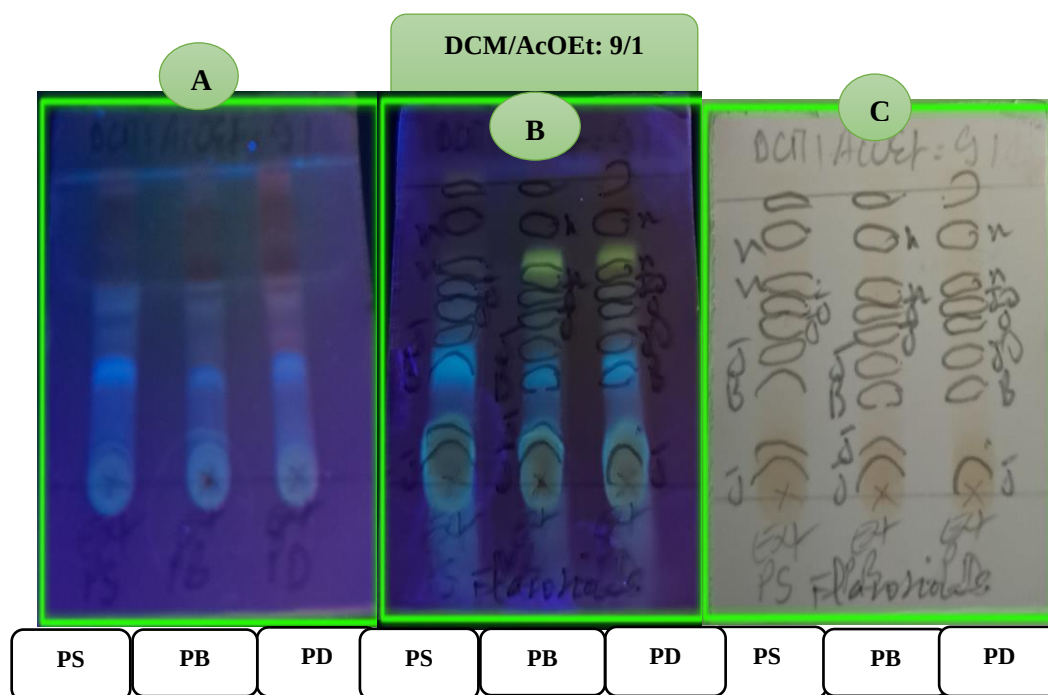


Figure III.2 : CCM des extraits hydrométhanoliques des plantes ; PS, PB et PD, développée dans le système de solvants SI.

A : observée sous UV/365 nm avant révélation, **B :** observée sous UV/365 nm après révélation avec $AlCl_3$, **C :** observée dans le visible après révélation avec $AlCl_3$ à 1%.

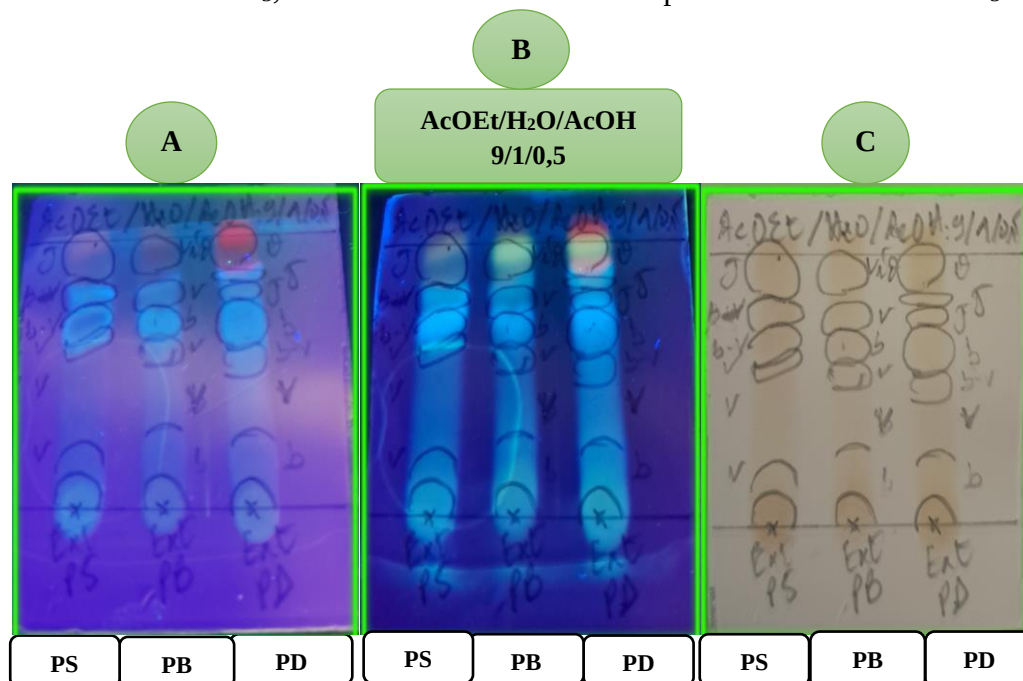


Figure III.3 : CCM des extraits hydrométhanoliques des plantes ; PS, PB et PD développée dans le système de solvants SII.

A : observée sous UV/365 nm, **B :** observée sous UV/365 nm après révélation avec $AlCl_3$, **C :** observée dans le visible après révélation avec $AlCl_3$ à 1 %.

Afin de confirmer que les fluorescences observées correspondent bien à des flavonoïdes, les plaques ont été révélées à l'aide d'une solution de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 1 %. Ce

réactif forme avec les flavonoïdes des complexes stables présentant une fluorescence caractéristique sous UV à 366 nm ou une coloration visible [4] (**Figure III.4**). Après révélation, plusieurs taches fluorescentes ont été observées, témoignant de la présence de différents flavonoïdes, qui apparaissent notamment en jaune à la lumière visible.

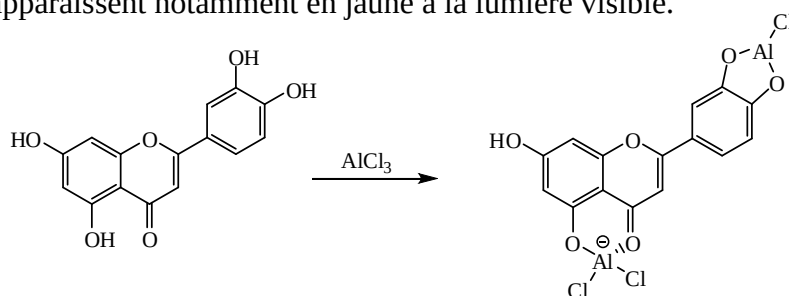


Figure III.4 : Complexes stables et labiles entre les flavonoïdes et AlCl_3 .

Cependant, sous UV/365 nm, la coloration des taches changent du violet en jaune fluorescent, du jaune en jaune marron et du noire en jaune fluorescent [5] (**Figure III.2 et III. 3**) et en jaune et jaune brun dans le visible, ce qui affirme la présence des flavonoïdes dans notre plante. Selon les R_f des taches, les flavonoïdes présents dans cette plante sont de polarités différentes.

III.1.2.2. Détection des polyphénols

La recherche des polyphénols par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice a été réalisée sur les extraits hydrométhanoliques des échantillons PS, PB et PD en utilisant les systèmes d'élution SII et SIII. Les plaques chromatographiques ont d'abord été examinées sous une lampe UV à 365 nm, puis révélées à l'aide d'une solution aqueuse de trichlorure de fer à 10 %, afin de mettre en évidence la présence des composés phénoliques (**Figure III.5 et III.6**).

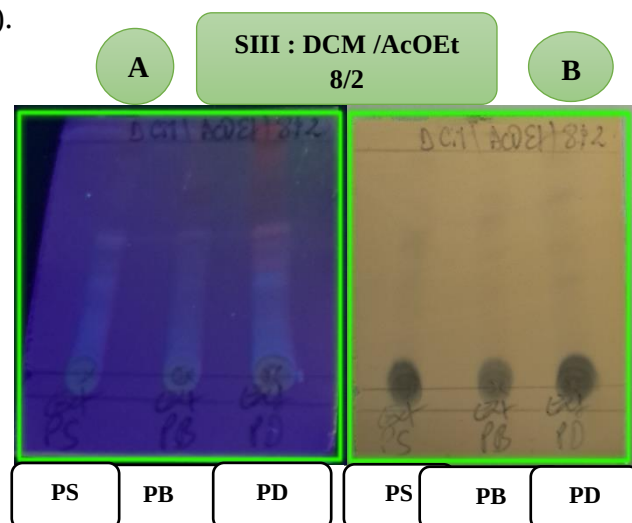


Figure III.5 : CCM des extraits HMeOH développée dans le système SIII.
A : observée sous UV/365 nm, **B :** observée dans le visible après révélation avec FeCl_3 .

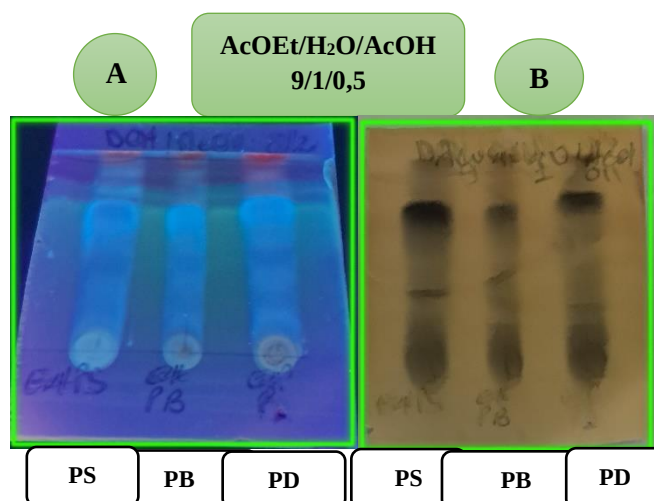


Figure III.6 : CCM des extraits HMeOH développée dans le système SII.
A : observée sous UV/365 nm, **B :** observée dans le visible visible après révélation avec FeCl_3 .

La révélation par une solution aqueuse de trichlorure de fer à 10 % a permis de visualiser les composés phénoliques sous forme de spots bleus noirâtres et bleus verdâtres ce qui confirme la présence des composés phénoliques dans les trois échantillons étudiés, mais moins abondant dans la plante PB.

III.1.2.3. Détection des coumarines

L'identification des coumarines par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice a été effectuée sur les extraits hydrométhanoliques des échantillons PS, PB et PD en utilisant les systèmes d'élution SIII et SIV. Après migration, les plaques chromatographiques ont été observées sous une lampe UV à 365 nm, puis révélées à l'aide d'une solution d'ammoniac afin de mettre en évidence la présence éventuelle des coumarines (**Figures III.7 et III.8**).

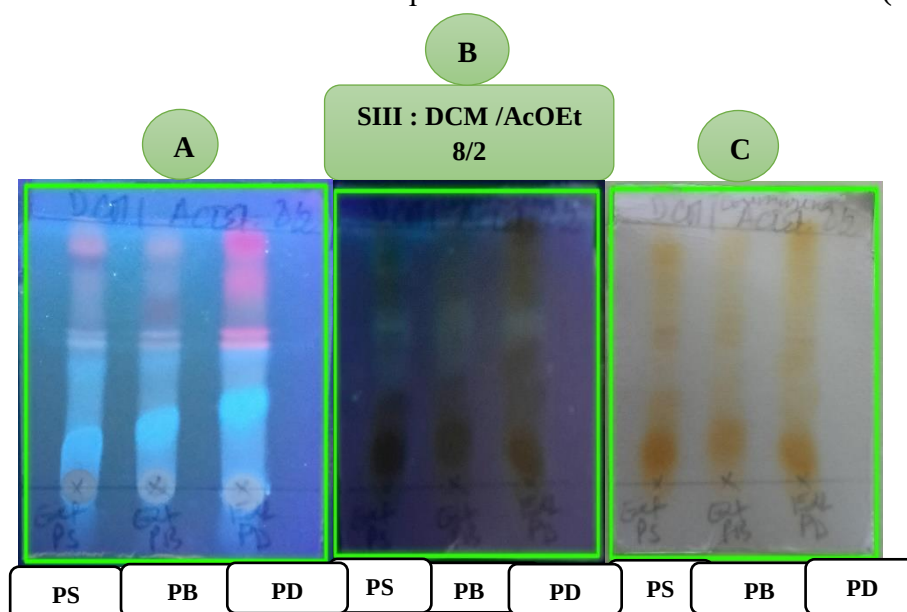


Figure III.7 : CCM des extraits HMeOH développée dans le système SIII.
A : observée sous UV/365 nm, **B :** observée sous UV/365 nm après révélation avec NH_3 ,
C : observée dans le visible après révélation avec solution de NH_3 .

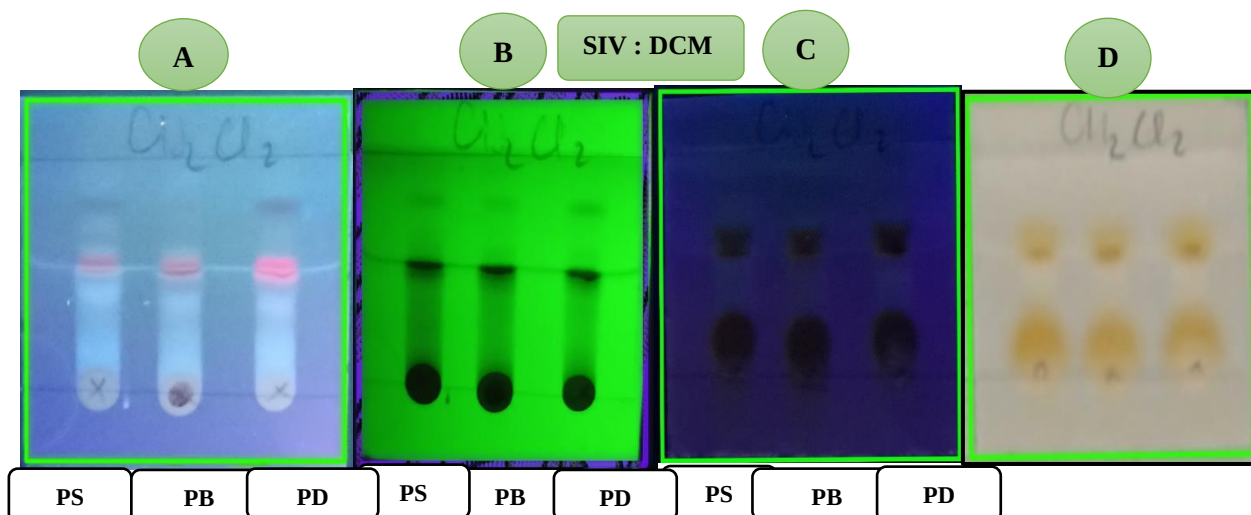


Figure III.8 : CCM des extraits HMeOH développée dans le système SIV.

A : observée sous UV/365 nm, **B :** observée sous UV/254 nm, **C :** observée sous UV/365 nm après révélation avec NH_3 , **D :** observée dans le visible après révélation avec NH_3 .

La caractérisation des coumarines par CCM a révélé la présence de ces composés dans les trois échantillons étudiés (PS, PB et PD), bien qu'ils semblent moins abondants dans l'échantillon PB. Leur présence est suggérée par l'apparition de taches de couleurs verte, marron, marron foncé et marron noire sous UV à 365 nm, puis confirmée après révélation à l'ammoniac par l'observation de taches jaunes à jaune brun. [5].

En effet, l'ammoniac est une base faible, elle ionise les hydroxyles les plus acides (**Figure III.9**), entraînant un effet bathochrome et une absorption dans le visible.

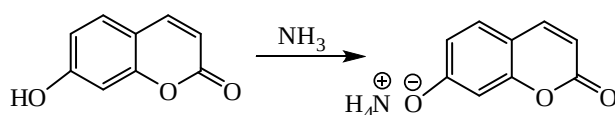


Figure III.9 : Réaction de l'ammoniac sur les coumarines.

III.1.2.4. Détection des alcaloïdes

L'analyse chromatographique sur CCM des deux extraits HMeOH développées dans le système d'élutions SI, montre l'absence de taches de couleur orange, après révélation avec le réactif de Dragendor'ff (**Figure III.10**), ce qui indique l'absence des alcaloïdes dans notre plante.

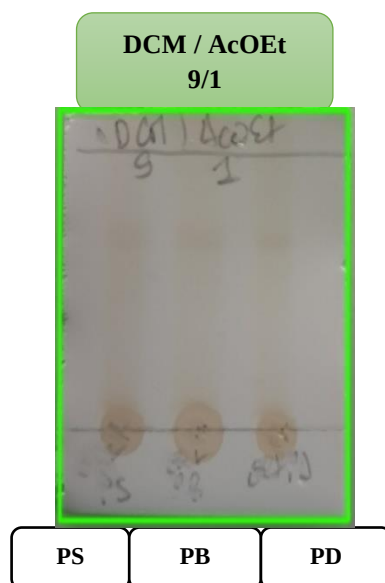


Figure III.10 : CCM des extraits HMeOH développée dans le système SI, révélée avec le réactif de Dragendorff et observée dans le visible.

III.1.2.5. Détection des terpènes et stéroïdes

L'analyse chromatographique des terpènes et stéroïdes par CCM de gel de silice est réalisée sur les trois extraits HMeOH dans les systèmes SV et SVI. Les plaques de CCM sont visualisées sous lampe UV à 365 nm puis révélées avec une solution de la vanilline sulfurique et chauffées entre 100 et 110 °C (**Figure III.11** et **III.12**).

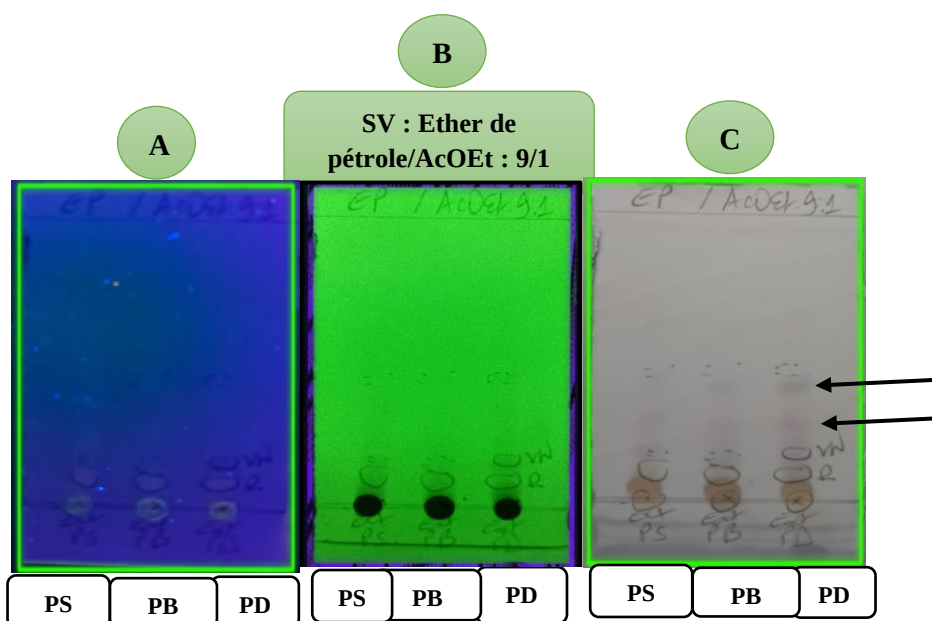


Figure III.11 : CCM des extraits hydrométhanoliques des trois Extraits ; PS, PB et PD, développée dans le système de solvants SV.

A : observée sous UV/365 nm, **B** : observée sous UV/254 nm, **C** : observée dans visible après révélation par la vanilline sulfurique.

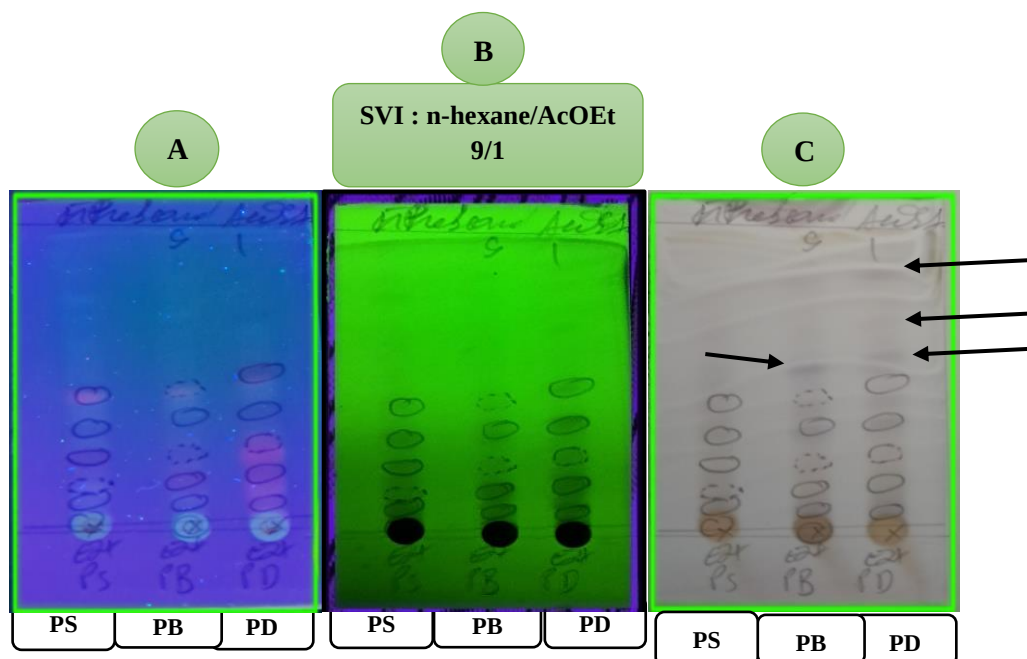


Figure III.12 : CCM des extraits hydrométhanoliques des trois Extraits ; PS, PB et PD, développée dans le système de solvants SVI.
A : observée sous UV/365 nm, **B :** observée sous UV/254 nm, **C :** observée dans visible après révélation par la vanilline sulfurique.

Après pulvérisation des plaques de CCM avec la vanilline-sulfurique suivie d'un chauffage, les taches correspondant aux terpènes et aux stéroïdes apparaissent sous différentes colorations (violet, bleu et rose). Ces résultats confirment la présence de ces composés dans les trois échantillons végétaux étudiés. Toutefois, les différences observées au niveau du nombre et de l'intensité des taches suggèrent une variation de leur abondance relative selon la provenance des plantes.

Le criblage phytochimique par CCM a confirmé la présence des polyphénols, des flavonoïdes, des coumarines et des terpènes et stéroïdes dans les trois échantillons étudiés. L'absence des alcaloïdes a été également affirmée.

III.2. Détermination de rendement d'extraction

Le résultat de la détermination de rendements des extraits hydrométhanoliques obtenus par macération sont reportés dans le **tableau III.4**.

Tableau III.4 : Rendements des extraits hydrométhanoliques obtenus par Macération dans le mélange hydrométhanolique MeOH/Eau : 7:3 V/V.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
PD	Pâteux	Marron foncé	14,95
PB	Pâteux	Marron foncé	8,3
PS	Pâteux	Marron foncé	10,5

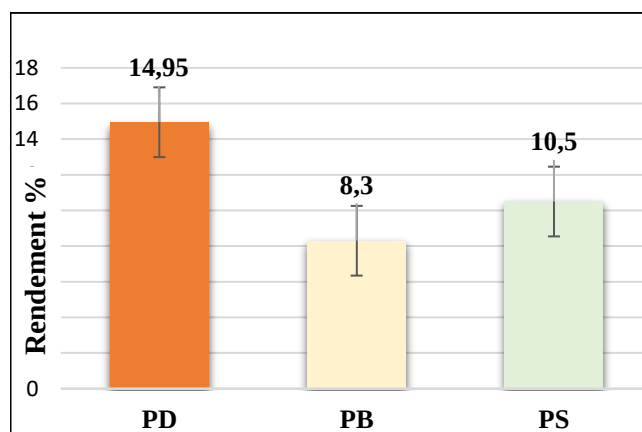


Figure III.13 : Rendements des extraits hydrométhanoliques obtenus par macération.

À partir des résultats obtenus (**Tableau III.4**), on peut conclure le suivant :

- L'extrait PD donne le rendement le plus élevé par la méthode d'extraction par macération en utilisant le mélange hydrométhanolique MeOH/Eau : 7:3 V/V, suivies par PS puis PB.
- L'aspect et la couleur similaires des extraits hydrométhanoliques (HMeOH) obtenus à partir des trois échantillons végétaux suggèrent une composition chimique globalement comparable.

III.3. Analyse quantitative

III.3.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits hydrométhanoliques obtenus par macération ont été évaluées afin d'estimer leur richesse en composés phénoliques. Les résultats, exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) pour les polyphénols et en mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait) pour les flavonoïdes, sont présentés dans le **tableau III.5**. Les quantités de ces composés dans les échantillons PS, PB et PD ont été déterminées à partir des courbes d'étalonnage établies respectivement avec l'acide gallique et la quercétine (**Figures III.14 et III.15**).

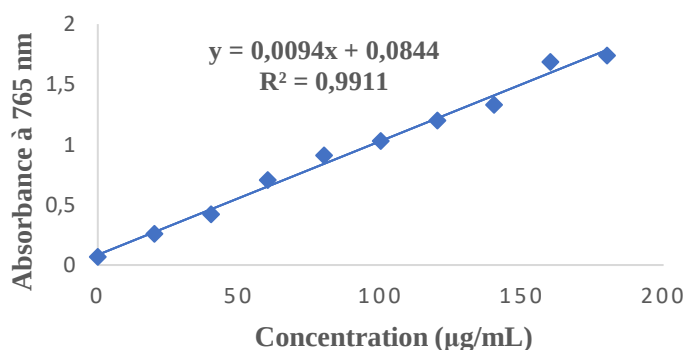


Figure III.14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

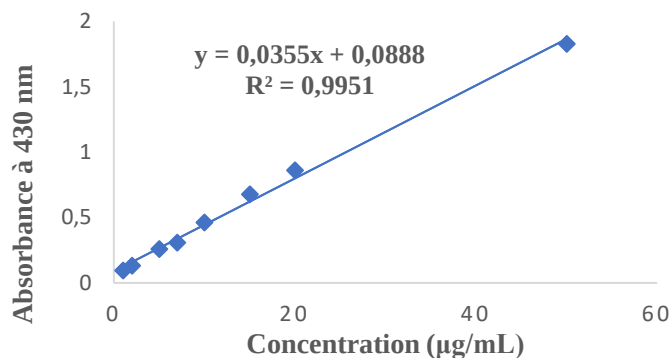


Figure III.15 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Tableau III.5 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits hydrométhanolique. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ SD de 3 répétitions.

Extrait	Concentrations des polyphénols mgEAG/g d'extrait	Concentrations des flavonoïdes mgEQ/g d'extrait
PD	168,89 $\pm$ 16,34	11,49 $\pm$ 0,58
PB	145,67 $\pm$ 6,44	9,03 $\pm$ 1,15
PS	110,17 $\pm$ 7,546	15,92 $\pm$ 0,85

Les variations des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux observées entre les échantillons PS, PB et PD (**tableau III.5**) peuvent être attribuées aux différences des conditions environnementales des sites de récolte.

L'échantillon PD (Djelfa) présente la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (168,89 $\pm$ 16,34 mgEAG/g d'extrait). Cette richesse pourrait être liée aux conditions de stress sévère de cette région, notamment le déficit hydrique, les températures extrêmes et le fort rayonnement solaire, qui stimulent la biosynthèse des composés phénoliques [6].

L'échantillon PS (Sétif) se distingue par la teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux (15,92 $\pm$ 0,85 mgEQ/g d'extrait). Les conditions environnementales plus favorables, caractérisées par une meilleure disponibilité en eau et un sol plus fertile, semblent favoriser la synthèse de cette famille de composés, contrairement à ce qui a été trouvé chez *Artemisia annua* et *Hypericum brasiliense*, le stress hydrique a entraîné une augmentation de la teneur en quercétine et la rutine [7].

L'échantillon PB (Batna) présente des teneurs intermédiaires en polyphénols totaux ($145,67 \pm 6,44$ mgEAG/g d'extrait) et les plus faibles teneurs en flavonoïdes totaux ($9,03 \pm 1,15$ mgEQ/g d'extrait), reflétant l'influence combinée de l'altitude, du froid, rayonnement UV et du stress hydrique sur le métabolisme secondaire de la plante [8].

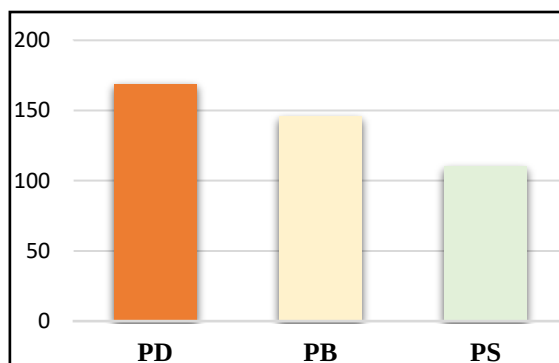


Figure III.16 : Quantité de polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait).

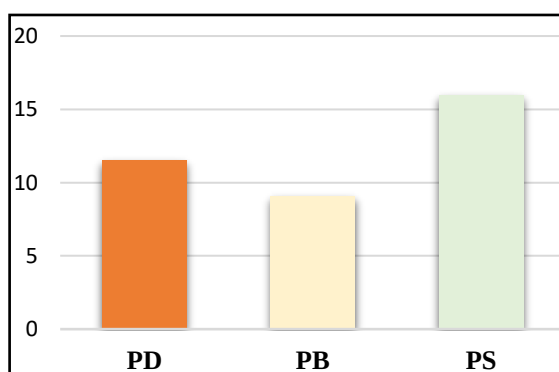


Figure III.17 : Quantité de flavonoïdes totaux (mg EQ/g d'extrait).



Figure III.18 : Spectrophotomètre UV-visible utilisé pour la mesure des absorbances.

III.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hyrométhanoliques

III.4.1. Test au DPPH

III.4.1.1. Pourcentage d'inhibition de DPPH

Les résultats obtenus par ce test permettent de tracer les graphes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour les trois extraits hydrométhanoliques obtenus par macération des trois plantes ; PS, PB et PD, ainsi que le BHA, qui est le contrôle positif (**Figure III.19 et III.20**). Les pourcentages d'inhibition de DPPH des trois extraits HMeOH et le témoin positif BHA sont reportés dans le **tableau III.6**.

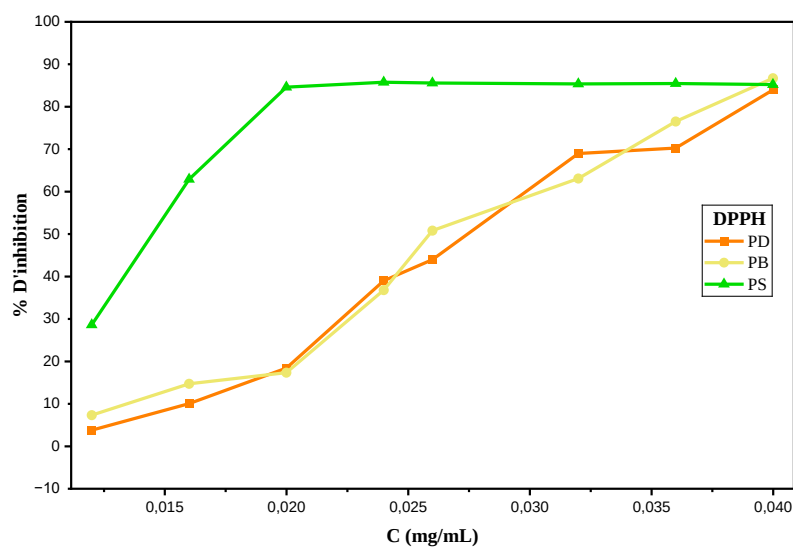


Figure III.19 : Pourcentage d'inhibition de DPPH en présence de différentes concentrations des trois extraits HMeOH. Chaque point représente la moyenne de trois répétitions $\pm$ SD (n = 3).

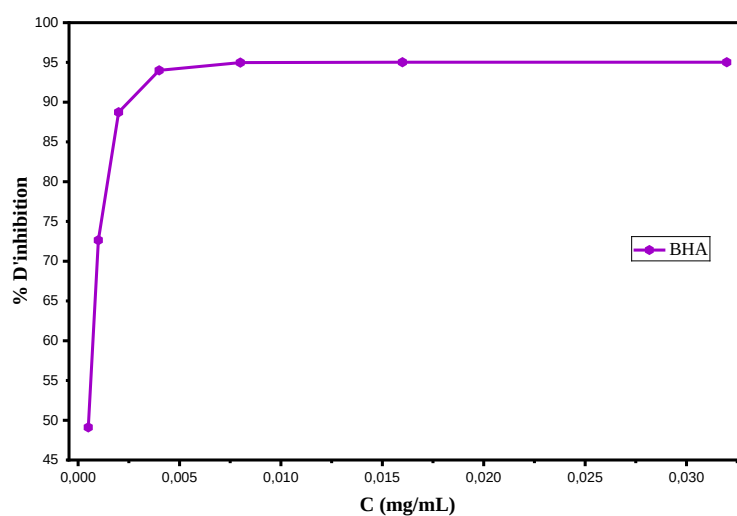


Figure III.20 : Pourcentage d'inhibition de DPPH en présence de différentes concentrations du BHA. Chaque point représente la moyenne de trois répétitions $\pm$ SD (n = 3).

Tableau III.6 : Pourcentages d'inhibition de DPPH avec les moyennes $\pm$ SD pour les trois extraits hydrométhanoliques ainsi que le BHA.

[C] Externe (mg/mL)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3
[C] Interne (mg/mL)	0,039	0,035	0,031	0,026	0,024	0,019	0,016	0,012
PI% PD	83,98 $\pm$ 0,28	70,24 $\pm$ 0,75	68,98 $\pm$ 0,89	43,96 $\pm$ 0,92	38,99 $\pm$ 0,65	18,39 $\pm$ 0,81	10,03 $\pm$ 0,56	3,77 $\pm$ 0,65
PI% PB	86,73 $\pm$ 0,18	76,53 $\pm$ 0,52	63,08 $\pm$ 0,69	50,01 $\pm$ 0,79	36,77 $\pm$ 0,58	17,34 $\pm$ 0,49	14,70 $\pm$ 0,31	7,31 $\pm$ 0,87
PI% PS	85,20 $\pm$ 0,14	85,64 $\pm$ 0,07	85,37 $\pm$ 0,07	85,59 $\pm$ 0,19	85,76 $\pm$ 0,07	84,60 $\pm$ 0,27	62,88 $\pm$ 0,453	28,60 $\pm$ 0,58
[C] BHA Externe (mg/mL)	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	
[C] Interne (mg/mL)	0,031995	0,015997	0,007998	0,003999	0,001999	0,000999	0,000499	
PI% BHA	95,02 $\pm$ 0,23	95,38 $\pm$ 0,41	94,97 $\pm$ 0,08	94,00 $\pm$ 0,31	88,73 $\pm$ 0,89	72,63 $\pm$ 2,06	49,09 $\pm$ 0,76	

Les **figures III.19** et **III.20** mettent en évidence une activité antioxydante notable des trois extraits hydrométhanoliques ainsi que le standard (BHA) *vis-à-vis* du radical DPPH. Pour l'ensemble des échantillons, l'augmentation de la concentration s'accompagne d'une augmentation du pourcentage d'inhibition.

L'examen des courbes montrées dans la **figure III.19** et les résultats présentés dans le **tableau III.6**, permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Les valeurs maximales d'inhibition sont observées aux concentrations les plus élevées testées. Ainsi, l'extrait HMeOH de PB présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé (86,73 $\pm$ 0,178 %) à une concentration de 0,039 mg/mL, suivi de l'extrait PS avec un pourcentage d'inhibition de 85,76 $\pm$ 0,07 % obtenu à une concentration de 0,024 mg/mL. L'extrait PD atteint quant à lui une inhibition maximale de 83,98 $\pm$ 0,28 % à une concentration de 0,039 mg/mL.
- L'extrait PS se distingue toutefois par sa capacité à maintenir des pourcentages d'inhibition élevés sur une large gamme de concentrations, contrairement aux extraits PD et PB dont l'activité diminue plus rapidement lorsque la concentration décroît. Cette

observation suggère une meilleure efficacité antiradicalaire de l'extrait PS aux faibles concentrations.

- Le BHA, utilisé comme standard de référence, présente l'activité antioxydante la plus importante (**figure III.20**) avec un pourcentage d'inhibition maximal de $95,38 \pm 0,41\%$ à une concentration de $0,01599 \text{ mg/mL}$. Malgré cela, les trois extraits étudiés montrent une activité antiradicalaire appréciable, particulièrement l'extrait PS, ce qui pourrait être lié à sa richesse en composés phénoliques et flavonoïdiques.

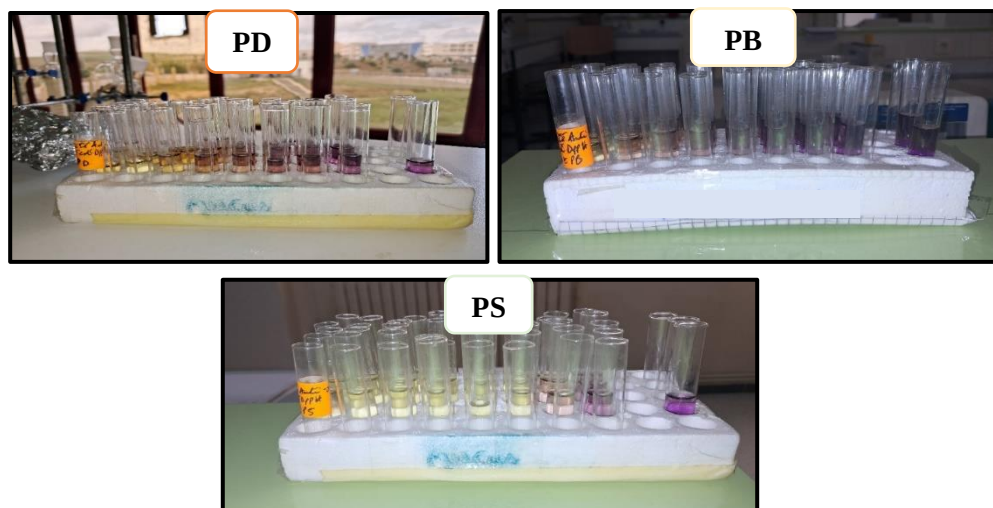


Figure III.21 : Résultats du test au DPPH en présence de différentes concentrations des trois extraits HMeOH.

III.4.1.2. Concentration inhibitrice à 50% des extraits (IC_{50})

Les deux paramètres, la concentration inhibitrice à 50 % (IC_{50}) et l'efficacité anti-radicalaire ($EA = 1/IC_{50}$) sont introduits pour mieux caractériser l'activité antioxydante. Les valeurs d' IC_{50} (**Figure III.22**) et les données de l'écart type $\pm SD$ obtenus par l'analyse statistique de la concentration inhibitrice à 50 % des extraits hydrométhanoliques étudiés et le BHA sont consignés dans le **tableau III.7**.

Tableau III.7 : Valeurs des IC_{50} et de l'efficacité anti-radicalaire EA des extraits hydroalcooliques et du témoin déterminé par le test au DPPH.

Extrait	$IC_{50} \text{ (mg/mL)}$	EA
PD	$0,0277 \pm 0,0015$	36,10
PB	$0,0277 \pm 0,00153$	36,10
PS	$0,0146 \pm 0,00011$	68,49
BHA	$0,00614 \pm 0,0004$	162,87

L'analyse des résultats présentés dans le **tableau III.7** et illustrés par la **figure III.22** met en évidence des différences d'activité antiradicalaire entre les extraits hydrométhanoliques étudiés, évaluées notamment par la concentration inhibitrice IC_{50} . Les extraits PD et PB présentent la même concentration inhibitrice IC_{50} ($0,0277 \pm 0,0015$ mg/mL), indiquant une capacité similaire à neutraliser le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). En revanche, l'extrait PS se distingue par une concentration inhibitrice plus faible ($0,0146 \pm 0,00011$ mg/mL), traduisant une activité antioxydante plus importante. Le BHA, utilisé comme référence, affiche la plus faible concentration inhibitrice IC_{50} ($0,0061 \pm 0,0004$ mg/mL) et constitue ainsi l'antioxydant le plus efficace parmi les échantillons testés.

Les valeurs de l'efficacité antiradicalaire (EA) confirment cette observation. L'extrait PS présente une efficacité de 68,49, supérieure à celles de PD et PB, qui sont identiques et égales à 36,10. Toutefois, cette activité reste inférieure à celle du BHA, dont l'efficacité antiradicalaire atteint 162,87.

À la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que :

- Les extraits PD et PB présentent des activités antiradicalaires similaires, traduites par des valeurs d' IC_{50} proches et des efficacités antioxydantes comparables.
- L'extrait PS se distingue par une activité antioxydante plus élevée, mise en évidence par une concentration inhibitrice plus faible et une efficacité antiradicalaire supérieure à celles des deux autres extraits.
- Cette différence d'activité peut être corrélée à la composition phytochimique des extraits, notamment à la teneur plus élevée en flavonoïdes dans PS ($15,92 \pm 0,85$ mg EQ/g d'extrait) par rapport à PD ($11,49 \pm 0,578$ mg EQ/g d'extrait) et PB ($9,03 \pm 1,15$ mg EQ/g d'extrait). Les flavonoïdes, connus pour leur pouvoir antioxydant, jouent probablement un rôle important dans la capacité de l'extrait PS à neutraliser les radicaux libres.
- Globalement, l'extrait PS apparaît comme le plus performant parmi les trois échantillons étudiés, bien que son activité reste inférieure à celle du BHA.

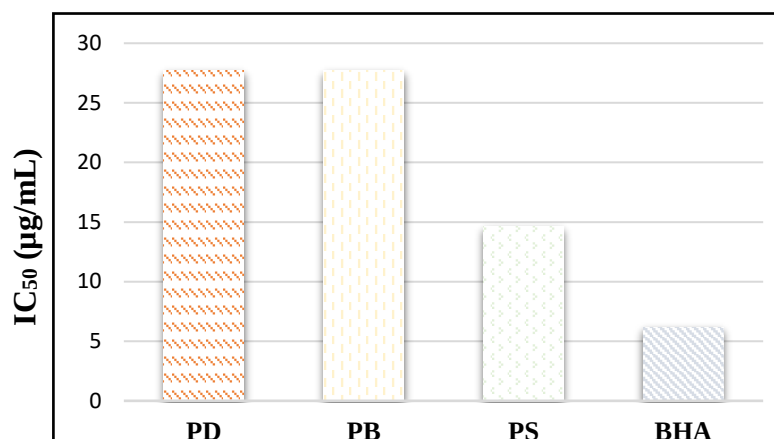


Figure III.22 : Histogramme correspondant à la concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) déterminées par le test au DPPH pour le BHA et les extraits HMeOH (moyenne $\pm$ SD).

III.4.1.3. Corrélation entre efficacité anti-radicalaire déterminée par le test au DPPH et la teneur en flavonoïdes totaux

Un coefficient de corrélation a été établi entre la teneur en flavonoïdes totaux des extraits hydrométhanoliques de la plante étudiée et leur activité antiradicalaire évaluée par le test au DPPH, exprimée par l'efficacité antiradicalaire (EA). La droite de régression obtenue (**Figure III.23**) est décrite par l'équation : $y = 5,0099x - 13,968$ avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,875$.

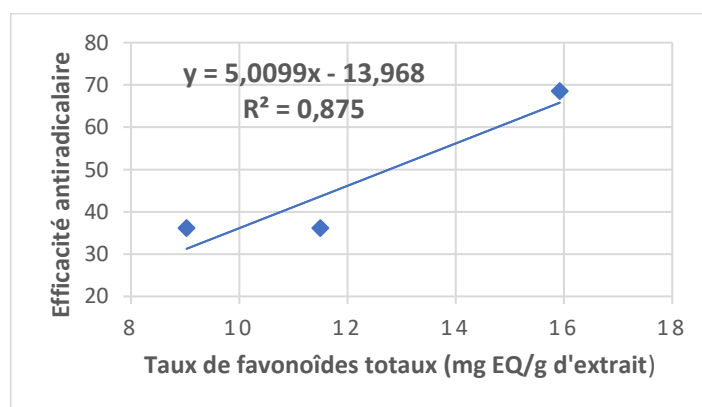


Figure III.23 : Corrélation entre flavonoïdes totaux et l'efficacité anti-radicalaire déterminée par le test au DPPH.

La relation entre la teneur en flavonoïdes totaux et l'activité antiradicalaire évaluée par le test au DPPH des extraits hydrométhanoliques de PD, PB et PS a été étudiée à l'aide d'une analyse de corrélation. La droite de régression obtenue ($y = 5,0099x - 13,968$) est caractérisée par un coefficient de détermination élevé ($R^2 = 0,875$), indiquant l'existence d'une forte corrélation entre ces deux paramètres.

Cette valeur montre que 87,5 % de l'activité antiradicalaire observée peut être attribuée à la teneur en flavonoïdes totaux des extraits. Ces résultats suggèrent donc que les flavonoïdes jouent un rôle majeur dans la capacité des extraits à piéger le radical libre DPPH. Ces résultats concordent avec ceux reportés dans la littérature [9-13].

Toutefois, la corrélation n'étant pas totale, d'autres composés bioactifs présents dans les extraits peuvent également intervenir dans l'activité antiradicalaire observée. Il pourrait notamment s'agir d'autres composés phénoliques ou d'effets synergiques entre les différents métabolites secondaires [14].

Globalement, les résultats mettent en évidence une corrélation significative entre la teneur en flavonoïdes totaux et l'activité antiradicalaire des extraits hydrométhanoliques de PD, PB et PS déterminée par le test au DPPH.

En conclusion, les extraits étudiés présentent tous une activité antioxydante appréciable, avec une efficacité plus marquée pour l'échantillon PS. Les différences observées entre PS, PB et PD suggèrent des variations dans leur composition phytochimique, notamment en composés phénoliques. Ces résultats favorisent la poursuite des recherches afin d'identifier et de valoriser les composés bioactifs responsables de cette activité antioxydante.

III.4.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS $^{\cdot+}$

III.4.2.1. Pourcentage d'inhibition du cation radical ABTS $^{\cdot+}$

La mesure du pourcentage d'inhibition du cation radical ABTS $^{\cdot+}$ des trois extraits HMeOH a été réalisée par comparaison avec le standard positif BHT. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau III.8** et la **figure III.24** et **III.25**.

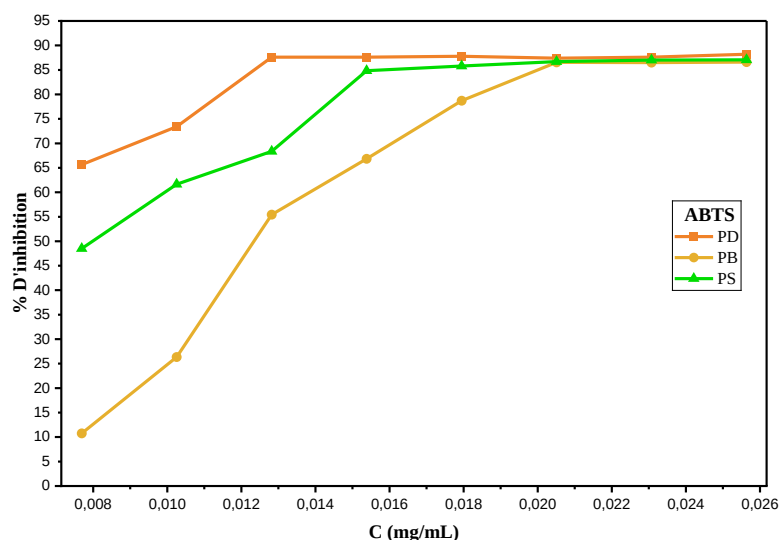


Figure III.24 : Pourcentage d'inhibition du cation radical ABTS $^{\cdot+}$ en présence de différentes concentrations des trois extraits HMeOH. Chaque point représente la moyenne de trois répétitions $\pm$ SD (n = 3).

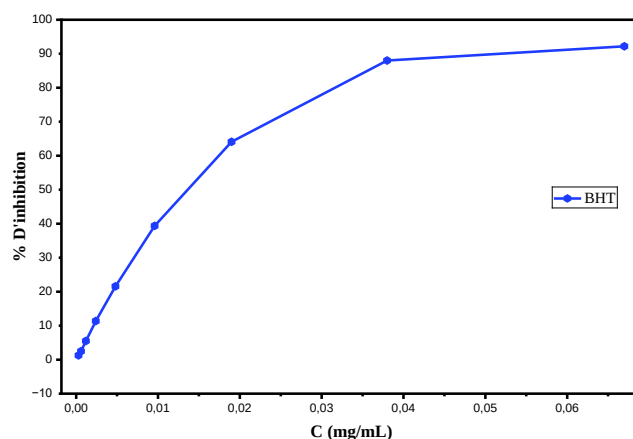


Figure III.25 : Pourcentage d'inhibition du cation radical ABTS $^{\cdot+}$ en présence de différentes concentrations du BHT. Chaque point représente la moyenne de trois répétitions $\pm$ SD (n = 3).

Tableau III. 8 : Pourcentages d'inhibition du cation radical ABTS $^{\cdot+}$ avec les moyennes $\pm$ SD pour les trois extraits hydrométhanoliques ainsi que le BHT.

[C] Externe (mg/mL)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3
[C] Interne (mg/mL)	0,025	0,023	0,020	0,017	0,015	0,012	0,010	0,007
PI% PD	88,21 $\pm$ 0,16	87,61 $\pm$ 0,34	87,40 $\pm$ 0,16	87,77 $\pm$ 0,49	87,61 $\pm$ 0,34	87,61 $\pm$ 0,34	66,67 $\pm$ 0,41	54,82 $\pm$ 0,73
PI% PB	86,59 $\pm$ 0,16	86,48 $\pm$ 0,09	86,54 $\pm$ 0,09	78,71 $\pm$ 0,42	66,82 $\pm$ 0,64	55,42 $\pm$ 0,64	26,34 $\pm$ 0,57	10,72 $\pm$ 0,16
PI% PS	87,07 $\pm$ 0,56	87,02 $\pm$ 0,40	86,69 $\pm$ 0,40	85,79 $\pm$ 0,40	84,84 $\pm$ 0,33	68,36 $\pm$ 0,32	61,63 $\pm$ 0,72	48,49 $\pm$ 0,47
[C] BHT Externe (mg/mL)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,032	0,016
[C] Interne (mg/mL)	0,067	0,038	0,019	0,0096	0,0048	0,0024	0,0012	0,0006
PI% BHT	92,187 $\pm$ 0,477	87,990 $\pm$ 0,893	64,093 $\pm$ 0,612	39,338 $\pm$ 1,836	21,538 $\pm$ 0,834	11,336 $\pm$ 0,323	5,484 $\pm$ 0,053	2,45 $\pm$ 0,665

Les résultats du **tableau III.8** et de la **figure III.24** et **III.25** montrent que les trois extraits hydrométhanoliques ainsi que le BHT possèdent une capacité à inhiber le cation radical ABTS $^{\cdot+}$.

Globalement, le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits. L'extrait HMeOH de PD présente l'activité antioxydante la plus élevée parmi les extraits étudiés. Il atteint un pourcentage d'inhibition maximal de 88,21 $\pm$ 0,16 % à une concentration de 0,025 mg/mL et conserve une activité élevée sur une large gamme de

concentrations. L'extrait PS montre également une activité importante, avec un pourcentage d'inhibition maximal de $87,07 \pm 0,56$ % à la même concentration. Quant à l'extrait PB, il présente une inhibition maximale de $86,59 \pm 0,16$ %, mais son activité diminue plus rapidement lorsque la concentration diminue.

Le BHT, utilisé comme contrôle positif, présente un pourcentage d'inhibition maximal de $92,187 \pm 0,477$ % à une concentration de 0,067 mg/mL.

L'analyse des résultats obtenus permet de conclure que :

- Les extraits hydrométhanoliques de PD, PS et PB présentent une activité antioxydante importante *vis-à-vis* du cation radical $ABTS^{\cdot+}$.
- L'extrait PD possède le meilleur pouvoir antioxydant, suivi de PS puis de PB.
- Les extraits PD et PS maintiennent des pourcentages d'inhibition élevés sur une large gamme de concentrations, traduisant une bonne capacité à neutraliser le radical $ABTS^{\cdot+}$.
- Le BHT a présenté l'activité antioxydante la plus élevée dans les conditions expérimentales utilisées, tandis que les trois extraits hydrométhanoliques ont montré une activité antiradicalaire importante, mais inférieure à celle du standard.
- L'activité antioxydante observée pourrait être attribuée à la présence de composés phénoliques et flavonoïdiques dans les extraits.



Figure III.26 : Résultats du test à l' $ABTS^{\cdot+}$.

III.4.2.2. Concentration inhibitrice à 50% des extraits (IC_{50})

Les valeurs d' IC_{50} (**Figure III.27**) et les données de l'écart type $\pm SD$ obtenus par l'analyse statistique de la concentration inhibitrice à 50 % des extraits hydrométhanoliques étudiés et le BHT sont consignés dans le **tableau III.9**.

Tableau III.9 : Valeurs de l'IC₅₀ et de l'efficacité antiradicalaire (EA) des extraits hydrométhanoliques et du témoin positif (BHT) déterminées par le test à l'ABTS^{•+}.

Extrait	IC ₅₀ (mg/mL)	EA
PD	0,0059±0,00135	169,491
PB	0,0167±0,00015	59,880
PS	0,0068±0,00135	147,058
BHT	0,00129±0,0003	775,193

L'analyse des résultats présentés dans le **tableau III.9** et illustrés par la **figure III.27** met en évidence des différences d'activité antiradicalaire entre les extraits hydrométhanoliques étudiés *vis-à-vis* du radical ABTS^{•+}. L'extrait PD présente une concentration inhibitrice à 50 % (IC₅₀) de 0,0059±0,00135 mg/mL, légèrement inférieure à celle de l'extrait PS (0,0068±0,00135 mg/mL), traduisant ainsi une activité antioxydante plus importante. En revanche, l'extrait PB affiche une valeur d'IC₅₀ plus élevée (0,0167±0,00015 mg/mL), indiquant une capacité plus faible à neutraliser le radical ABTS^{•+}.

Les valeurs de l'efficacité antiradicalaire (EA) confirment ces résultats. L'extrait PD présente l'efficacité la plus élevée (169,491), suivi de PS (147,058), tandis que PB montre l'efficacité la plus faible (59,880).

Le BHT, utilisé comme témoin positif, possède la plus faible valeur d'IC₅₀ (0,00129±0,0003 mg/mL) et la plus forte efficacité antiradicalaire (775,193), ce qui confirme son activité antioxydante supérieure à celle des extraits étudiés.

Les résultats obtenus permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Les extraits PD et PS présentent des activités antiradicalaires importantes et relativement proches *vis-à-vis* du radical ABTS^{•+}.
- L'extrait PD possède le meilleur pouvoir antioxydant parmi les extraits étudiés, comme en témoignent sa plus faible valeur d'IC₅₀ et sa plus forte efficacité antiradicalaire.
- L'extrait PB présente l'activité antiradicalaire la plus faible des trois échantillons.
- Bien que les extraits étudiés possèdent une activité antioxydante appréciable, celle-ci demeure inférieure à celle du BHT utilisé comme référence.
- Les différences observées entre les extraits pourraient être attribuées à des variations de leur composition phytochimique, notamment en composés phénoliques et flavonoïdiques.

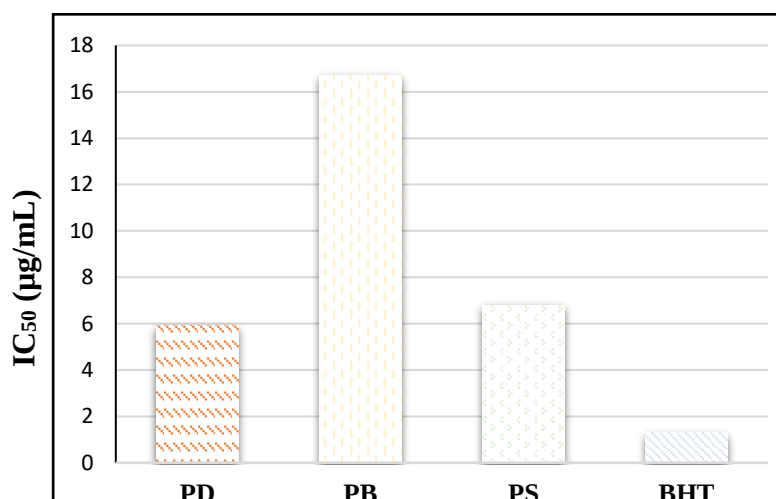


Figure III.27 : Histogramme correspondant à la concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) du radical cationique ABTS^{•+} avec $\pm$ SD du BHT et des extraits hydrométhanoliques.

III.4.2.3. Corrélation entre efficacité anti-radicalaire déterminée par le test à l'ABTS^{•+} et la teneur en flavonoïdes totaux

Afin d'évaluer l'influence des flavonoïdes sur l'activité antiradicalaire, une analyse de corrélation a été réalisée entre la teneur en flavonoïdes totaux des extraits hydrométhanoliques et leur efficacité antiradicalaire (EA) déterminée par le test au radical ABTS^{•+}. La relation obtenue est représentée par la droite de régression de la **figure III.28**, dont l'équation est :

$$y = 10,556x - 2,7683 \text{ avec un coefficient de détermination } R^2 = 0,4052.$$

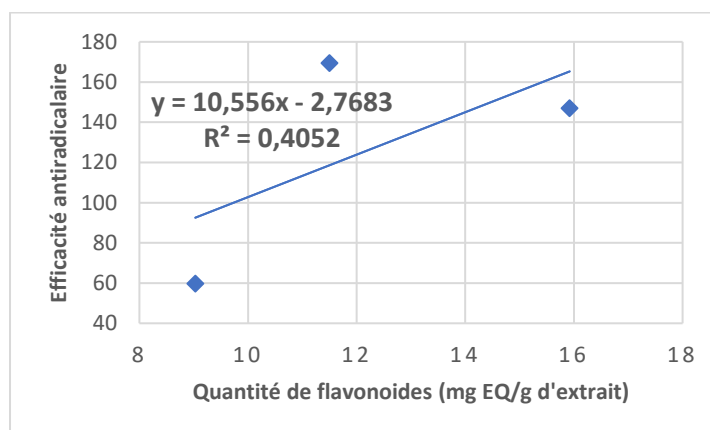


Figure III.28 : Corrélation entre flavonoïdes totaux et l'efficacité anti-radicalaire mesurée par le test au radical cationique ABTS^{•+}.

La valeur de R^2 indique que 40,52 % de la variation de l'activité antiradicalaire *vis-à-vis* du radical ABTS^{•+} peut être expliquée par la teneur en flavonoïdes totaux. Les flavonoïdes contribuent donc à l'activité antioxydante des extraits, mais leur contribution demeure limitée.

La faible valeur de R^2 suggère que d'autres composés bioactifs présents dans les extraits participent également à la neutralisation du radical $ABTS^{\cdot+}$. Il peut notamment s'agir des polyphénols non flavonoïdiques ou d'autres métabolites secondaires agissant seuls ou en synergie.

Globalement, ces résultats montrent que l'activité antiradicalaire mesurée par le test $ABTS^{\cdot+}$ ne dépend pas exclusivement de la teneur en flavonoïdes totaux, mais résulte probablement de l'action combinée de plusieurs familles de composés antioxydants présentes dans les extraits.

À l'issue de cette étude, les analyses phytochimiques ont révélé la présence de plusieurs familles de métabolites secondaires dans les extraits hydrométhanoliques des échantillons récoltés à Sétif (PS), Batna (PB) et Djelfa (PD). Les dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux ont mis en évidence des variations liées à l'origine géographique des échantillons. Les tests au DPPH et à l' $ABTS^{\cdot+}$ ont montré une activité antioxydante importante des trois extraits, tandis que les analyses de corrélation ont souligné l'implication des composés flavonoïdiques dans cette activité. Ces résultats confirment le potentiel de cette plante comme source naturelle de composés bioactifs présentant un intérêt antioxydant.

III.5. Références bibliographiques

- [1] Fadili K., Amalich S., Soro KN., Bouachrine M., Mahjoubi M., El hilali F., Zair T. (2015). Polyphenols content and antioxidant of two species from Moroccan high Atlas: *Rosmarinus Officinalis* and *Thymus Satureioides*. *Journal of innovation and scientific research*, 17, 24–33.
- [2] Markham K. R., (1992), Techniques of flavonoid identification biological techniques series, Ed. Treherme J. E., Rubery P. H., (p. 113). Academic Press, London.
- [3] Harborne J. B., Williams C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55 (6), 481–504.
- [4] Georgievskii V. P., Komissarenko N. F., Dmitrouk S. E. (1990). Substances bioactives des plantes médicinales, (p. 336). « Naouka » Novosibirsk.
- [5] Guy B. K., Janat Akhanovna M.-B., Odette D. D., Jonathan G. S, Yves-Alain B. (2010). On the qualitative phytochemical composition of crude hydromethanolic extracts of the Leaves of 6 varieties of *Manihot Esculenta* Crantz of Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*, 45(2), 200–211.
- [6] Selmar D., Kleinwächter M. (2013). Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crop Production*, 42, 558–566.
- [7] De Abreu I. N., Mazzafera P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3), 241–248.
- [8] Khalid, K. A. (2006). Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). *International Agrophysics*, 20(4), 289–296.
- [9] Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., (2006), Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660.
- [10] Wong C. C., Li H. B., Cheng K. W., Chen F. A. (2006). Systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97, 705–711.
- [11] Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F., Polat G. (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12, 484–496.
- [12] Wojdylo A., Oszmianski J., Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940–949.

- [13] Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S., Khebri S., (2010), Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11, 69–80.
- [14] Evenamede K. S., Kpegba K., Simalou O., Boyode P., Agbonon A., Gbeassor M. (2017). Etude comparative des activités antioxydantes d'extraits éthanoliques de feuilles, d'écorces et de racines de *Cassia sieberiana*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(6), 2924–2935.

Conclusion

Conclusion

Depuis toujours, les plantes médicinales occupent une place importante dans la recherche de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. Leur richesse en métabolites secondaires représente une source précieuse de composés bioactifs pouvant être valorisés dans différents domaines, notamment en pharmacie, en nutrition et en cosmétique. Dans cette optique, l'étude de la composition phytochimique de plantes provenant de différentes zones géographiques permet de mieux comprendre l'influence des conditions environnementales sur leur potentiel biologique.

Le présent travail consiste en une étude phytochimique comparative visant à déterminer la composition chimique, les teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux ainsi que l'activité antioxydante d'une plante médicinale appartenant à la famille des Lamiaceae, récoltée dans trois régions différentes d'Algérie : Djelfa (PD), Batna (PB) et Sétif (PS). Cette étude a pour objectif d'évaluer l'influence de la provenance géographique sur la répartition des métabolites secondaires, d'identifier l'échantillon le plus riche en composés phénoliques et présentant la meilleure activité antioxydante, et de mettre en évidence les métabolites secondaires susceptibles d'être à l'origine de ces activités biologiques.

Les résultats du criblage phytochimique ont montré que les trois échantillons étudiés renferment une grande diversité de composés bioactifs. Les saponosides, les polyphénols et les tanins catéchiques ont été fortement mis en évidence dans l'ensemble des échantillons, traduisant leur richesse en ces métabolites d'intérêt. Les triterpènes et les stérols ont également été détectés dans les trois provenances, avec des intensités relativement proches.

À l'inverse, les alcaloïdes et les tanins galliques n'ont été détectés dans aucun des échantillons analysés. D'autres métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, les coumarines, les anthocyanes et les anthraquinones, ont présenté des variations selon la région de récolte. L'échantillon provenant de Sétif (PS) s'est distingué par une teneur plus importante en flavonoïdes, alors que celui de Batna (PB) en contenait moins. Les anthocyanes ainsi que les anthraquinones libres étaient davantage représentées dans l'échantillon de Djelfa (PD). Quant aux anthraquinones O-hétérosides, elles étaient particulièrement abondantes dans les échantillons PD et PS, contrairement à l'échantillon PB où leur présence était plus faible. Les coumarines ont été retrouvées dans les trois échantillons, avec une intensité modérée dans les échantillons de Djelfa et de Sétif. Ainsi, la détermination des grands groupes chimiques de cette plante contribue à leur valorisation dans le projet d'une meilleure exploitation.

La quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux a été réalisée sur les extraits hydrométhanoliques des échantillons végétaux de cette espèce, obtenus par

Conclusion

macération. Les résultats ont montré que l'extrait PD présentait le rendement d'extraction le plus élevé (14,95 %), suivi des extraits PS (10,5 %) et PB (8,3 %). De plus, l'extrait PD a révélé la teneur en polyphénols totaux la plus importante, avec une valeur de $168,89 \pm 16,34$ mg EAG/g d'extrait, contre $145,67 \pm 6,44$ mg EAG/g d'extrait pour l'échantillon PB et $110,17 \pm 7,55$ mg EAG/g d'extrait pour l'échantillon PS.

D'autre part, l'extrait hydrométhanolique PS s'est distingué par la teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux, soit $15,92 \pm 0,85$ mg EQ/g d'extrait, comparativement aux extraits PD et PB qui ont présenté des teneurs respectives de $11,49 \pm 0,58$ mg EQ/g d'extrait et $9,03 \pm 1,15$ mg EQ/g d'extrait.

Le test du DPPH a montré que les extraits hydrométhanoliques présentent une activité antioxydante variable selon l'origine géographique. L'extrait PS est le plus actif avec une IC_{50} de $0,0146 \pm 0,00011$ mg/mL, suivi des extraits PD et PB qui présentent des valeurs identiques de $0,0277 \pm 0,0015$ et $0,0277 \pm 0,00153$ mg/mL. Le BHA, utilisé comme référence, reste plus actif avec une IC_{50} de $0,00614 \pm 0,0004$ mg/mL.

Cependant, l'activité antioxydante de ces extraits est en grande partie liée à leur contenu phénolique. L'étude a montré que 87,5 % de la capacité de piégeage du radical DPPH[•] est attribuée à la contribution des composés flavonoïdiques, qui constituent les principaux antioxydants présents dans ces extraits.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test ABTS^{•+} a montré une différence nette entre les extraits hydrométhanoliques des trois échantillons étudiés. L'extrait PD présente la meilleure activité avec une IC_{50} de $0,0059 \pm 0,00135$ mg/mL, suivi par l'extrait PS ($0,0068 \pm 0,00135$ mg/mL), tandis que l'extrait PB montre une activité plus faible avec une IC_{50} de $0,0167 \pm 0,00015$ mg/mL. En comparaison, le BHT, utilisé comme référence, reste le plus actif avec une IC_{50} de $0,00129 \pm 0,0003$ mg/mL.

L'étude de la corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et l'activité antioxydante a montré une relation faible, avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,4052$. Ce résultat indique que les flavonoïdes ne sont pas les seuls responsables de cette activité antioxydante observée, et que d'autres composés bioactifs présents dans les extraits peuvent également contribuer à cette activité.

Les résultats montrent que les échantillons étudiés sont riches en métabolites secondaires et présentent une activité antioxydante remarquable. Des différences ont été observées selon l'origine géographique, indiquant l'influence des conditions

Conclusion

environnementales sur la composition chimique et l'activité biologique. Ces résultats mettent en évidence l'intérêt de poursuivre l'étude pour identifier les composés responsables de cette activité et explorer leurs applications potentielles.

En perspective, plus de travail sera fait dans la continuité du travail entamé :

- Analyser qualitativement ces trois extraits HMeOH obtenus par des méthodes performantes comme l'CLHP/MS et l'CLHP/RMN (dérivatisation).
- Evaluer d'autres tests antioxydants et d'autres activités biologiques : antibactérienne, anti-inflammatoire, antifongique, anti-AGEs...
- Isoler de nouvelles molécules qui sont probablement à l'origine de cette importante activité antioxydante.

Résumé

Le présent travail est une étude phytochimique comparative d'une plante médicinale de la famille des Lamiaceae récoltée dans trois régions d'Algérie : Djelfa (PD), Batna (PB) et Sétif (PS). Elle vise à déterminer la composition chimique, les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux, ainsi que l'activité antioxydante afin d'évaluer l'influence de l'origine géographique. Le criblage phytochimique a révélé que les trois échantillons sont riches en métabolites secondaires (saponosides, polyphénols, tanins catéchiques, triterpènes, stérols, flavonoïdes, coumarines, anthocyanes et anthraquinones), avec des variations selon les régions, tandis que les alcaloïdes et les tanins galliques sont absents. L'étude quantitative a révélé que le rendement d'extraction le plus élevé est obtenu pour l'échantillon PD (14,95 %), suivi de PS (10,5 %) et PB (8,3 %). Les teneurs en polyphénols totaux sont les plus élevées dans l'extrait PD ($168,89 \pm 16,34$ mg EAG/g d'extrait), suivies de PB ($145,67 \pm 6,44$ mg EAG/g d'extrait) puis PS ($110,17 \pm 7,55$ mg EAG/g d'extrait). En revanche, les flavonoïdes totaux sont plus abondants dans l'extrait PS ($15,92 \pm 0,85$ mg EQ/g d'extrait), comparé à PD ($11,49 \pm 0,58$ mg EQ/g d'extrait) et PB ($9,03 \pm 1,15$ mg EQ/g d'extrait). L'activité antioxydante varie selon les tests réalisés. Au test DPPH, PS présente la meilleure activité ($IC_{50} = 0,0146 \pm 0,00011$ mg/mL), suivi de PD et PB ($0,0277 \pm 0,0015$ mg/mL), avec une forte corrélation avec les flavonoïdes ($R^2 = 0,875$). Au test ABTS^{•+}, PD et PS présentent des activités proches ($0,0059 \pm 0,00135$ mg/mL et $0,0068 \pm 0,00135$ mg/mL), supérieures à PB ($0,0167 \pm 0,00015$ mg/mL), avec une corrélation plus faible avec les flavonoïdes ($R^2 = 0,4052$). Les résultats montrent que les flavonoïdes contribuent de manière variable à l'activité antioxydante selon le test utilisé, suggérant l'intervention d'autres composés bioactifs.

Mots clés : Screening phytochimique, CCM, Métabolites secondaires, Lamiaceae, Extraction, Polyphénols totaux, Flavonoïde totaux, Activité antioxydante.

Summary

This work is a comparative phytochemical study of a medicinal plant belonging to the Lamiaceae family collected from three regions in Algeria: Djelfa (PD), Batna (PB), and Sétif (PS). It aims to determine the chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, as well as the antioxidant activity in order to evaluate the influence of geographical origin. Phytochemical screening revealed that all three samples are rich in secondary metabolites, including saponins, polyphenols, condensed tannins, triterpenes, sterols, flavonoids, coumarins, anthocyanins, and anthraquinones, with variations according to the regions, while alkaloids and gallic tannins were absent. The highest extraction yield was observed for PD (14.95%), followed by PS (10.5%) and PB (8.3%). Total phenolic contents were highest in PD (168.89 ± 16.34 mg GAE/g of extract), followed by PB (145.67 ± 6.44 mg GAE/g of extract) and PS (110.17 ± 7.55 mg GAE/g of extract). In contrast, total flavonoid contents were higher in PS (15.92 ± 0.85 mg QE/g of extract) compared to PD and PB. Antioxidant activity varied depending on the assays performed. In the DPPH assay, PS showed the highest activity ($IC_{50} = 0.0146 \pm 0.00011$ mg/mL), followed by PD and PB (0.0277 mg/mL), with a strong correlation with flavonoids ($R^2 = 0.875$). In the ABTS⁺⁺ assay, PD and PS showed close activities (0.0059 ± 0.00135 and 0.0068 ± 0.00135 mg/mL), higher than PB (0.0167 ± 0.00015 mg/mL), with a weaker correlation with flavonoids ($R^2 = 0.4052$). The results indicate that flavonoids contribute variably to antioxidant activity depending on the assay used, suggesting the involvement of other bioactive compounds.

Key words: Phytochemical screening, TLC, Secondary metabolites, Asteraceae, Extraction, Total polyphenols, Total flavonoid, Antioxidant activity.

ملخص

هذا العمل عبارة عن دراسة كيميائية نباتية مقارنة لنبات طبي ينتمي إلى فصيلة الشفويات (Lamiaceae)، جُمعت عيناته من ثلاث مناطق جزائرية هي: الجلفة (PD)، باتنة (PB) وسطيف (PS). وتهدف هذه الدراسة إلى تحديد التركيب الكيميائي، وتقدير محتوى البوليفينولات الكلية والفلافونويدات الكلية، بالإضافة إلى تقييم النشاط المضاد للأوكسدة، وذلك لدراسة تأثير المنشأ الجغرافي على هذه الخصائص. أظهر الفحص الكيميائي النباتي أن العينات الثلاث غنية بالمستقلبات الثانوية، بما في ذلك الصابونينات، والبوليفينولات، والتانينات الكاتيشية، والترتربينات، والستيرولات، والفلافونويدات، والكومارينات، والأنثوسيانينات، والأنثراكينونات، مع وجود اختلافات تبعاً للمنطقة الجغرافية، في حين لوحظ غياب الفلويدات والتانينات الغالية في جميع العينات. أظهرت الدراسة الكمية أن أعلى مردود استخلاص للمستخلصات الهيدروميثانولية سُجل في العينة PD بنسبة 14.95 %، تلتها العينة PS بنسبة 10.5 % ثم العينة PB بنسبة 8.3 %. كما كانت أعلى تراكيز البوليفينولات الكلية في المستخلص PD، حيث بلغت 16.34 ± 168.89 ملغ مكافئ حمض الغاليك/غ من المستخلص، تليها العينة PB بقيمة 6.44 ± 145.67 ملغ مكافئ حمض الغاليك/غ من المستخلص، ثم العينة PS بقيمة 7.55 ± 110.17 ملغ مكافئ حمض الغاليك/غ من المستخلص. في المقابل، سُجلت أعلى تراكيز الفلافونويدات الكلية في المستخلص PS، حيث بلغت 0.85 ± 15.92 ملغ مكافئ الكيرسيتين/غ من المستخلص، مقارنةً بالمستخلصين PD و PB اللذين بلغا 0.58 ± 11.49 و 1.15 ± 9.03 ملغ مكافئ الكيرسيتين/غ من المستخلص، على التوالي. اختلف النشاط المضاد للأوكسدة باختلاف الاختبارات المستخدمة. ففي اختبار DPPH، أظهرت العينة PS أفضل نشاط مضاد للأوكسدة، حيث بلغت قيمة $IC_{50} 0.00011 \pm 0.0146$ ملغ/مل، تلتها العينتان PD و PB بقيم مقاربة بلغت 0.0015 ± 0.0277 ملغ/مل، مع وجود ارتباط قوي بين هذا النشاط ومحتوى الفلافونويدات ($R^2 = 0.875$). أما في اختبار $ABTS^{++}$ ، فقد أظهرت العينتان PD و PS نشاطاً متقارباً (0.00135 ± 0.0059) و 0.00135 ± 0.0068 ملغ/مل، على التوالي، وكان أعلى من نشاط العينة PB (0.00015 ± 0.0167 ملغ/مل)، مع وجود ارتباط ضعيف بين هذه الفعالية والفلافونويدات الكلية ($R^2 = 0.4052$). تشير النتائج إلى أن مساهمة الفلافونويدات في النشاط المضاد للأوكسدة تختلف باختلاف الاختبار المستخدم، مما يدل على احتمال تدخل مركبات حيوية أخرى في هذا النشاط.

الكلمات المفتاحية: فحص كيميائي نباتي، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، نواتج الأيض الثانوي، Lamiaceae، استخلاص، بوليفينولات كلية، فلافونويدات كلية، نشاط مضاد للأوكسدة.

Annexes

Annexe I.1: Méthodes d'extractions des produits naturels

Les produits naturels peuvent être extraits des plantes en utilisant les méthodes d'extractions suivantes :

1. Infusion: C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinales. Elle convient pour l'extraction de parties délicates ou finement hachées des plantes: feuilles, fleurs, graines, écorces et racines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles comme les huiles essentielles

2. Décoction: Elle convient pour l'extraction de matières végétales dur ou très dur : bois, écorce, racines, ou des plantes avec des constituants peu solubles (ex : l'acide silicique). Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 min, pour bien extraire les principes médicinales

3. Macération: un procédé qui consiste à laisser séjourner un solide (matière végétale) dans un liquide pendant plusieurs heures, voir plusieurs jours, pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Elle concerne aussi les plantes dont les substances actives risquent de disparaître ou de se dégrader sous l'effet de la chaleur par ébullition. C'est la méthode d'extraction préconisée par la médecine traditionnelle.

4. Hydrodistillation: C'est une pratique très ancienne utilisant la vapeur d'eau pour récupérer les principes volatiles. Développée par Jabir Ibn Hayyan (Geber 721-815) qui a rajouté l'alambic à l'ancien appareil de distillation pour la réfrigération, mais utilisée par Al Kindi (Alchindius 805 873) et Ibn Sina (Avicenne 980-1037) pour la préparation des parfums. Les eaux distillées ou hydrolats, sont obtenues par distillation de la plante (feuilles, tiges...), alors que les eaux florales sont obtenues de la même manière mais à partir des fleurs. De nos jours cette technique traditionnelle est encore utilisée à Constantine pour l'extraction de certaines plantes aromatiques.

5. Extraction à reflux (Soxhlet) : Cette méthode est considérée comme une méthode universelle pour l'extraction solide-liquide. L'extraction est effectuée à l'aide d'un petit appareil simple. Ce système est composé d'un ballon, d'un extracteur (réservoir) et d'un réfrigérant, la matière solide est introduit dans une cartouche de cellulose fixée sur un réservoir de solvant, le solvant chauffé est vaporisé puis condensé au niveau du réservoir (Figure I).

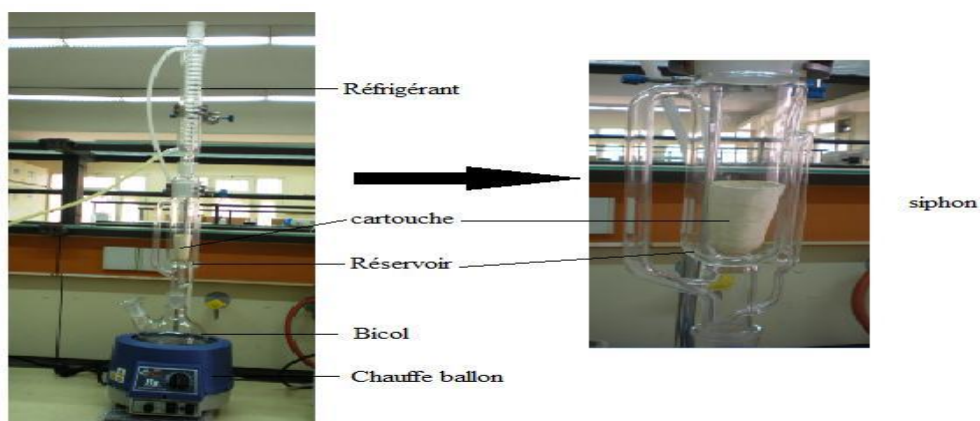


Figure I. : Photo d'un extracteur au Soxhlet.

6. Extraction assisté par ultrasons (EAU) : L'EAU est une technique peu onéreuse, utilisable avec n'importe quel type de solvant et simple à mettre en place. En effet, l'extraction peut être réalisée de manière très simple en utilisant un bain à ultra-sons, ce qui par-ailleurs permet d'effectuer plusieurs extractions simultanément ou via une sonde ultrasonore combinée à un agitateur.

Annexe I.2 : Méthodes d'analyses chromatographiques de produits naturels

Les méthodes utilisées pour la séparation et la purification des produits naturels sont généralement des méthodes chromatographiques telle que :

- 1. La chromatographie sur colonne:** est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif. Cette chromatographie est basée sur le même principe que la CCM, sauf que la silice est placée dans une colonne et non sur une plaque. Le but est toutefois différent: la chromatographie sur colonne sert à séparer des produits, soit à purifier un produit de réaction. C'est la méthode standard de purification dans un laboratoire de chimie organique.



Figure II: colonne de gel de silice.

2. La chromatographie sur couche mince (CCM): est une technique de chromatographie couramment utilisée pour analyser ou séparer les composants d'un extrait brut ou une fraction. Alors, elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents. Elle comprend : une phase stationnaire : une couche mince de matériel absorbant (usuellement du gel de silice, de l'oxyde d'aluminium, de la cellulose ou de la polyamide) et une phase liquide, dite phase mobile ou éluant : un solvant ou un mélange de solvants qui va entraîner les composés à séparer (ou à analyser) le long de la phase stationnaire.

3. La chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC: La chromatographie liquide à haute performance à **phase inverse** est une technique de séparation, dans laquelle la phase mobile est un liquide polaire (solvant), et la phase stationnaire est une colonne étroitement emballée par des particules **C18** (apolaire), ces particules ayant un diamètre moins de 10µm, ce qui nécessite de pomper la phase mobile à travers la colonne à haute pression. La pompe garde un débit précis de sorte que le temps de rétention de chaque pic peut être employé pour identifier des pics de l'échantillon à tester.

4. La chromatographie en phase gazeuse : Le rôle du chromatographe est de séparer les constituants d'un mélange. La chromatographie en phase gazeuse est réservée à l'analyse de composés relativement volatils et thermiquement stables. Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur. Il existe différents types de détecteurs mais le spectromètre de masse tend aujourd'hui à supplanter tous les autres car il est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés par chromatographie.

4.1. L'injecteur : L'injecteur est une zone chauffée où l'échantillon est introduit en solution au moyen d'une seringue puis vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Le gaz vecteur, classiquement de l'hélium, constitue la phase dite "mobile". Son rôle consiste à véhiculer les analytes depuis l'injecteur jusqu'au détecteur via la colonne analytique. La viscosité d'un gaz variant avec la température, la plupart des injecteurs sont aujourd'hui équipés d'un régulateur électronique de débit. Ce dernier ajuste la pression du gaz en fonction de la température, de manière à ce que le débit gazeux dans la colonne soit constant, ce qui améliore considérablement les performances du chromatographe.

4.2. La colonne : Il existe deux types de colonnes : les *colonnes remplies* et les *colonnes capillaires*. Les colonnes remplies ont un diamètre de quelques millimètres et une longueur de l'ordre du mètre. Elles sont remplies de granules de support inerte, généralement de la silice, dont la surface est imprégnée ou greffée avec la phase stationnaire. Elles sont aujourd'hui supplantées par les colonnes capillaires, dont le pouvoir de résolution est bien supérieur. Les colonnes capillaires sont de simples tubes d'acier inoxydable, de verre ou de silice fondue (matériau inerte vis-à-vis de la phase stationnaire et des échantillons) de diamètre intérieur compris entre 0,1 et 0,5 mm, et d'une longueur typique de plusieurs dizaines de mètres, pouvant aller jusqu'à 100 m. Pour tenir dans l'appareil, la colonne est enroulée, avec des spirales ayant 10 à 30 cm de diamètre. La surface interne de ce tube est recouverte d'un film de 0,1 à 5 μm d'épaisseur constitué de la phase stationnaire. Ce film est mis en place par greffage ou simple déposition, le greffage étant généralement préféré pour des raisons de stabilité thermique. Par exemple, la Carbowax® est une colonne capillaire comportant un film polaire de polyéthylène glycol greffé en surface, film qui constitue la phase stationnaire. La SE-30® est une colonne capillaire apolaire comportant un film de polydiméthylsiloxane qui constitue la phase stationnaire.

Afin de maximiser l'influence de l'équilibre de partage, la colonne est choisie de telle sorte que le temps de rétention des analytes soit important. Une colonne capillaire de faible diamètre, longue, présentant une phase stationnaire épaisse et ayant des propriétés chimiques similaires aux molécules de l'échantillon permet typiquement d'obtenir de meilleures séparations.

2.3. Le four : La colonne est contenue dans un four de type chaleur tournante, dont la température est précisément ajustable (typiquement entre 20 °C et 350 °C) et programmable. Les températures utilisables en pratique dépendent des domaines de stabilité en température de la colonne utilisée, et de ceux des composés analysés. Plus la température du four (et donc de la colonne) est élevée, plus les analytes se déplacent rapidement dans la colonne, mais

moins ils interagissent avec la phase stationnaire, et donc moins les analytes sont séparés. Plus la température du four est basse, meilleure est la séparation des analytes mais plus longue est l'analyse. Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré. Une méthode pour laquelle la température est gardée constante tout au long de l'analyse est appelée « isotherme ». A l'inverse, on peut choisir d'augmenter la température du four au cours de l'analyse : cette méthode est appelée « gradient ». D'une manière générale, une méthode isotherme tend à donner des pics larges pour les espèces les plus retenues, et donc une moins bonne séparation.