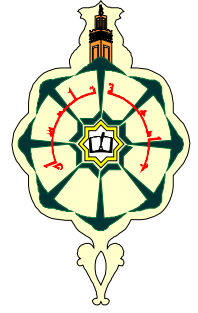


Université de Tlemcen-Abou-Bekr Belkaïd

Faculté des Sciences-département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



Présenté pour obtenir le grade

DE MASTER ACADEMIQUE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Option : Alimentation et nutrition

Par

BOUSSAID Maghnia

Soutenue le lundi 8 juillet 2013

Intitulé

**Etude phytochimique et activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne)
de l'extrait de tannins de *Pituranthos chloranthus* (Ghezzeb)**

Jury

M ^{me} BENDIMERAD . N	(Professeur, Université Abou-Bekr Belkaid Tlemcen)	Présidente
M ^{me} BENHAMMOU . N	(Maitre de conférences classe B ,Université Abou-Bekr Belkaid Tlemcen)	Examinatrice
M ^f BELYAGOUBI . L	(Maitre assistant classe A ,Université Abou-Bekr Belkaïad Tlemcen)	Examineur
M ^{me} ATIK BEKKARA . F	(Professeur ,Université Abou-Bekr Belkaïad Tlemcen)	Encadreur

Remerciement

*Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide de **ALLAH** qui ma donné la force afin de l'accomplir.*

*Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à ma promotrice **Mme ATIK-BEKKARA Fawzia**, Professeur à la Faculté des Sciences, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, pour l'attention qu'elle a porté à ce travail, pour les encouragements, la confiance qu'elle m'a toujours témoignée, sa constante disponibilité et la gentillesse dont elle a fait preuve à mon égard.*

*Je remercie vivement et sincèrement **Mme BENDIMERAD Nassima**, Professeur à la Faculté des Sciences, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury.*

*Toute ma reconnaissance s'adresse à **Mme BENHAMMOU Nabila**, Maitre conférences classe B, pour ses précieux conseils et sa responsabilité tout au long de ce travail. Votre venue en tant qu'examinatrice m'honore, je vous suis très reconnaissante et je vous adresse mes vifs remerciements.*

*Je remercie également **Mr BELYAGOUBI larbi**, Maitre assistant classe A, pour son contribution et son aide concernant la réalisation des analyses microbiologiques. Trouve ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à mes amis du travail : **Khadidja** et **Sidi Mohamed** pour les moments sympathiques qu'on a passé ensemble.*

*Je ne saurais oublier tous ceux et celles qui m'ont marqué par leur soutien et encouragements : tous les membres de notre laboratoire en particulier **Mr TOUL .F** et **Mme GHEMBAZA .N**, je leur exprime mon respect et ma profonde sympathie.*

Dédicaces

Je dédie ce travail à Ma mère qui aurait été comblé de bonheur, si elle était de ce monde que dieu ait son âme et l'héberge dans son vaste paradis.

" J'aurais tant aimé que tu sois là pour voir ce que tu as réussi,"

A mon père que dieu lui donne la force pour qu'il continu à couronner notre vie.

A mes sœurs et mes frères.

A ma nièce et mes neveux.

Résumé

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes d'origine naturelle. Notre travail est l'étude phytochimique visant à caractériser les différentes familles des composés chimiques contenues dans la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*, puis l'extraction sélective de la classe des tannins.

Les tests phytochimiques nous ont permis de mettre en évidence les familles chimiques suivantes : les flavonoïdes, les tannins, les coumarines, stéroïdes et triterpènes, hétérosides et les saponosides.

Les rendements obtenus des extraits aqueux et méthanoliques sont de l'ordre de 10.07 % et 8.45 % respectivement.

Les teneurs en tannins sont de l'ordre de $9,01 \pm 0,60$ mg EC/g MS et $1,66 \pm 0,10$ mg EC/g MS respectivement dans l'extrait méthanolique et aqueux.

L'extraction sélective des tannins nous a révélé un rendement de 0.68% dans la partie aérienne de *P.chloranthus*.

Les méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant nous ont révélés que : la capacité antioxydante totale montre une faible activité de l'ordre de 0.9538 ± 0.0995 mg EAA/g MS, le pouvoir réducteur utilisant la méthode de FRAP révèle une activité moyenne avec $EC_{50} = 0.82 \pm 0.191$ mg/ml, et que l'activité par le piégeage de radical libre DPPH donne une valeur d' $EC_{50} = 1.49 \pm 0.032$ mg/ml.

L'effet antimicrobien de l'extrait de tannins de *P.chloranthus* est signalé négatif à l'exception d'une faible activité inhibitrice remarquée vis-à-vis de la bactérie Gram positif *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 7mm.

Mots clés : *Pituranthos chloranthus*, étude phytochimique, tannins, pouvoir antioxydant, effet antimicrobien ,FRAP , DPPH et CAT.

Abstract

Most of the interest of current research relates to the study of antioxydant molecules of natural origin. Our work is the phytochimic study aiming at characterizing the various families of the chemical compounds contained in the air part of *Pituranthos chloranthus*, then the selective extraction of the class of tannins.

The tests phytochimic have allowed to us of meter in obviousness the following chemical families: flavonoïdes, tannins, coumarins, sterols and triterpénes, heterosides and saponosides.

The outputs obtained of the extracts aqueous and methanolic are about 10.07% and 8.45% respectively.

The contents tannins are about $9,01 \pm 0,60$ Mg EC/g MS and $1,66 \pm 0,10$ Mg EC/g MS respectively in the extract methanolic and aqueous.

The selective extraction of tannins revealed us an output of 0.68% in the air part of *P.chloranthus*.

The methods evaluation of the antioxydant capacity revealed us that: the total antioxydant capacity shows a weak activity of about 0.9538 ± 0.0995 mg EAA/g MS, the reduction using the method of FRAP reveals an average activity with $EC_{50} = 0.82 \pm 0.191$ mg/ml, and that the activity by the free trapping of radical DPPH gives a value of $EC_{50} = 1.49 \pm 0.032$ mg/ml.

The antimicrobial effect of the tannin extract of *P.chloranthus* is announced negative except for a weak inhibiting activity noticed with respect to the bacterium positive Gram *Staphylococcus aureus* with a diameter of inhibition of 7mm.

Key Mosts: *Pituranthos chloranthus*, phytochimic study, tannins, antioxydant capacity, antimicrobial effect, FRAP, DPPH and CAT.

الملخص

تركز الكثير من الاهتمامات البحثية الحالية على دراسة الجزيئات المضادة للأكسدة ذات الأصل الطبيعي. يهدف عملنا هذا إلى دراسة المركبات الكيميائية الواردة في الجزء الهوائي واستخلاص التانان. *Pituranthos chloranthus* من

تسمح لنا التجارب الفيتوكيميائية من تحديد العائلات الكيميائية التالية: مركبات الفلافونويد، التانان، الكومارين، تاربن، تريটারين، جليكوزيدات و الصابونين.

كان مردود المحلول المائي و الميتانولي حوالي 10.07 بالمائة و 8.45 بالمائة على التوالي.

محتويات التانان 9.01 ± 0.60 ملغ/غ و 0.10 ± 1.66 ملغ/غ على التوالي في مستخرجات الميتانول و المائي.

تحصلنا على مردود قدره 0.68 بالمائة من المستخلص النقي للتانان. و فد انبتت تجارب التقييم المضادة للاكسدة انخفاض النشاط من حوالي 0.0995 ملغ مع ما يعادل حمض الفاليك.

أظهرت لنا تجربة الفراب FRAP نشاط معتدل مع $EC_{50} 0.82 \pm 0.191$ ملغ/غ، ونشاط الجذور الحرة DPPH أعطى قيمة EC_{50} قدرها 0.032 ± 1.49 ملغ/غ .

أما بالنسبة لدراسة التانان كمضاد لنشاط البكتيريا فقد كانت سلبية ولم تؤثر على نشاط البكتيريا ماعدا بالنسبة مع *Staphylococcus aureus* أعطت قطر تثبيط قدره 7mm.

الكلمات المفتاحية: *Pituranthos chloranthus*، FRAP، DPPH، البكتيريا، التجارب الفيتوكيميائية.

Liste des abréviations

CG-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse.

RMN : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

EC50 : Concentration efficace d'inhiber 50 % du radical DPPH.

THs : Tannins hydrolysables.

TCs : Tannins condensés.

TTs : Tannins totaux.

DPPH• : Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

FRAP : Ferric reducing antioxidant power.

CAT : capacité antioxydante totale.

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde .

UFC : Unité formant colonie.

PM : poids moléculaire.

MS : matière sèche.

Fe²⁺ : Ions ferreux.

Fe³⁺ : Ions ferriques.

FeCl₃: Chlorure de fer .

% : Pourcentage.

°C: Degré Celsius.

µl: Microlitre.

UV : Ultra-violet.

min : minute .

DO : Densité optique.

µg : Microgramme .

mm : millimètre .

ATB : Antibiotique.

DMSO : Diméthyl sulfoxyde .

h: Heure.

g: gramme.

l: Litre

mg : milligramme.

ml: millilitre.

nm : nanomètre.

V: volume.

Liste des figures

Figure 1 : Structures de l'acide gallique et d'un tannin gallique	8
Figure 2 : Structure chimique de base des flavonoïdes	9
Figure 3 : Structure chimique de flavan-3-ols	9
Figure 4 : Structures chimiques des tannins condensés.....	10
Figure 5 : Carte géographique des zones de prélèvement (Encarta, 2009)	21
Figure 6 : Protocole d'extraction des tannins.....	27
Figure 7 : Méthode de Boulekbache-Makhlouf et al.,(2012).....	34
Figure 8 : Rendement en extraits obtenus à partir de la partie aérienne de la plante	36
Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins	37
Figure 10 : Teneurs en tanins pour l'extrait méthanolique et aqueux de la plante étudiée	37
Figure 11 : Pouvoir réducteur des tannins de <i>P.chloranthus</i> par la méthode de FRAP.....	39
Figure 12 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	40
Figure 13 : Pouvoir antioxydant de l'extrait des tannins de <i>P. chloranthus</i>	40
Figure 14 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	41
Figure 15 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	43
Figure 16 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13047	44
Figure 17 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	45
Figure 18 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	47
Figure19 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	48

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques	7
Tableau 2 : Les différents flavan-3-ols et les classes des homopolymères correspondants	10
Tableau 3 : Situation géographique de station de récolte	20
Tableau 4 : les souches utilisées dans les différents tests antimicrobien	30
Tableau 5 : Liste des antibiogrammes testés sur les bactéries et la levure	31
Tableau 6 : Résultats des tests phytochimiques de la partie aérienne de <i>Pituranthos chloranthus</i>	35
Tableau 7 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Escherichia coli</i>	42
Tableau 8 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition Pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Tableau 9 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition Pour <i>Klebsiella pneumonia</i>	44
Tableau 10 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Tableau 11 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Micrococcus luteus</i>	47
Tableau 12 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Listeria monocytogenes</i>	48
Tableau 13 : Les diamètres d des zones d'inhibition de <i>P.chloranthus</i> pour les six souches bactériennes (en mm)	49
Tableau 14 : Les diamètres des zones d'inhibition de <i>P.chloranthus</i> pour la levure testé (en mm)	50

Liste des photos

Photo 1 : <i>Pituranthos chloranthus</i>	3
Photo2: Antibiogramme d' <i>E.col</i>	42
Photo 3: Antibiogramme de <i>Klebsiella pneumonia</i>	45
Photo 4: Antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i>	46

Sommaire

Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	3
Chapitre I : Présentation de <i>Pituranthos chloranthus</i>	3
1. La famille des Apiacées	3
2. <i>Pituranthos chloranthus</i>	3
2.1. Description botanique	3
2.2. Position systématique.....	4
2.3. Usages traditionnels	4
2.4. Les études antérieurs sur le genre <i>Pituranthos</i>	5
Chapitre II : Les composées phénoliques	6
1. Généralité	6
2. Définition des composées phénoliques.....	6
3. Les principales classes des composés phénoliques	6
4. Les tannins	7
4.1. Définition	7
4.2. Classification biochimique des tannins.....	8
4.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques	11
4.4. Rôle des tannins dans les plantes.....	12
4.5. Facteurs de variation de la teneur en tannins	12
4.6. Analyses biochimiques des tannins	13
Chapitre III : les antioxydants	15
1. Le stress oxydant et les radicaux libres	15
2. Les antioxydants.....	15
2.1. Définition	15
2.3. Les sources d'antioxydants	16
3. L'évaluation de l'activité antioxydant	18
3.1. Introduction	18
3.2. Méthodes de piégeage des radicaux stables et évaluation de leur capacité de réduction	18
➤ Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH●)	18
➤ Réduction de fer (FRAP: <i>Ferric reducing antioxidant power</i>)	18
➤ Activité antioxydant totale (CAT)	19
Partie II : Partie expérimentale	20

Chapitre I : Matériel végétal	20
1. Origine géographique et période de récolte des plantes	20
2. Identification de la plante	20
3- Station d'étude	20
4. Conservation des échantillons	20
<i>Chapitre II : Tests Phytochimiques</i>	22
1. Introduction	22
2. Tests phytochimiques	22
2.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaude	22
2.2. Epuisement du matériel végétal avec du l'éthanol	23
2.3. Macération du matériel végétal avec l'acide sulfurique (H ₂ SO ₄).....	24
2.4. Détection des coumarines	24
2.5. Détection des stérols et triterpènes	24
Chapitre III : Préparation des extraits et dosage des tannins	25
1. Extraction des extraits bruts méthanolique et aqueux	25
2. Calcul du rendement	25
3. Dosage des tannins condensés.....	25
4. Extraction sélective des tannins.....	25
Chapitre IV : Etude des pouvoirs antioxydant et antimicrobien	28
1. Etude du pouvoir antioxydant	28
1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)	28
1.2. Réduction du fer (FRAP : <i>Ferric reducing antioxidant power</i>).....	28
1.3. Piégeage du radical DPPH•.....	29
2. Etude du pouvoir antimicrobien	29
2.1. Les souches testées	29
2.2. Conservation des souches	30
2.3. Les milieux de culture utilisés.....	30
2.4. Les techniques microbiologiques	30
2.4.1. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et antifongique.....	30
2.4.2. Sensibilité des souches vis-à-vis de l'extrait des tannins de la partie aérienne de <i>P.chloranthus</i>	33
3. Analyse statistique des résultats	34
Partie III : Résultats et discussion	35
I. Tests phytochimiques	35
II. Dosage des tannins.....	36
1. Les rendements en extraits secs de la partie aérienne de <i>Pituranthos chloranthus</i>	36

2. Dosage des tannins	36
III. Etude de l'activité antioxydante	38
1. La capacité antioxydante totale(CAT).....	38
2. Réduction du fer :FRAP (Ferric reducing antioxidant power).....	38
3. La méthode de piégeage de radical libre DPPH.....	39
IV. Pouvoir antimicrobien	41
1. Résultats de l'Antibiogramme.....	41
1.1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	41
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	43
1.3. <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13047	44
1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	45
1.5. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	46
1.6. <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	48
2. Pouvoir antifongique.....	49
3. Pouvoir antimicrobien de l'extrait sélectif des tannins.....	49
Conclusion.....	51
Références bibliographiques	52
Annexe	

INTRODUCTION

Les effets curatifs de certaines plantes sont bien connus, or ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques des plantes ont été isolés et étudiés. Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (**Isserin, 2001**).

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé. (**Chebil, 2006**).

Durant les dernières décennies de nombreux travaux ont été fait sur les plantes médicinales dans le but de trouver des principes actifs doués d'activités biologiques (**Calderon et al, 2002**).

Toutefois, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydantes et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile. Ainsi que l'utilisation des tannins couvre un vaste domaine, allant de la bactériologie, virologie, à l'hématologie..., traduisant ainsi leur importance surtout dans la médecine humaine (**Biaye., 2002**).

Notre laboratoire et particulièrement notre équipe s'intéresse à la phytochimie et aussi aux activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire) des extraits végétaux de plante médicinales dans le but d'élargir les perspectives de valorisation de produits naturels (**Atik Bekkara et al., 2008 ; Benhamou et al., 2008 ; Bekhechi et al., 2012 ; Belarbi et al., 2009 ; Bendimered et al., 2007**).

Pituranthos chloranthus (**Coss et Dur**) est une plante appartenant à famille des Ombellifères et commune dans tout le Sahara septentrional et occidental, appelée localement Guezzeh (**Nait-Said, 2007**) et utilisée en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire et contre les céphalées (**Antolovich, 2002**).

L'objectif de notre travail est l'étude phytochimique et activité biologique (antioxydante et antimicrobienne) des tannins de *P. chloranthus*.

Ce travail est scindé en trois parties :

- La première partie concernant l'étude bibliographique, comprend trois chapitres:
 - Chapitre I : Généralités sur *Pituranthos chloranthus*.
 - Chapitre II : Généralités sur les composés phénoliques avec une description détaillée sur la classe des tannins.
 - Chapitre III : Les antioxydants.

- La deuxième partie est expérimentale porte sur :
 - Les tests phytochimiques des différents extraits.
 - Dosage des tannins condensés de deux extraits bruts (méthanolique et aqueux).
 - L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de tannins en utilisant trois méthodes : Piégeage du radical DPPH, réduction du fer (FRAP : *Ferric reducing antioxidant power*), et la méthode de CAT (capacité antioxydante totale).
 - Et enfin l'étude de l'activité inhibitrice de l'extrait de tannins vis-à-vis de sept (7) souches microbiennes :
 - Trois bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* ,*Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*) ;
 - Trois bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonias*) ;
 - Et une levure (*Candida albicans*).
- Dans la troisième partie, nous présentons et discutons les résultats obtenus lors de cette étude et notre travail est achevé par une conclusion.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Présentation de *Pituranthos chloranthus*

1. La famille des Apiacées

La famille des Apiacées est caractérisée par les rayons de l'inflorescence disposés comme ceux d'une ombrelle. Cette famille comprend environ 300 – 455 genres et 3000 – 3750 espèces (**Tabanca et al., 2006**). En Algérie, selon **Quezel et Santa (1962)**, elle est représentée par 55 genres, 130 espèces et 27 sous – espèces.

Quezel et Santa (1963) a décrit le genre *Pituranthos* comme une plante vivace, totalement aphyllé, à tige très ramifiées, portant des ombelles à involucre et involucelles polyphylles et des péricarpes ovoïdes à six bandelettes.

Le genre *Pituranthos* possède plus de vingt espèces, dont certaines sont spécifiques à l'Afrique du nord (**Huang et al., 2005; Burda, 2001**) et sont souvent rencontrées dans les régions arides ou désertiques. Exclusivement, la distinction entre les espèces de *Pituranthos* est souvent difficile (**Sanchez, 2002**). En effet, elles ne se distinguent les unes des autres que par la couleur des fleurs et la taille de leur pédoncule (**Marc, 2004**).

Le potentiel floristique algérien de ce genre comporte les espèces suivantes:

- *Pituranthos chloranthus*, espèce particulièrement moins présente au Sahara.
- *Pituranthos scoparius*, espèce abondante dans les Aurès.
- *Pituranthos battandieri* : endémique au Sahara et l'oranie (**Antolovich, 2002**).

2. *Pituranthos chloranthus*

2.1. Description botanique

L'espèce *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur), selon **Ozenda (1958)** est une plante dont les tiges sont ramifiées dès la base, plus ou moins dichotomes et portant des ombelles longuement pédonculées; pétales verdâtres à nervures dorsales pubescentes et larges, fruits poilus.

L'espèce *P. chloranthus* est commun dans tout le Sahara septentrional et occidental jusqu'à EL Golea et au Tademaït au sud.



Photo 1 : *Pituranthos chloranthus*

http://www.florasilvestre.es/mediterranea/Umbelliferae/Pituranthos_chloranthus.htm.

2.2. Position systématique

La plante *Pituranthos chloranthus* est classée d'après **Quezel et Santa (1963)** et **Dupont et Guignard (2007)** comme suit :

Embranchement :	<i>Spermaphytes</i>
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe:	Eudicots
Sous classe :	Euastéridées II
Ordre:	Apiales
Famille:	Apiacées
Genre :	<i>Pituranthos</i>
Espèce :	<i>Pituranthos chloranthus</i> .

2.3. Usages traditionnels

L'espèce *Pituranthos chloranthus*, est employée en cataplasmes sur la tête, contre les céphalées (**Antolovich, 2002**).

Les nomades connaissent le haut pouvoir allergisant des plantes du genre *Pituranthos* pour les animaux, en période de leur floraison. Le pollen rend les animaux aveugles pendant plusieurs jours. Les nomades traitent ces ophtalmies en instillant dans les yeux du dromadaire, du jus de tabac ou en introduisant du sel sous les paupières (**Antolovich, 2002**).

2.4. Les travaux antérieurs sur le genre *Pituranthos*

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Pituranthos* d'après des données bibliographiques, concernent les espèces suivantes: *chloranthus*, *scoparius*, *tortuosus* et *triradiatus* (**Nait-Saïd, 2007**).

- **Singab et al (1998)** ont étudié des tests biologiques relatifs à l'activités anti-tumorale des flavonoïdes isolés de *Pituranthos tortuosus*.
- Les huiles essentielles et particulièrement les monoterpènes des espèces *Pituranthos tortuosus* et *Pituranthos triradiatus* ont été analysés par CG –MS et par la méthode d'analyse spectroscopique RMN C13 (**Halim et al., 1995 ; Abdelwahad et al.,2006**).
- Les coumarines des racines de *Pituranthos chloranthus* ont été isolées par HPLC et identifiés par la spectroscopie RMN 1H, et spectrométrie de masse (**Nait-Saïd, 2007**).

- Les racines de *Pituranthos scoparius* renferment aussi des composées isocoumariniques. Les structures ont été identifiées par les différentes méthodes d'analyses spectroscopique (RMN 1H, RMN C13) et la spectrométrie de masse (**Haba et al., 2004**).
- Les travaux de **Bouaziz et al (2009)** sur les activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne) de quatre extraits (méthanolique, aqueux, acétate d'éthyle et l'extrait d'hexane) de la partie aérienne de *P.chloranthus*.
- Les travaux de **Hammiche et Maiza (2006)** ; **Vérité et al (2004)** ont montré l'activité de *P. chloranthus* contre la fièvre, rhumatisme et diabète.

Chapitre II : Les composées phénoliques

1. Généralités

Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, on recense plusieurs milliers de métabolites (au moins 30000 structures caractérisées) et sont classées selon leur appartenance chimique (**Judd, 2002**). Parmi ces substances on trouve les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tannins, les saponosides, les huiles essentielles et les alcaloïdes qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

2. Définition des composées phénoliques

Les composées phénoliques ou les polyphénols constituent une famille de molécules largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas des fonctions directes au niveau des activités fondamentales dans l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (**Belkhiri, 2009**).

Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances avec plus de 8000 structures phénoliques. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate (**Lugasi et al., 2003**).

Les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la protection contre les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet antioxydant (**Lebham, 2005**).

3. Les principales classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (**Laraoui, 2007**). Les différentes classes de ces composés phénoliques, et les plantes qui les renferment sont représentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques (**Bruneton, 1999 ; Hennebelle, 2006**).

Nombre d'atome decarbone	Squelette de base	Classe	Exemples	Plantes
6	C6	Phénols simples	Catéchol, hydroquinone	Busserole
7	C6-C1	Acides phénols benzoïques	Acide gallique, acide salysalique, vanilline	Artichaut Saule
8	C6-C2	Acétophénones	3-acétyl6-méthoxybenzaldehyde	Saule
9	C6-C3	Acides phénols cinnamiques	Acide coumarique, acide caféique	Romarin Marronnier d'inde
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine	Drosera spp.
13	C6-C1-C6	Xanthonés	Bellidifoline, mangocétine	Racine de gentiane, Centaurée
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Hydrangénol, Pinosylvine	Raisin, pin
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine Roténoïde	Ginkgo Thym Camomille
18	(C6-C3) ₂	Lignanes	Matairésinol	Chardon
30	(C6-C3-C6) ₂	Bi flavonoïdes	Amentoflavone Hinokiflavone	Carcinia Hypericum
N	(C6-C3-C6) _n	Tanins condensés (proanthocyanidols)	Aesculitanins	Marronnier d'inde, vigne

4. Les tannins

4.1. Définition

Les tannins sont une famille complexe de principes actifs qu'on trouve dans l'ensemble des végétaux, et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, etc.). Ils ont la capacité de former des complexes avec des macromolécules (les protéines ...) et des liaisons entre les fibres de collagènes, d'où leur viennent la plupart de leurs propriétés (**Paolini *et al.*, 2003**).

Leur structure chimique est particulièrement variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique ; il existe deux catégories des tannins, d'origine biosynthétiques différentes : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (**Paolini *et al.*, 2003**).

D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par **Bate-Smith (1973)** : « des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines ».

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) (**Horn *et al.*, 2002 ; Del-Bubba *et al.*, 2009**).

4.2. Classification biochimique des tannins

Selon leur structure biochimique, il est usuel de distinguer deux classes des tannins : les tannins hydrolysables (THs) et les tannins condensés (TCs).

4.2.1. Les tannins hydrolysables

- Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate, généralement le glucose. On parle de **gallotannins**.
- les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : **ellagitannins**.

Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres) (**Akroum, 2011**).

❖ Structure des tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol. Des liaisons carbonées à carbone entre noyaux (liaisons biphenyle réalisées par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tannins éllagiques (**Bessas *et al.*, 2007**).

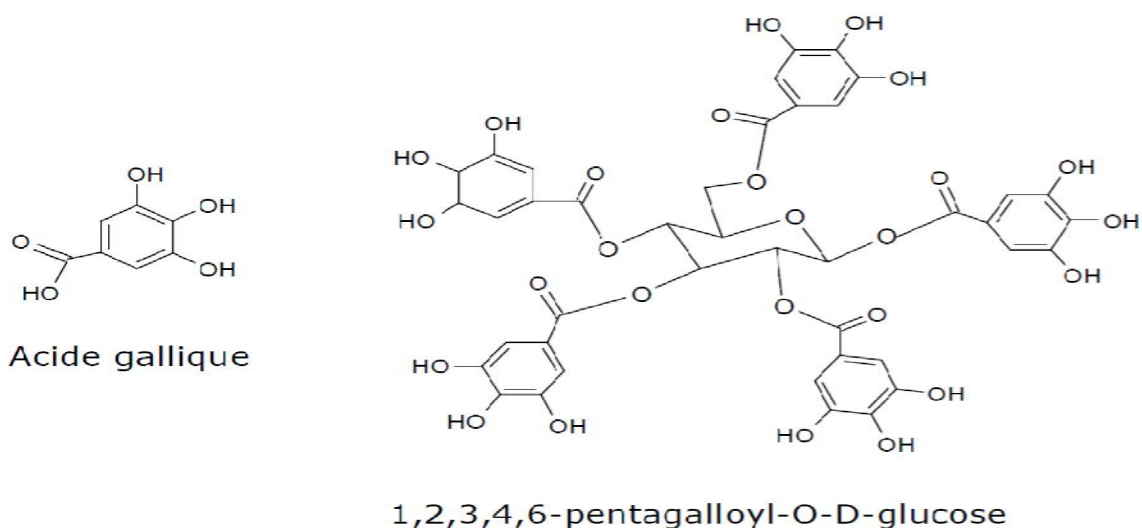


Figure 1 : Structures de l'acide gallique et d'un tannin gallique (**Séverine, 2008**).

4.2.2. Les tannins condensés : ou tannins catéchiques ou proanthocyanidols

Ce sont des polymères flavanoliques, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent C4-C8 ou C4-C6 tel la catéchine ou l'épicatéchine (**Bruneton, 1999**). Ces composés sont formés par condensation des molécules de flavonoïdes entre elles (**Akroum, 2011**).

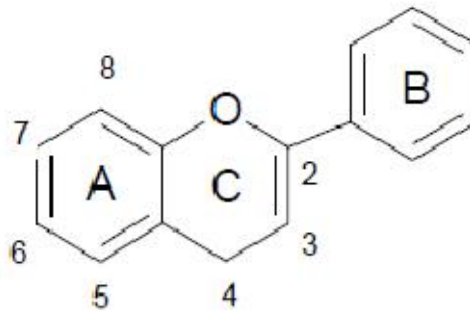


Figure 2 : Structure chimique de base des flavonoïdes (**Séverine, 2008**).

4.2.2.1. La structure des tannins condensés

- **Structure biochimique des flavan-3-ols**

La présence d'un hydrogène (H) ou d'un groupement phénol (OH) aux positions R1, R2 et R3 permet d'identifier les flavan-3-ols (Figure 3).

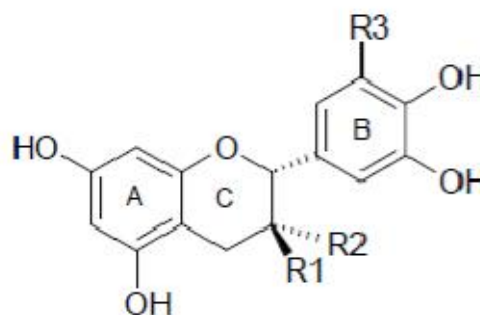


Figure 3 : Structure chimique de flavan-3-ols (**Séverine, 2008**).

Tableau 2 : Les différents flavan-3-ols et les classes des homopolymères correspondants (Séverine, 2008).

Flavan-3-ols :	Classes des homo-polymères:	R1	R2	R3	Nombre de fonctions OH :
Catéchol (C)	Procyanidols	OH	H	H	5
Epicatéchol (EC)	Procyanidols	H	OH	H	5
Gallocatéchol (GC)	Prodelphinidols	OH	H	OH	6
Epigallocatéchol (EGC)	Prodelphinidols	H	OH	OH	6
Fisétinidinol	Profisétinidinols	H	H	H	4
Robinétinidinol	Prorobinétinidinols	H	H	OH	5

• La structure des tannins condensés

L'unité de base (ou monomère) des TCs est un flavan-3-ol. Les TCs sont des polymères de flavan-3-ols liés par des liaisons de type C-C (Bruneton, 1999).

Les homo-polymères sont des TCs présentant uniquement une classe de flavan-3-ols dans leur structure (Figure 3). À l'inverse, les hétéro-polymères peuvent contenir des monomères de classes différentes (Hagerman, 2002).

En fonction du degré de polymérisation (nombre de flavan-3-ols composant le TCs), nous distinguons généralement les oligomères, comprenant de 2 à 10 monomères, des polymères contenant plus de 10 monomères (Séverine, 2008).

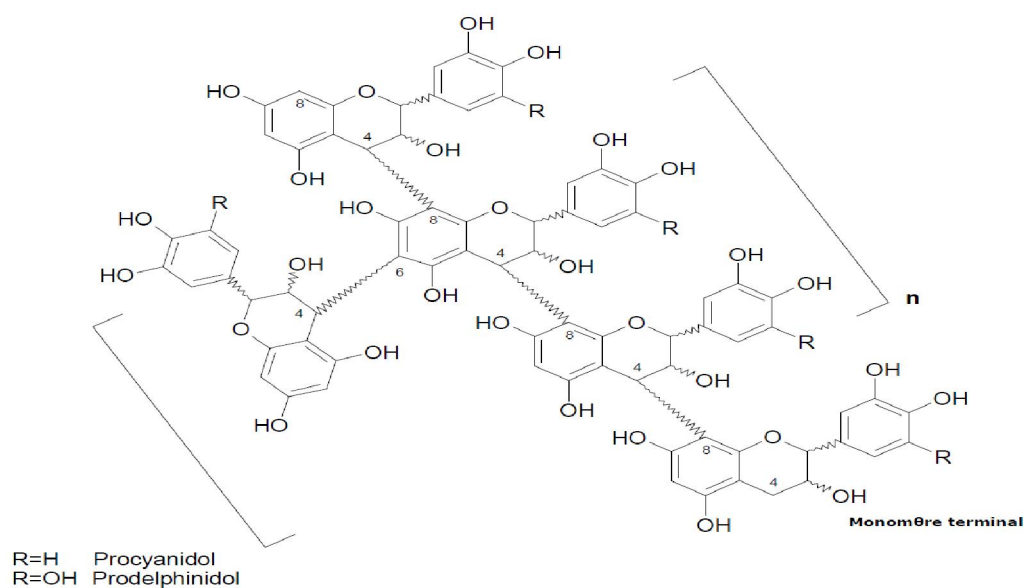


Figure 4 : Structure chimique des tannins condensés (Séverine, 2008).

4.2.2.2. Effet antinutritionnel des tannins condensés

L'effet antinutritionnel des tannins condensés se traduit de deux manières principales : leur capacité à inhiber les enzymes digestives et leur liaison aux molécules nutritives empêchant ainsi leur assimilation par le corps.

- **Inhibition des enzymes digestives**

Les tannins condensés sont capables de se lier aux enzymes digestives causant de ce fait leur inhibition. Plusieurs de ces polyphénols ont une action sur l' α -amylase (Kandra *et al.*, 2004), l' α glucosidase, les protéases (Kocisko, 2004).

L'inhibition de ces enzymes cause un trouble de l'activité du tube digestif et diminue la valeur nutritive des aliments ingérés qui ne pourront pas être assimilés (Akroum, 2011).

- **La capacité de se lier aux différents composés alimentaires**

Les tannins condensés ont une grande capacité à se lier aux différents types de molécules présents dans l'alimentation par des liaisons covalentes : polysaccharides (pectines, amidon, celluloses), minéraux (fer, argent), vitamines (Gaffney *et al.*, 2004). Mais, les principales molécules qui se lient à ces composés polyphénoliques sont les protéines (Zimmer et Cordesse, 1996).

4.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques des tannins

- **Propriété physicochimiques**

La solubilité des tannins dans l'eau dépend de leur poids moléculaire et de leur degré de polymérisation. Ils sont également solubles dans l'acétone et les alcools, c'est pourquoi l'optimum de rendement de leur extraction est généralement obtenu par des solutions acétone-eau ou méthanol-eau. La structure chimique des tannins présente de nombreux groupements hydroxyles et phénoliques, ce qui leur confère la propriété particulière de former des complexes avec de nombreuses macromolécules : les acides nucléiques, les ions métalliques ferriques et cuivriques, ainsi que la quasi-totalité des protéines (surtout celles riches en acides aminés hydrophobes comme la proline et l'hydroxyproline) (Séverine, 2008).

En conséquence, les tannins possèdent les capacités et les propriétés biologiques suivantes : fixation et inhibition enzymatique, piégeage des radicaux libres et activité antioxydante, effet antiseptique (antibactérien, antifongique, antiviral), prévention des maladies cardio-vasculaires (Lecasble, 2012).

➤ Propriétés biologiques

Les drogues à tannin sont employées contre les hémorroïdes, blessures superficielles. Les extraits tanniques sont anti-inflammatoires dans les cas de brûlures. Ils sont utilisés aussi comme antiseptique. En solutions buvables, elles ont employées comme antidiarrhéique (Ayad, 2008).

4.4. Rôle des tannins dans les plantes

Les tannins sont des métabolites secondaires des végétaux (Bruneton, 1999), c'est à dire des substances non-essentiels pour la croissance de la plante. Par contre, les tannins jouent un rôle dans :

La défense des plantes face aux agressions : La synthèse des tannins est l'un des mécanismes de défense des plantes contre les attaques des phytopathogènes. Par exemple, une accumulation de tannins a été observée dans les zones d'invasion de la plante par des bactéries, des champignons ou par des nématodes, ce qui en inhiberait le développement. Les tannins sont aussi un moyen de défense contre les agressions des prédateurs tels les insectes et les mammifères herbivores. Il a été montré que l'ingestion de tannins affectait l'intégrité du tube digestif des insectes phytophages (Séverine, 2008).

De plus, la présence des tannins rend les plantes moins appétentes pour les mammifères herbivores à cause de la sensation d'astringence résultant de leur consommation. Cette astringence conduit alors à un arrêt de la consommation et protège ainsi les végétaux d'une prédation excessive (Bennick, 2002).

4.5. Facteurs de variation de la teneur en tannins

La teneur en tannins d'une plante varie en fonction de plusieurs facteurs intrinsèques, tels que l'espèce et la variété, la partie ou le stade végétale, et extrinsèques, comme les conditions climatiques, pédologiques (Severine, 2008).

4.5.1. L'espèce végétale et la variété

Au sein d'une même famille botanique, les espèces végétales présentent des différences de teneur et de nature des tannins. Pour prendre le seul exemple des légumineuses, la concentration en TCs diffère largement : 0,3g TCs/Kg de la MS dans le trèfle, 30g TCs/Kg MS dans le sainfoin (Marais *et al.*, 2000).

4.5.2. Le stade végétal

Pour une espèce donnée, le stade végétatif influence également la teneur en tannins. Généralement, lors de la croissance de l'appareil végétatif, il y a une dilution des tannins. Dans les feuilles, la quantité et la qualité des tannins changent lors de la maturation. De même, la teneur en tannins diminue généralement lors du mûrissement des fruits (Severine, 2008).

4.5.3. Les conditions environnementales

La synthèse des tannins est généralement augmentée en réponse à un stress environnemental quelque soit son origine, tel qu'un stress hydrique, un appauvrissement du sol ou un ensoleillement trop fort (**Bennick, 2002**).

4.6. Analyses biochimiques des tannins

En raison de leurs structures complexes et variées, l'analyse des tannins est délicate et leur dosage souvent difficile. Néanmoins, des méthodes de dosage des tannins totaux (TTs) ont été développées, basées sur leurs propriétés physicochimiques ou biologiques. Parallèlement, des méthodes ont été proposées pour doser spécifiquement les THs ou les TCs (**Severine, 2008**).

4.6.1. Dosages des tannins totaux

➤ Méthode chimique

La méthode de Folin-Ciocalteu (réactif spécifique des phénols) se décompose en deux dosages colorimétriques successifs : le dosage des phénols totaux puis le dosage des phénols non-tanniques d'un extrait acétonique (**Bruneton, 1999**). Ce second dosage est réalisé après la déplétion des tannins de l'extrait par le polyvinyl pyrrolidone (PVPP) (**Schofield et al., 2001**). Le PVPP est une molécule capable de se lier aux tannins présents dans l'extrait et les complexes 'tannin/PVPP' sont retirés de l'extrait par centrifugation. Indirectement, la teneur en tannins totaux (TTs) d'un échantillon est déterminée par la différence entre les teneurs en phénols totaux et en phénols non tanniques (**Severine, 2008**).

➤ Méthodes biologiques

Il existe diverses méthodes de dosage des TTs fondées sur leur propriété à se fixer aux protéines :

- La méthode traditionnelle, utilisant de la poudre de peau, est appliquée dans le cas des drogues officinales (**Bruneton, 1999**) ;
- Les techniques basées sur l'inhibition d'enzyme (B-glucosidase ; trypsine; alcaline phosphatase) sont des méthodes très sensibles (**Schofield et al., 2001**) ;
- Une méthode basée sur la propriété des tannins à réduire la production de gaz lors de fermentations anaérobies a également été développée (**Mueller-Harvey, 2006**).

4.6.2. Dosages et analyses des tannins hydrolysables

- Pour le dosage des THs, il est possible de réaliser selon la méthode de (**Mole et Waterman, 1987**).
- Une analyse qualitative et quantitative peut être effectuée en RMN ou en spectrométrie de masse (**Séverine, 2008**).

4.6.3. Dosages spécifiques et analyses des tannins condensés

Dans la plante, les TCs sont présents sous différentes formes : libres ou liés, c'est à dire ceux fixés aux protéines ou aux fibres de la plante (**Schofield et al., 2001**). L'existence de ces deux formes (libres ou liés) rend le dosage des TCs plus délicat.

En général, les TCs sont majoritairement présents sous forme libre. Cependant les conditions de stockage, de séchage et d'extraction des échantillons peuvent influencer la proportion de TCs liés/libres (**Schofield et al., 2001**). Afin de doser les TCs liés, un traitement par des agents chimiques, tel que le sodium dodécyl sulfate, est réalisé ultérieurement à l'étape d'extraction, afin de rompre les liaisons protéines-TCs et fibres-TCs et de libérer ainsi les TCs liés. Le dosage des TCs peut ensuite être réalisé par diverses méthodes colorimétriques :

- **La méthode à la vanilline** : Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des TCs et la formation de complexes colorés (**Schofield et al., 2001**). Cependant cette réaction n'est pas spécifique aux TCs mais, de manière générale aux flavanols (**Hagerman, 2002**).

- **la méthode du Butanol-HCl, développée par Porter et al (1986)** : basée sur la réaction de dépolymérisation des TCs en milieu acide. Cette réaction conduit à la libération des anthocyanidines (molécules colorées) correspondants aux monomères clivés (**Jean-Blain, 1998 ; Schofield et al., 2001**). Elle permet un dosage semi-quantitatif des TCs car les monomères terminaux libérés ne donnent pas les anthocyanidines correspondants et par conséquent, ils ne sont pas dosés (**Schofield et al., 2001**). Cependant, la méthode au Butanol-HCl reste la méthode la plus utilisée (**Schofield et al., 2001; Hagerman, 2002; Lazarus et al., 2003**).

- **la méthode au DMACA (ρ -diméthylaminocinnamaldehyde)** : permet le dosage des flavan-3-ols, les monomères des TCs. Cette méthode colorimétrique très sensible aux monomères l'est moins aux polymères (**Guyot et al., 2001; Mueller-Harvey, 2006**).

Enfin, l'étude des TCs d'un extrait ou d'une fraction peut être complétée par des analyses en spectrométrie de masse ou en RMN (**Schofield et al., 2001; Simon et al., 2003**).

Chapitre III : les antioxydants

1. Le stress oxydant et les radicaux libres

Les radicaux libres (RL), atomes ou molécules portant un électron non apparié, sont des éléments très actifs du fait de la tendance de cet électron à se réparer, ce qui déstabilise d'autres molécules, libérant des radicaux libres et initiant ainsi une réaction en chaîne. Pour se protéger contre leurs effets nocifs, notre corps a besoin des sources d'antioxydants qui sont puisés soit dans l'alimentation (fruits, légumes frais et extraits végétaux) soit des produits synthétisés (pharmaceutiques) et qui nous protègent et nous débarrassent des radicaux libres produits en excès (**Chaabi, 2008**).

Ces derniers sont produit quotidiennement par l'organisme ; ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux (**Bartosz, 2003**) mais, ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides (**Pourrut, 2008**), des acides nucléiques (**Favier, 2003**) en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers.

2. Les antioxydants

Lorsque la production des radicaux libres devient trop grande, nos réserves d'antioxydants peuvent devenir insuffisantes pour neutraliser l'effet néfaste de l'oxydation des radicaux libres sur nos tissus et cellules. C'est pour ça L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des RL (radicaux libres). Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme «antioxydant» (**Boumaza, 2009**). On parle alors de « stress oxydatif ».

2.1. Définition

Les antioxydants sont toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat, et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne branchent pas la réaction radicalaire (**Boumaza, 2009**).

Ces antioxydants ont deux origines, l'une apportée par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque, tandis que l'autre est endogène représentée par des enzymes, tels que les superoxydases dismutases (SOD) et la catalase (rôle de protection), les glutathion peroxydases (GSH-Px) (rôle de détoxification) ou des protéines (ferritine, transferrine, albumine) (**Curtay et Robin, 2000**). **Pincemail et Defraigne (2004)** ajoutent aussi quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydants.

2.2. Les sources d'antioxydants

2.2.1. Les antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Lisu *et al.*, 2003). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (Yu *et al.*, 2000). En effet, le butylhydroxyanisole (BHA) convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques (Barlow, 1990).

2.2.2. les antioxydants naturels :

Ils sont présents dans l'alimentation tels que les vitamines A, C, E et les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes.

1. La vitamine E ou tocophérol : prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxytes. Elle est présente dans les huiles végétales, les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes (Ahamet, 2003).

2. La vitamine C ou acide ascorbique : C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E. Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron, les agrumes. (Colette, 2003).

3. Les caroténoïdes

Ce sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules notamment le lycopène et le β -carotène, précurseurs de la vitamine A. Ils sont présents dans les carottes, les fruits rouge et jaunes, les légumes verts et les tomates (Marc *et al.*, 2004).

Le rôle biologique des caroténoïdes est, entre autre, complémentaire de celui de la vitamine E, elle-même régénérée par la vitamine C, d'où l'intérêt de consommer une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes variés pour bénéficier des nombreux effets de synergie entre micronutriments (Miller *et al.*, 1996).

4. Les composées phénoliques

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication probable dans la

prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant. Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardio-vasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires (**Rock, 2003**).

➤ **Les flavonoïdes**

Ce sont des substances naturelles présentes dans tout le règne végétal. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer, le cuivre ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène comme la xanthine oxydase (**Lahouel et al., 2006**).

➤ **Les tannins**

Les plantes riches en tannins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure. Ces tannins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation des lipides (**Cavin., 1999**).

➤ **Les coumarines**

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de piéger les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Diallo, 2005**).

5. Les oligoéléments

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant (**Garait, 2006**).

❖ **Le sélénium**

C'est l'oligo-élément le plus « à la mode » pour ses propriétés antioxydantes avérées. Jadis comme un toxique, ses effets bénéfiques sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure). Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers (**Ahamet, 2003**).

3. L'évaluation de l'activité antioxydante:

3.1. Introduction :

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant sont nombreuses et peuvent être qualitatives ou quantitatives. La méthode qualitative, utilisée pour repérer l'activité antioxydante de composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés (**Li et al., 1999**).

En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. Les méthodes principales comportent le balayage des radicaux de superoxyde (O_2^-) ; le balayage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; le balayage d'acide hypochloreux ($HOCl$) ; le balayage du radical d'hydroxyle (OH) ou le balayage du radical de peroxyde (ROO) (**Maamri, 2008**).

Il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure de pouvoir antioxydant (**Belkheiri, 2010**).

3.2. Méthodes de piégeage des radicaux stables et évaluation de leur capacité de réduction :

Les tests qui ont été réalisés dans le cadre de ce mémoire sont les suivants :

➤ **Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH●) :**

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyl) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure activité antioxydant des composés phénoliques (**Blois, 1958 ; Brand-Williams et al., 1995**). La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des extraits phénoliques. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits (**Molyneux, 2004**).

➤ **Réduction de fer (FRAP: *Ferric reducing antioxidant power*) :**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le

complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**.

➤ **Activité antioxydant totale (CAT) :**

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Prieto *et al* (1999)**. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdate Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate /Mo(V) à PH acide.

MATERIELS ET METHODES

Chapitre I : Matériel Végétal

1. Choix du matériel végétal

La récolte de la plante *Pituranthos chloranthus* a eu lieu en pleine floraison au mois d'octobre 2012, dans la région d'El-Kantra, à 50 km du nord de la wilaya de Biskra. Le choix de cette plante est appuyé sur une enquête ethnobotanique auprès de la population bédouine ayant connaissance de l'usage de cette espèce comme cataplasme sur la tête contre les céphalées.

2. Identification de la plante

L'espèce a été identifiée par Docteur **Hassani F.**, membre du laboratoire d'Ecologie et de Gestion des Ecosystèmes Naturels au département de Biologie et Environnement. La plante a été classée dans le laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) et a été enregistrée sous la référence suivante :

- 1943 pour *Pituranthos chloranthus* (**Coss. et Dur**).

3- Station d'étude

Les paramètres géographiques de notre station d'étude sont représentés dans le tableau 3 et la figure 5.

Tableau 3: Situation géographique et bioclimatique de la station d'étude.

Station	Partie étudiée	Longitude (O)	Latitude (N)	Etage bioclimatique
El-Kantra (Biskra)	Partie aérienne	5°42'	35°13'	aride

4. Conservation des échantillons

Après la récolte, le matériel végétal (partie aérienne) est nettoyé, étalé et séché à l'abri de la lumière et de l'humidité et à la température ambiante. Après le séchage, le matériel végétal est conservé dans des sacs en papier.

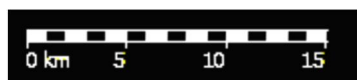
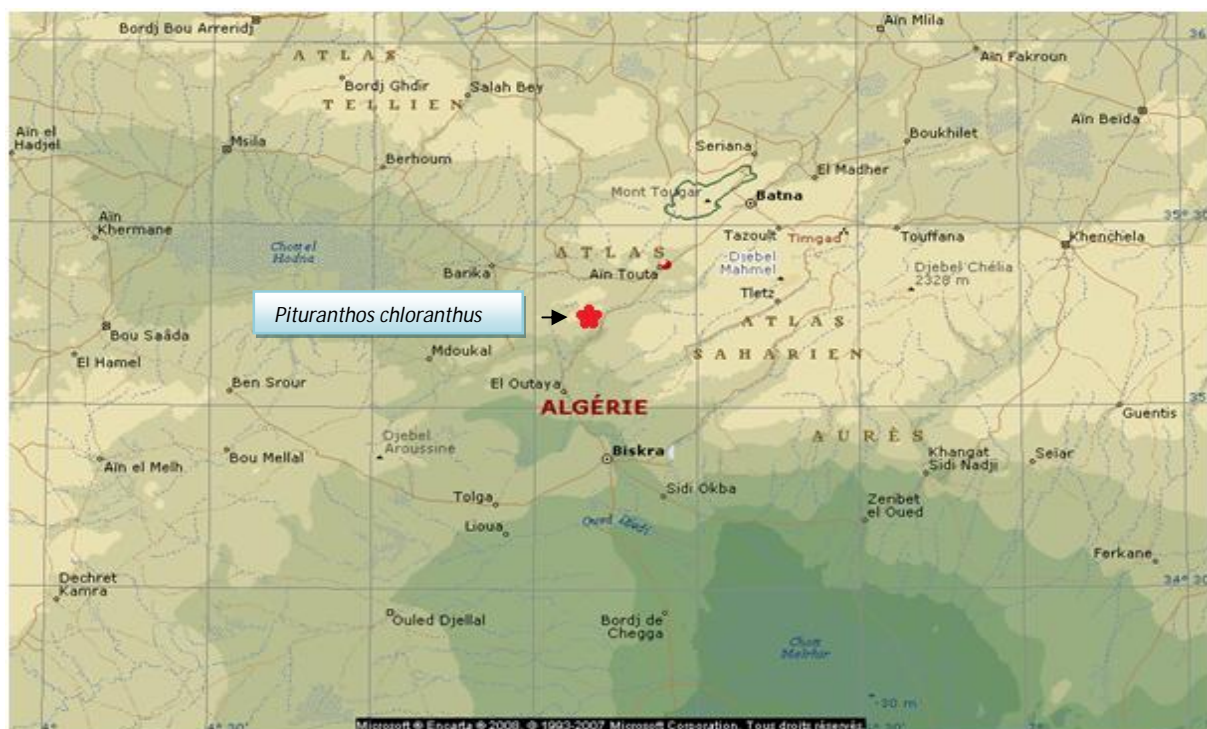


Figure 5: Carte géographique de la station de prélèvement de *Pituranthos chloranthus* (Encarta, 2009).

Chapitre II : Tests Phytochimiques

1. Introduction

L'examen phytochimique est un premier pas dans la recherche des classes chimiques d'un extrait. Il permet la détection des classes de composés chimiques essentiellement les composés phénoliques, les Saponosides, les alcaloïdes, les isoprénoïdes qui renferme les terpénoïdes, l'amidon et les composés réducteurs.

2. Tests phytochimiques

La détection des principaux constituants chimiques est réalisée sur les différents extraits obtenus par épuisement avec de l'eau, avec de l'éthanol et macération par H₂SO₄.

2.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaude

Dans un ballon monocol surmonter d'un réfrigérant, 50 g du matériel végétal est mis en présence de 300 ml d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux tests suivants :

2.1.1. Détection d'amidon

Chauffer 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition. Ajouté le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-violacé (**Bruneton, 1999**).

2.1.2. Détection des Saponosides

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est abandonné pendant 20 min et la teneur en saponosides est évaluée :

- ☞ Pas de mousse : test faiblement positif.
- ☞ Mousse moins de 1 cm = test moyennement positif.
- ☞ Mousse de 1-2 cm = test positif.
- ☞ Mousse plus de 2 cm = test très positif (**Trease et Evans, 1987**).

2.1.3. Détection des tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait aqueux, 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée (1%). L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins (**Trease et Evans, 1987**).

2.1.4. Détection des anthocyanes

Leur présence est révélée en traitant 2 ml d'infusé aqueux avec 2ml de HCl (2N) ensuite ajoutant quelques gouttes de NH_4OH . Un test positif est révélé par une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacée (**Debrayb et al., 1971; Paris et al., 1969**).

2.2. Epuisement du matériel végétal avec du l'éthanol

Dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant, 50 g du matériel végétal est mis en présence de 300 ml d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux tests suivants :

2.2.1. Détection des flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml de HCl concentré et 0.5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 min (**Earnsworth, 1974**).

2.2.2. Détection des tanins galliques et catéchiques

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait éthanolique, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée (1%).

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (tanins galliques) ; verte ou bleu-verte (tanins catéchiques) (**Trease et Evans, 1987**).

2.2.3. Détection des composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer.

Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (**Trease et Evans, 1987**).

2.3. Macération du matériel végétal avec l'acide sulfurique (H₂SO₄)

Ajouter 10 ml de H₂SO₄ dilué (1/10) à 10 g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml. Laisser agiter et macérer pendant 24 h à la température ambiante du laboratoire. Après filtrer sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 10 ml de filtrat.

2.3.1. Détection des alcaloïdes

- 1 ml de filtrat + 5 goutte du réactif de Mayer, s'il apparaît un précipité blanc-jaunâtre c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes.
- 1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de Wagner s'il apparaît un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (**Paris et al, 1969**).

2.4. Détection des coumarines

Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et le placer dans un bain marie pendant quelques minutes. Ajouter 0.5 ml de NH₄OH (10 %). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Rizk, 1982**).

2.5. Détection des stérols et triterpènes

Deux essais ont été effectués :

➤ Essai 01 : Test pour les stérols et stéroïdes

10 ml de l'extrait éthanolique est placé dans un erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml du chloroforme anhydre. Ensuite mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique, ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, agiter puis laisser la solution se reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 min à 21°C) (**Trease et Evans, 1987**).

➤ Essai 02 : Test pour les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite dissoudre le résidu obtenu dans le mélange d'anhydre acétique /chloroforme (5/5 : V/V). Puis, filtrer et traiter le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (la réaction de Liebermann-Burchardt). Si, cette réaction donne des colorations verte-bleue et vertes-violette, elle indique la présence des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement (**Trease et Evans, 1987**).

Chapitre III : Préparation des extraits et dosage des tannins

1. Extraction des extraits bruts méthanolique et aqueux

La poudre (1 g) de la partie aérienne de *P. chloranthus* est placée dans un erlenmeyer dans 20 ml du solvant adéquat (méthanol, aqueux) pendant 24 h. Après la filtration, les solutions récupérées sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type HAHNVAPOR R-200 à 60°C. Les résidus secs obtenus pesés sont repris par quelques ml du méthanol.

2. Calcul du rendement

Les pourcentages en extrait brut ont été calculés par la formule suivante :

$$R(\%) = M/M_0 \times 100$$

R : Rendement exprimé en %

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

3. Dosage des tannins condensés

Les quantités des tannins condensées sont estimées en utilisant la méthode de Vanilline (**Julkunen-Titto, 1985**). Un volume de 50µl de l'extrait brut (méthanolique ou aqueux) est ajouté à 1500 µl de la solution Vanilline /méthanol (4% ; m/v) puis mélangé le contenu à l'acide d'un Vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionnée et laisser réagir à la température ambiante pendant 20 min.

L'absorbance à 550 nm est mesurée contre le blanc. La concentration des Tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche à partir de la courbe d'étalonnage.

4. Extraction sélective des tannins

L'extraction des tannins a été effectuée selon la méthode adaptée par **Zhang et al.,2008**. 2.5g de poudre de matériel végétal (partie aérienne) a été extraite par 50 ml du mélange acétone/eau distillée (35/15,v/v) durant trois jours à une température ambiante. La solution est filtrée et évaporé à 40°C par un rotavapeur HAHNVAPOR-Model : H-S-2005V-N pour éliminer l'acétone puis, la phase aqueuse est lavée par 15 ml de dichlorométhane afin

d'éliminer les pigments et les lipides. Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse a été extraite deux fois avec 15ml d'acétate d'éthyle. Le mélange des deux phases est évaporé à sec à 40°C par un rotavapeur type HAHNVAPOR-Model : H-S-2005V-N puis pesé et repris par 3ml de méthanol (Figure 6).

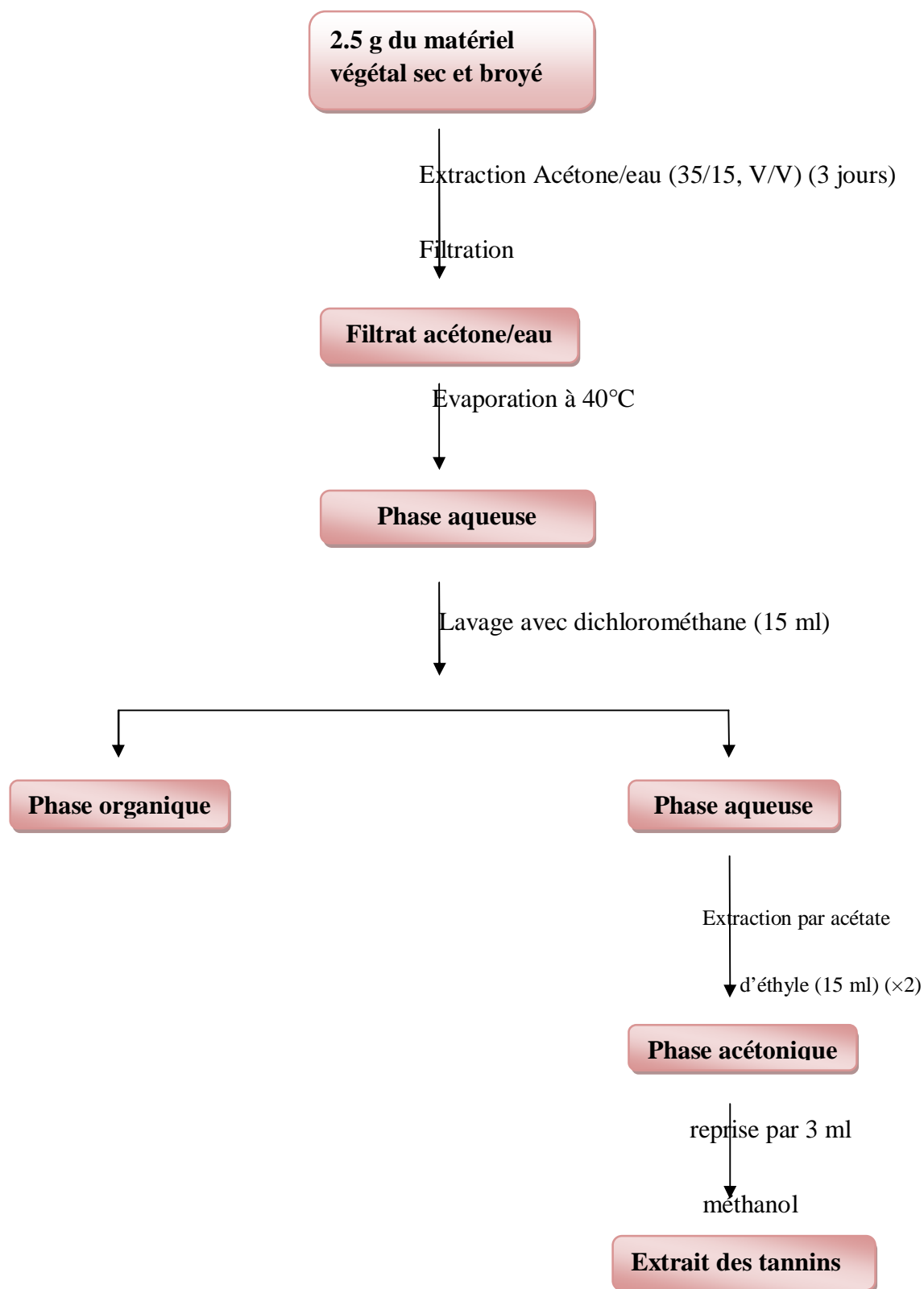


Figure 6 : Protocole d'extraction sélective des tannins (Zhang *et al*, 2008).

Chapitre IV : Etude des pouvoirs antioxydant et antimicrobien

1. Etude du pouvoir antioxydant

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des tannins de la partie aérienne de *P. chloranthus* a été réalisée par trois méthodes à savoir : la capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH[•].

1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) de l'extrait est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Prieto *et al* (1999)**. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdate Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate /Mo(V) à pH acide .

Un volume de 0.3 ml de l'extrait des tannins est mélangé avec 3 ml de solution de réactif (acide sulfurique 0.6M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes sont visés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS). Les expériences sont répétées trois fois.

1.2. Réduction du fer (FRAP : *Ferric reducing antioxidant power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité de l'extrait testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}).

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**. En effet, 1 ml de différentes concentrations (2 , 1 , 0.5 , 0.25 , 0.125 , 0.0625 mg/ml) de l'extrait des tannins est mélangé avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. En suite, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml FeCl_3 (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Specord^R 200 plus.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

L'acide ascorbique est utilisé comme un contrôle positif. Les expériences sont répétées deux fois.

1.3. Piégeage du radical DPPH*

L'effet de l'extrait de *P.chloranthus* sur le (DPPH*) est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez et ses collaborateurs (1998)**. Un volume de 50 µl de différentes concentrations de l'extrait des tannins (4 , 2 , 1 , 0.5 , 0.25 , 0.125 mg/ml) est ajouté à 1.950 µl de la solution méthanolique du DPPH (0.025 g/l) fraîchement préparée. L'absorbance est mesurée à 515 nm après 30 min d'incubation à la température ambiante. Les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH sont calculés à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{échantillon}}) / DO_{\text{témoin}}] * 100$$

Où : $DO_{\text{témoin}}$: représente l'absorbance du contrôle sans extrait après 30 min.

$DO_{\text{échantillon}}$: représente l'absorbance en présence d'extrait après 30 min.

La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait nous a permis de calculer la concentration efficace (efficient concentration value : EC_{50}). Cette dernière est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du DPPH à 50 %.

2. Etude du pouvoir antimicrobien

Les tests antibactériens et antifongiques ont pour but de rechercher l'activité biologique de l'extrait des tannins de la partie aérienne de *P. chloranthus* vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries et levure.

2.1. Les souches testées

Les microorganismes utilisés dans notre étude sont mentionnés dans le tableau 4 :

Tableau 4 : Souches utilisées dans les différents tests antimicrobiens.

Microorganismes	Gram	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538	MNHN
<i>Micrococcus luteus</i>		ATCC 9341	
<i>Listeria monocytogenes</i>		ATCC 15313	La PRONAT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	négatif	ATCC 27853	MNHN
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 8739	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC 13047	La PRONAT
<i>Candida albicans</i>	Levure	ATCC 10231	LAPSAB

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturel, Paris.

La PRONAT : Laboratoire des **Produits Naturels**.

LAPSAB : Laboratoire Antibiotique, antifongique, **Physicochimique**, **Synthèse et Activité Biologique**.

2.2. Conservation des souches

Elle a été réalisée par ensemencement des souches isolées sur gélose nutritive inclinée en tubes à essais, les cultures pures sont conservées à + 4°C à l'obscurité.

2.3. Les milieux de culture utilisés

Suivant les méthodes employées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisés comme milieux de culture les suivants :

- Bouillon et Gélose Mueller Hinton pour les bactéries (Sigma-Aldrich).
- Bouillon et Gélose Sabouraud pour la levure (Sigma-Aldrich).

2.4. Les techniques microbiologiques

2.4.1. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et antifongiques

a. Principe

Le but de réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques.

2.4.1.1. Choix des antibiogrammes

Nous avons utilisés des disques de 6 mm de diamètre imprégnés des antibiogrammes à différentes concentrations conditionnés par le fabricant (Institut Pasteur, Alger) par paquets de 50 disques.

Tableau 5 : Liste des antibiogrammes testés sur les bactéries et la levure.

Antibiogrammes	Abréviations	concentration
Amoxicilline + acide chlavanique	AMP	20-10 µg
Gentamycine	GEN	10 µg
Acide nalidixique	NAL	30 µg
Oxacilline	OXA	1 µg
Bacitracine	B	10 UI
Spiramycine	SPI	10 µg
Cefalexine	LEX	30 µg
Colistine	COL	50µ
Lincomycine	L	15 µ
Cotrimoxazole	SXT	25 µ
Doxycycline	DOX	30 µ
Ampicilline	AMP	10 µ
Neomycine	NEO	30UI
Nystatine	/	30 µg

2.4.1.2. Préparation de l'inoculum

Pour la fixation de l'inoculum de départ on à employés une méthode photométrique (Atwal, 2003).

- ✓ A partir d'une préculture d'environ 20 h (d'environ 20 h sur bouillon Mueller Hinton pour les bactéries, et 48h sur bouillon Sabouraud pour la levure), préparer une suspension bactérienne et l'homogénéisé, la densité optique doit être de 0,08 à 0,1 mesuré à 625nm (10^8 UFC/ml).
- ✓ L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien du milieu stérile s'il est trop fort.
- ✓ L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

2.4.1.3. Ensemencement

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- ✓ Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (**Rahal et al., 2011**).

2.4.1.4. Application des disques d'antibiogramme

- ✓ Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.
- ✓ Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé (**Rahal et al., 2011**).

2.4.1.5. Incubation

Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37C°pour les bactéries et pendant 48h à 30C°pour la levure.

2.4.1.6. Lecture

- ✓ On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée sur le fond de la boîte ;
- ✓ On compare les résultats aux valeurs critiques ;
- ✓ Selon le diamètre d'inhibition, on classe la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire, ou **R**esistance.

2.4.2. Sensibilité des souches vis-à-vis de l'extrait des tannins de la partie aérienne de *P.chloranthus*

2.4.2.1. Préparation de l'extrait

L'extrait sec des tannins est récupéré dans le Dimethyl sulfoxyde (DMSO) (Sigma Adrich) avec une concentration de 300 mg/ml.

2.4.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait des tannins

La méthode de diffusion est très utilisée en microbiologie, repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (**Broadasky et al., 1976**).

➤ Méthode de diffusion sur agar (méthode des disques) :

L'activité antimicrobienne a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion sur agar. Des boîtes de Pétris stériles préalablement coulées par des milieux (Müller Hinton pour les bactéries, et Sabouraud pour la levure), ont étéensemencées à l'aide d'un écouvillon stérile à partir d'une suspension microbienne (10^7 cellule/ml). Puis, des disques de papier filtre stérile de 6 mm de diamètre, imprégnés de 10 μ l de l'extrait des tannins, ont été déposés stérilement sur la surface des milieux. Après incubation de 24h à 37 °C pour les bactéries et 48h à 30°C pour la levure, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition. Toutes les expériences ont été répétées trois fois, (**Lesueur et al., 2007 ; Boulekbache et al., 2012**) (figure 7).

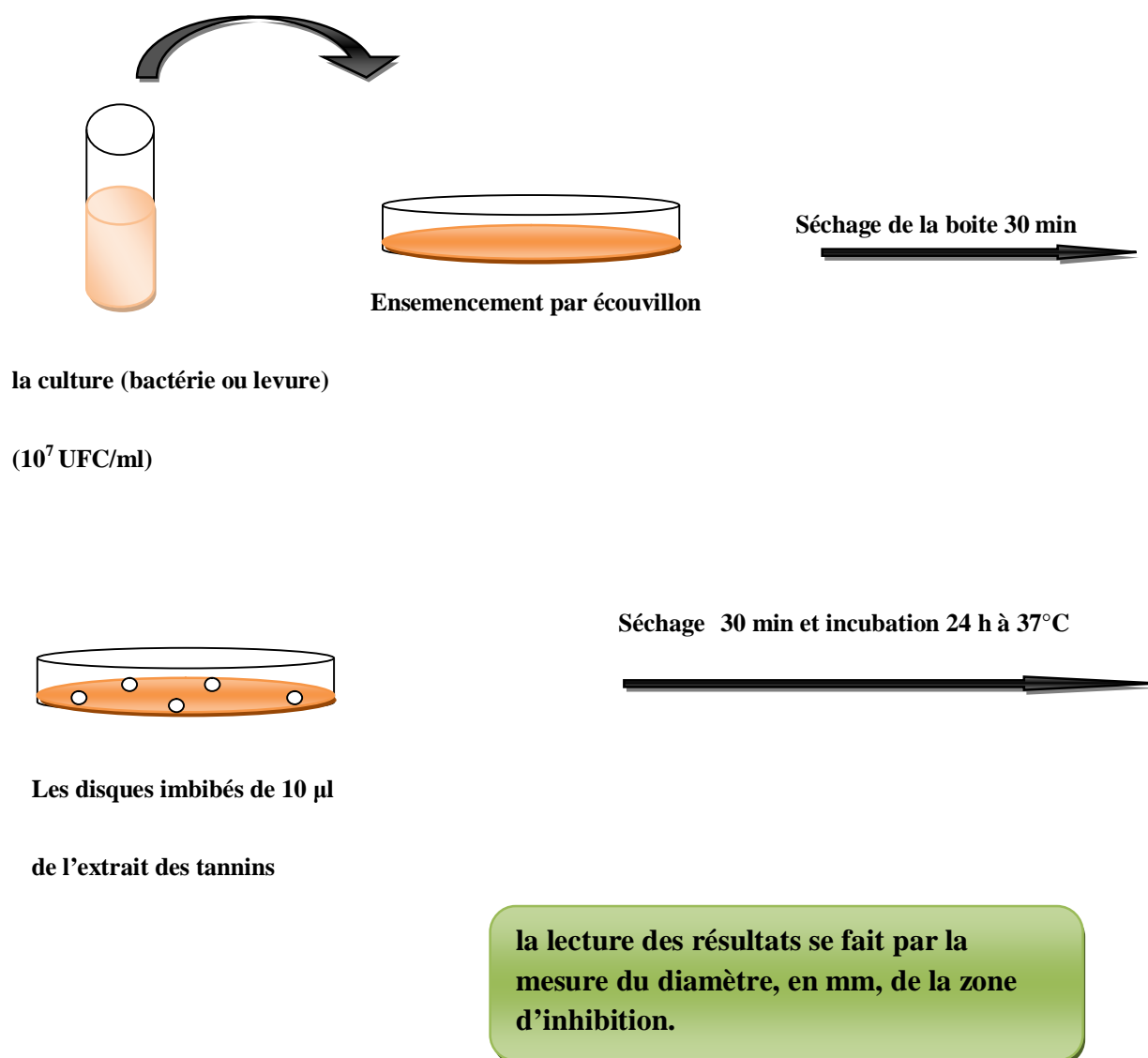


Figure 7 : Méthode de Boulekbache et al.,(2012).

3. Analyse statistique des résultats

Dans toutes les expériences du dosage et d'évaluation de l'activité antioxydante, les données expérimentales obtenues ont été exprimées en tant que la moyenne \pm l'écart-type. Le coefficient de corrélation (R^2) de l'activité antioxydante a été déterminé en utilisant les programmes Origin 6 et l'Excel 2003.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus* en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la partie aérienne de *P.chloranthus* sont résumés dans le tableau 6.

Cette analyse phytochimique nous a permis de mettre en évidence six familles chimiques, les flavonoïdes, les tannins, les coumarines, stérols et triterpènes, hétérosides et les saponosides.

Suite à notre recherche bibliographique il n'y a pas eu de travaux sur la composition chimique de l'espèce *P.chloranthus* à l'exception des travaux réalisés par **Halim et al., 1995** sur une plante de même genre qui est *P.triradiatus* et qui a démontré la présence des coumarines dans la partie aérienne.

Tableau 6 : Résultats des tests phytochimiques de la partie aérienne de *P.chloranthus*.

Familles chimiques	Partie aérienne de la plante
Amidon	-
Saponosides	+
Tannins	++
Flavonoïdes	++
Anthocyanes	-
Flavonoïdes	-
Tannins galliques	-
Tannins catéchiques	+
Composés réducteurs	-
Alcaloïdes	-
Coumarines	+
Stérols et triterpènes	+
Hétérosides	+

Réaction faiblement positive : + Réaction positive : ++ Réaction négative : -

II. Dosage des tannins

1. Les rendements en extraits secs de la partie aérienne de *P. chloranthus*

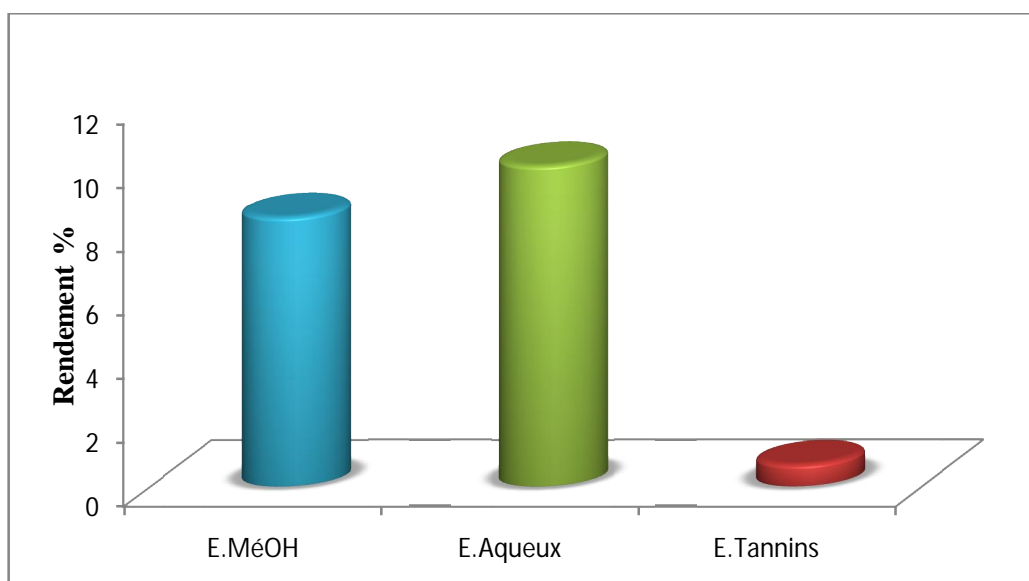


Figure 8 : Rendement en extraits obtenus à partir de la partie aérienne de la plante.

E : Extrait

E.MéOH : Extrait méthanolique.

Nous constatons que l'extrait brut aqueux de *P. chloranthus* enregistre un fort rendement de l'ordre de 10.07 % suivi par l'extrait méthanolique à raison de 8.45% et l'extraction des tannins par acétone/eau a donné un taux de 0.68% (Figure 8, Annexe 2). Nos rendements sont supérieurs à ceux trouvés par **Bouaziz et al (2009)**, ainsi ils ont obtenu avec l'extraction par méthanol à chaud et à l'eau un rendement de l'ordre de 3.10 % et 5.0 % respectivement dans la partie aérienne de *P.chloranthus*.

2. Dosage des tannins

La quantification des tannins a été effectuée par une méthode adaptée par **Zhang et al (2008)**. Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g MS) (Figure 9).

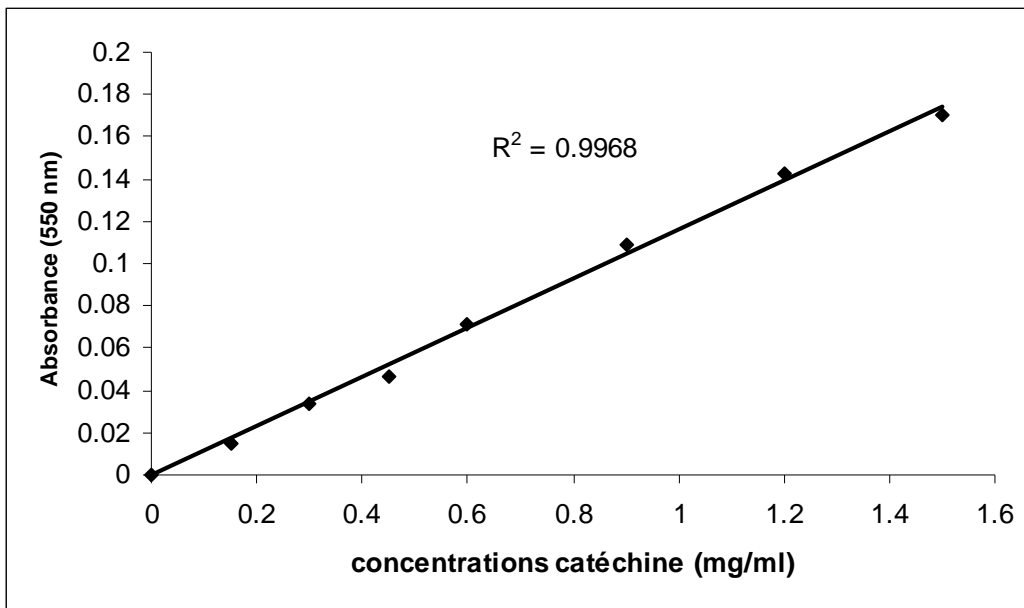


Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 10, annexe 3. Les teneurs en tannins sont de l'ordre de $9,01 \pm 0,60$; $1,66 \pm 0,10$ mg EC/g MS respectivement, nous avons remarqué que la teneur enregistrée dans l'extrait méthanolique est la plus importante par rapport à l'extrait aqueux.

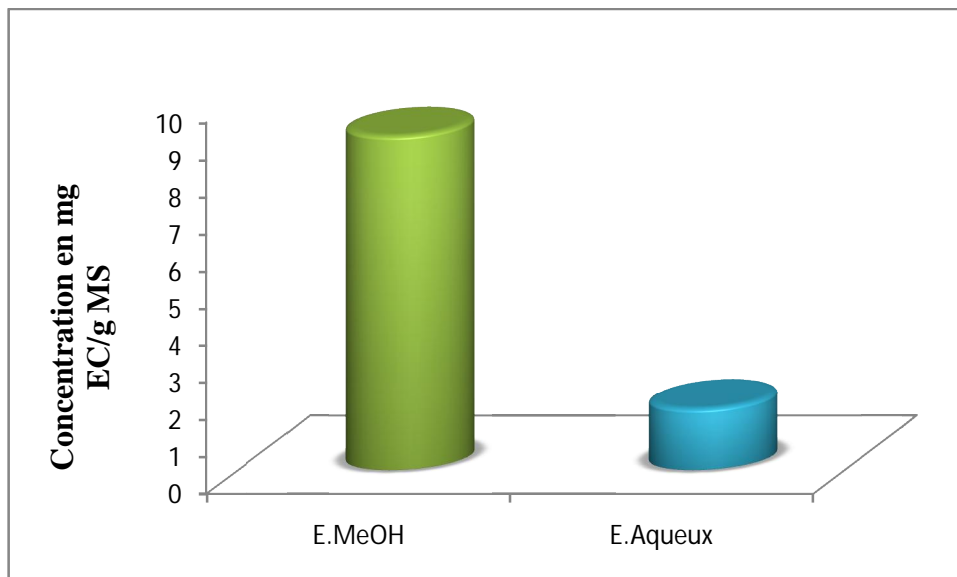


Figure 10 : Teneurs en tannins pour l'extrait méthanolique et aqueux de la plante étudiée.

Nous n'avons pas pu comparer nos résultats par manque de travaux sur le dosage des tannins de cette plante.

Les travaux de **Bouaziz *et al* (2009)** montrent la présence des phénols totaux et des flavonoïdes avec des concentrations très important allant de 314 ± 38 (mg PyE/100 g) , 19 ± 2 (mg RuE/100 g) respectivement dans l'extrait méthanolique et de l'ordre de 372 ± 45 (mg PyE/100 g) , 38 ± 4 (mg RuE/100 g) respectivement dans l'extrait aqueux de *P. chloranthus*.

III. Etude de l'activité antioxydante

Nous avons utilisé l'extrait des tannins pour tester la méthode de CAT (capacité antioxydante totale), de réduction de fer (FRAP) et le piégeage de radical libre DPPH.

1. La capacité antioxydante totale (CAT)

Les résultats obtenus nous révèlent que la capacité antioxydante de l'extrait des tannins est de l'ordre de $(0.9538 \pm 0.0995$ mg EAA/g MS).

2. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des tannins à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺. La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (**Karagozler *et al.*, 2008**).

Dans notre travail nous l'avons opté pour tester l'extrait de tannins de la partie aérienne de la plante étudiée. Les résultats représentés dans la (Figure 11, Annexe 5) nous ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons (**Liuk *et al.*, 2009**).

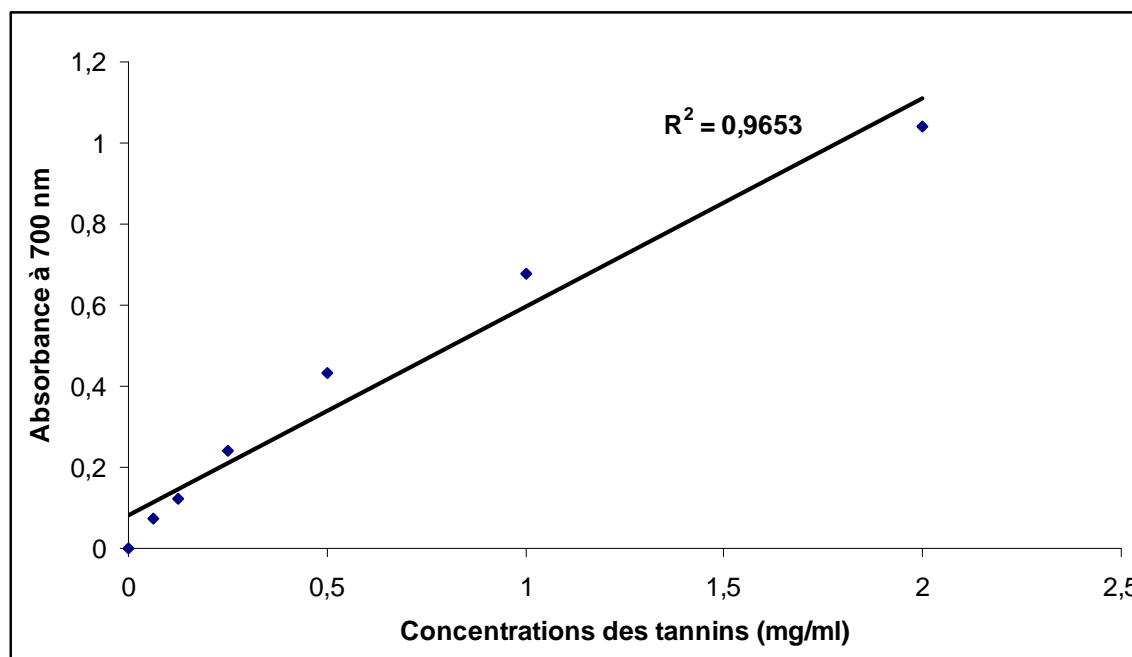


Figure 11 : Pouvoir réducteur des tannins de *P.chloranthus* par la méthode de FRAP.

Selon la figure 11, nous avons remarqués une augmentation proportionnelle de la densité optique avec les différentes concentrations de l'extrait et à la concentration de 2 mg/ml, le pouvoir réducteur de l'extrait des tannins de *P.chloranthus* donne une densité optique de 1.0423, on peut dire que cet extrait a une activité moyenne de réduction de fer avec $EC_{50} = 0.82 \pm 0.191$ mg/ml comparé à EC_{50} de l'acide ascorbique (0.06 mg/ml).

Nous n'avons pas trouvés des travaux réalisés sur le pouvoir réducteur de *P.chloranthus* pour comparer nos résultats.

3.La méthode de piégeage de radical libre DPPH

L'activité antioxydante de l'extrait de tannins de *Pituranthos chloranthus* vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515nm (Figure 12). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires (Majhenic *et al.*, 2007).

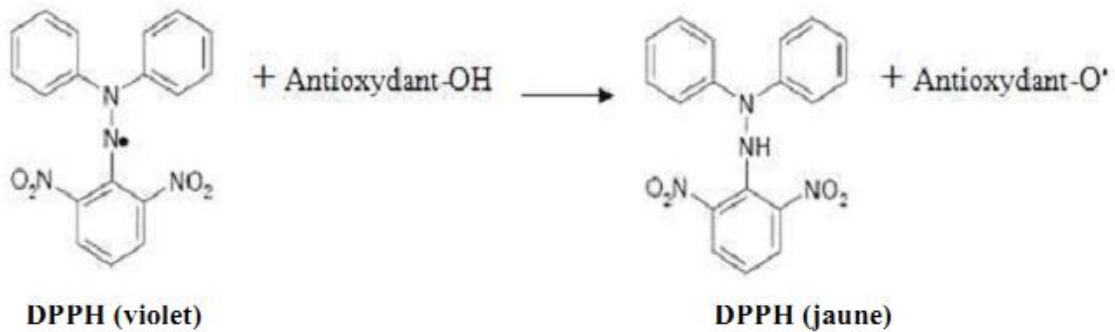


Figure 12 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

La figure 13 illustre les résultats du pouvoir antioxydant des tannins par la méthode de piégeage de radical libre DPPH.

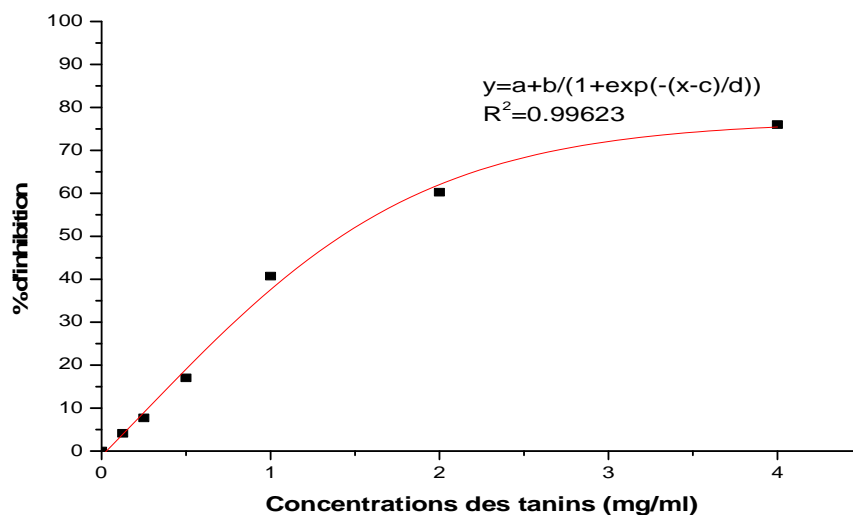


Figure 13 : Pouvoir antioxydant de l'extrait des tannins de *P. chloranthus*.

Nous avons exprimé l'activité antioxydante de cet extrait en EC_{50} , cette dernière définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% de DPPH en solution. Plus la valeur EC_{50} est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande (**Pokorny et al., 2001**).

Nous remarquons que la valeur EC_{50} de l'extrait des tannins est égale à 1.49 ± 0.032 mg/ml, nous avons comparé nos résultats à l'acide ascorbique pris comme antioxydant de référence justifié par la valeur $EC_{50} = 0.12$ mg/ml, ceci nous a permis de conclure que l'extrait des tannins de *P. chloranthus* a un pouvoir antioxydant plus ou moins important. Cet extrait présente un pourcentage d'inhibition de 76.02% à une concentration de 4mg /ml.

Aucun travail n'a été effectué sur le pouvoir antioxydant des tannins. Les seuls résultats du pouvoir antioxydant sont celles de DPPH des extraits de la partie aérienne de *P.chloranthus* (**Bouaziz et al.,2009**).

D'après les travaux de **Bouaziz et al (2009)**, l'activité antioxydante de *P.chloranthus* est de l'ordre de ($2.01 \pm 0.34\text{mg/ml}$ et $4.59 \pm 0.78 \text{ mg/ml}$) respectivement dans l'extrait méthanolique et aqueux.

IV. Pouvoir antimicrobien

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien de l'extrait des tannins de *Pituranthos chloranthus*, on a préféré de les tester contre plusieurs cibles, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

1. Résultats de l'Antibiogramme

Les diamètres des zones d'inhibitions nous ont permis de classer les souches testées suivant leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques (ATB) utilisés.

1.1. *Escherichia coli* ATCC 8739

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans la figure 14, les antibiotiques (cotrimoxazole, neomycine, gentamicine, acide nalidixique et colistine) sont les plus efficaces sur *Escherichia coli* avec des zones d'inhibition de 28, 24, 24, 20 et 15mm, respectivement (Annexe 7)

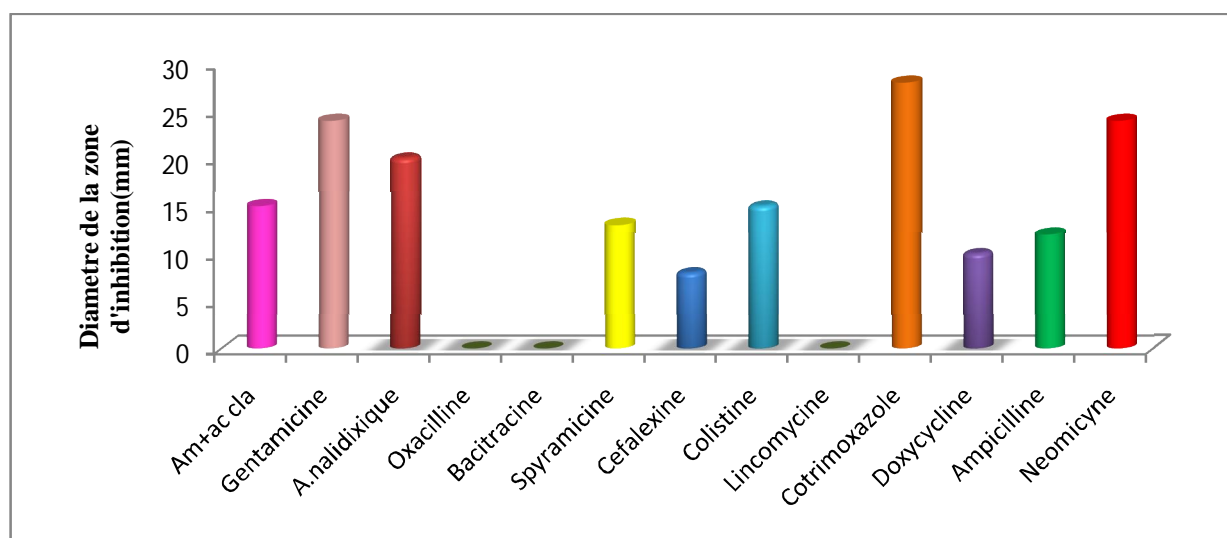


Figure 14 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testé sur *Escherichia coli* ATCC 8739.

Am+ac cla : Amoxicilline + acide clavulanique.

A : Acide.

Le tableau 7 et la photo 2 résument les interprétations des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques où cette souche est résistante à la plupart de ces antibiotiques.

Tableau 7 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Escherichia coli* (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline + acide clavulanique	R
Gentamicine	S
Acide nalidixique	S
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	R
Ampicilline	R
Neomicyne	S

S : Sensible, **I** : Intermédiaire, **R** : Résistante.

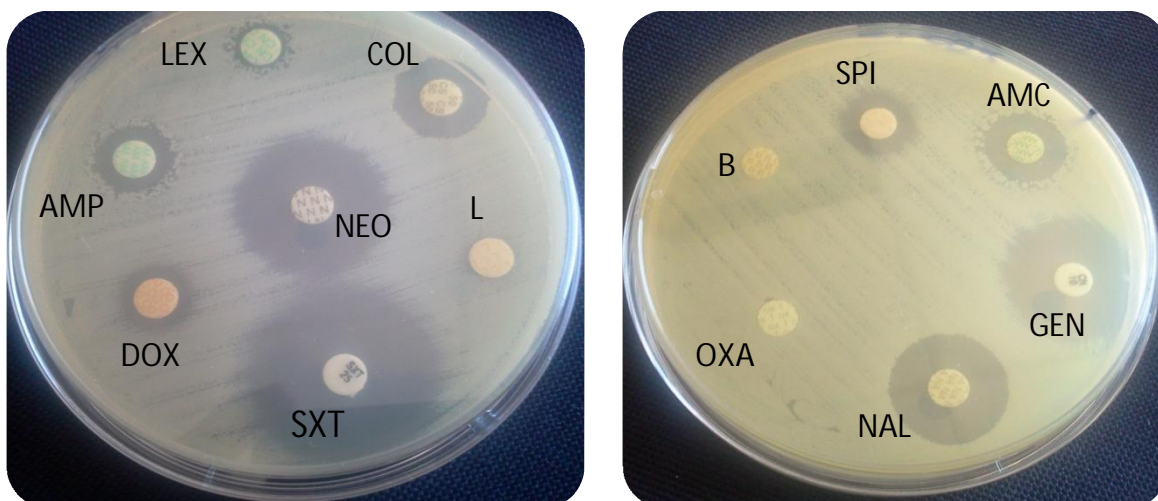


Photo 2: Antibiogramme d'*E. coli*.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Cette souche à Gram négatif est résistante à tous les antibiotiques à l'exception des deux antibiotiques qui sont inhibiteurs de la croissance (amoxicilline + acide clavulanique, colistine) possèdent des zones d'inhibition respective 20 et 16 mm (Figure 15 et Annexe 8).

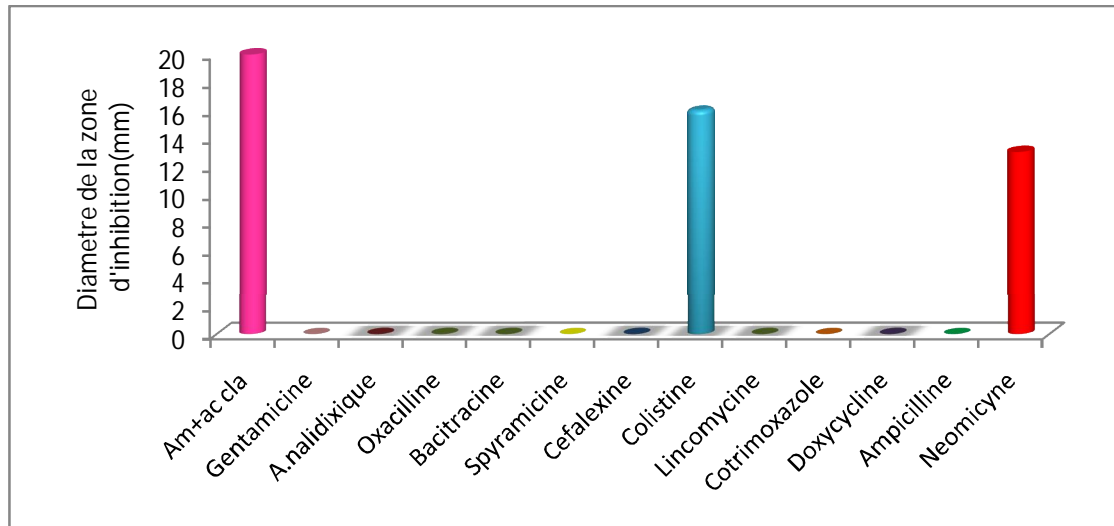


Figure 15 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Nous constatons une sensibilité de la souche *Pseudomonas aeruginosa* testé vis-à-vis de la colistine et l'amoxicilline + acide clavulanique, ainsi qu'une résistante totale contre le reste des antibiotiques (Tableau 8).

Tableau 8 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition Pour *Pseudomonas aeruginosa* (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline + acide clavulanique	I
Gentamicine	R
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	R
Doxycycline	R
Ampicilline	R
Neomicyne	R

1.3. *Klebsiella pneumonia* ATCC 13047

Nous avons constaté une sensibilité de la souche *K.pneumonia* testés vis-à-vis de neomycine , cotrimoxazole, colistine et gentamicine avec des zones d'inhibitions de l'ordre de 21, 21,17 et 16mm respectivement et une résistante pour les autres antibiotiques (Figure 16,Annexe 9).

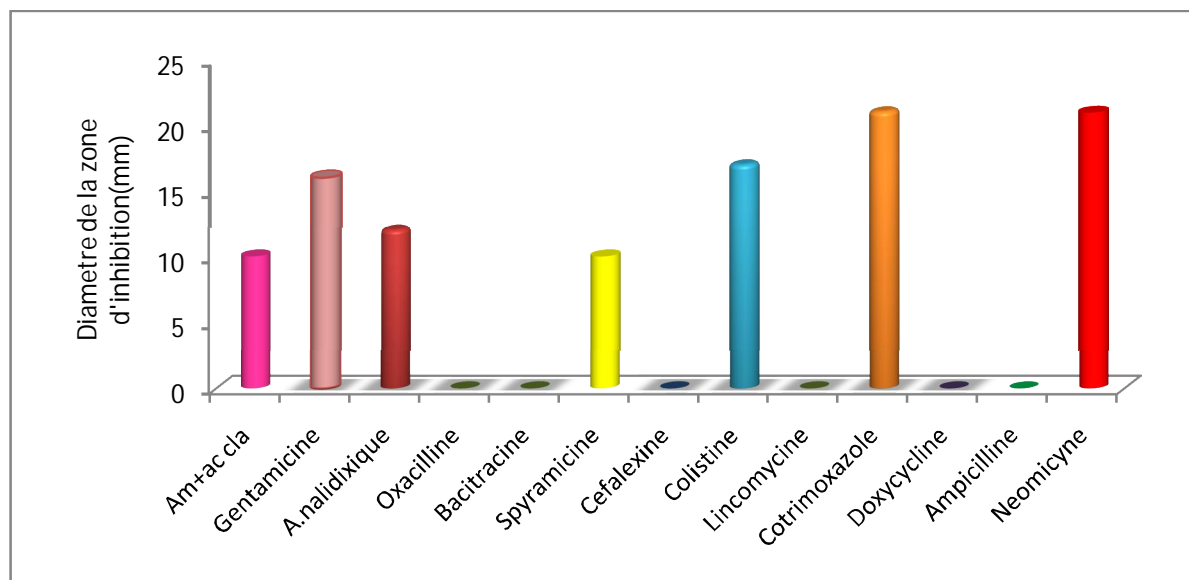


Figure 16 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Klebsiella pneumonia* ATCC 13047.

D'après le tableau 9 et la photo 3, *Klebsiella pneumonia* est sensible aux quatre antibiotiques (neomycine , cotrimoxazole, colistine et gentamicine) et résistante aux autres.

Tableau 9 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition Pour *Klebsiella pneumonia* (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide Clavulanique	R
Gentamicine	I
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	R
Ampicilline	R
Neomicyne	S

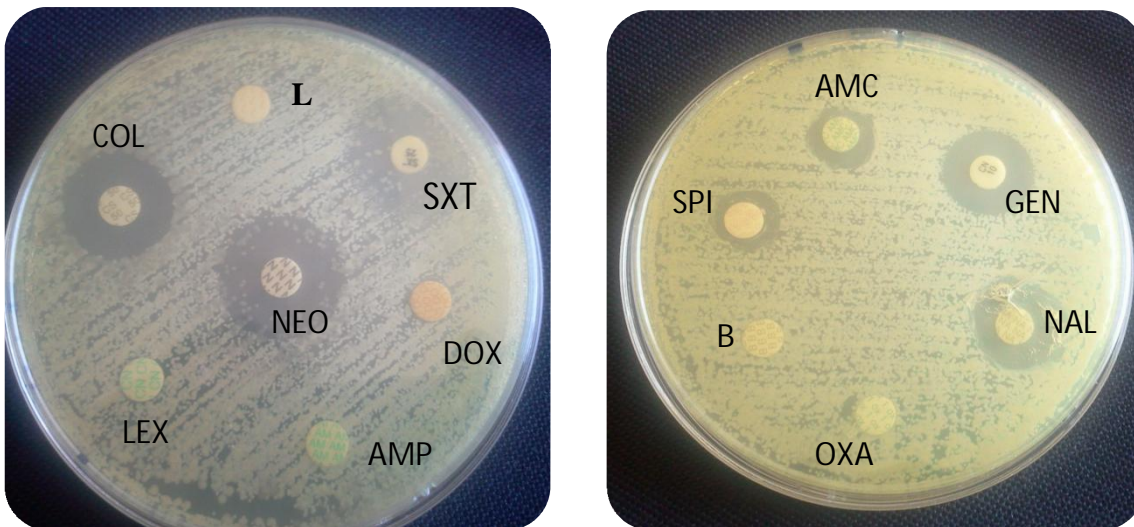


Photo 3: Antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*.

1.4. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Concernant la souche *S.aureus*, nous avons vu qu'il y a une inhibition par la gentamicine, l'acide nalidixique, la colistine, la cotrimoxazole, la neomycine, la cefalexine et l'ampicilline (Figure 17, Annexe10).

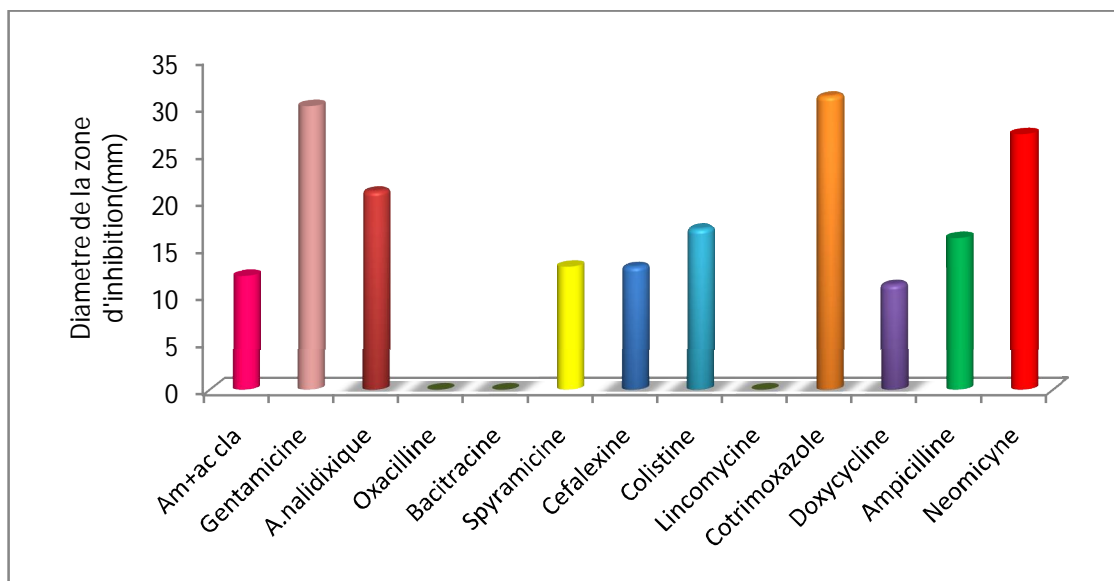


Figure 17 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Les résultats obtenus nous montre que *S.aureus* est sensible presque à la moitié des antibiotiques testés et résistante aux restes (Photo 4, Tableau 10).

Tableau 10 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	R
Gentamicine	S
Acide nalidixique	S
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	I
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	R
Ampicilline	I
Neomicyne	S

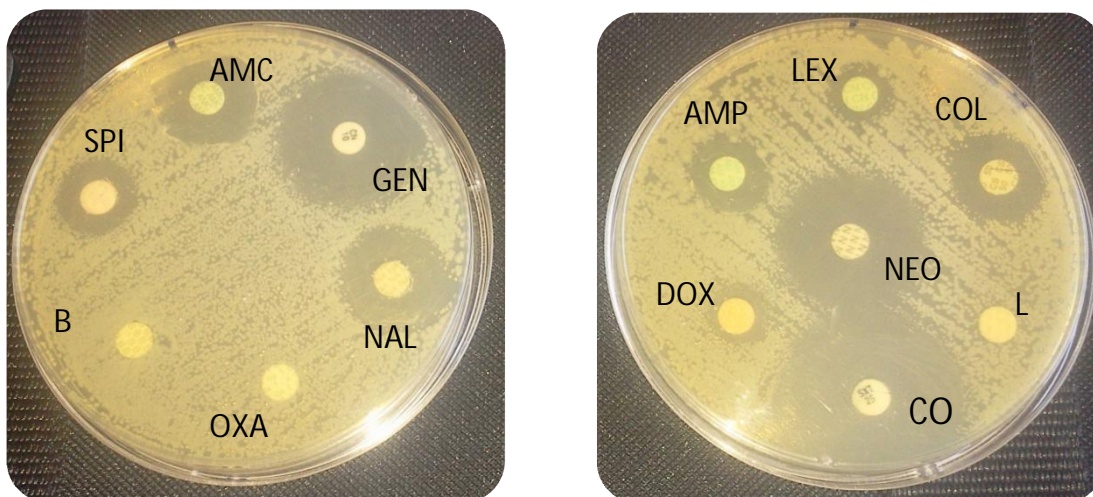


Photo 4: Antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

1.5. *Micrococcus luteus* ATCC 9341

D'après la figure 18, *M.luteus* est sensible aux cotrimoxazole, gentamicine, neomycine, l'amoxicilline + acide clavulanique, colistine, spyramicine et l'ampicilline avec des zones d'inhibitions de 33, 27, 25,18,17,17 et 16mm respectivement, et résistante pour les autres antibiotiques (Annexe 11).

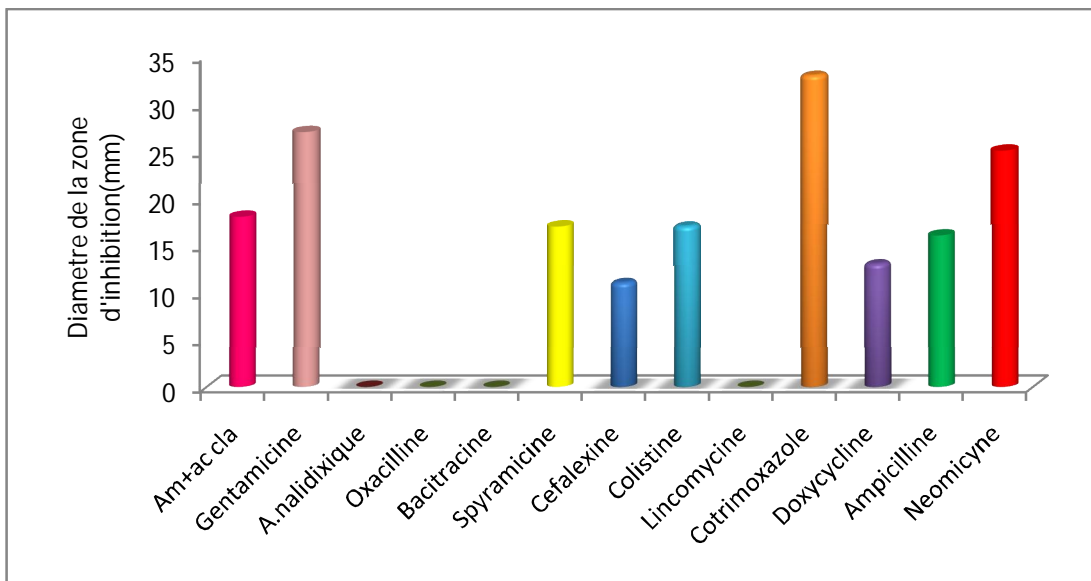


Figure 18 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

De même que *M.luteus* est sensible aux antibiotiques gentamicine, colistine, cotrimoxazol et la neomycine et présente une inhibition intermédiaire pour l'amoxicilline + acide clavulanique, spyramicine et l'ampicilline et une résistante pour les autres antibiotiques (Tableau 11).

Tableau 11 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Micrococcus luteus*. (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	I
Gentamicine	S
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	R
Ampicilline	I
Neomicyne	S

1.6. *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

La figure 19 et l'annexe 12 ont montré que la souche *L.monocytogenes* , est sensible à la gentamicine et la colistine avec les diamètres 20 et 16mm respectivement et résistante aux autres antibiotiques.

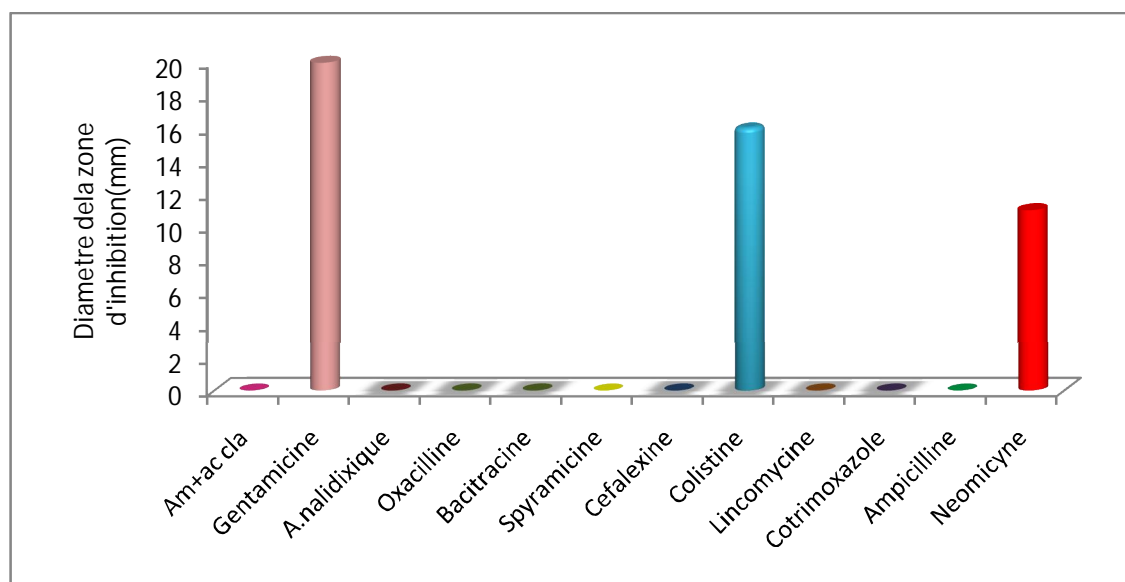


Figure 19 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

Le tableau 12 révéla une résistance de *L.monocytogenes* vis-à-vis de tous les antibiotiques à l'exception de leur sensibilité aux gentamicine et la colistine.

Tableau 12 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Listeria monocytogenes* (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	R
Gentamicine	S
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spyramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	R
Ampicilline	R
Neomicyne	R

2. Pouvoir antifongique

Afin de tester le pouvoir antifongique de la levure *Candida albicans*, nous avons mis en présence de la nystatine à la concentration (30 µg) ou elle a révélé une résistante totale par rapport à celle-ci.

3. Pouvoir antimicrobien de l'extrait des tannins

Nous rapportons sur le tableau 13, les diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait des tannins de *P.chloranthus* relatif aux souches bactériennes testées.

Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de *P.chloranthus* pour les six souches bactériennes (en mm).

Les souches testées	Diamètres des zones d'inhibition en(mm)	
	Extrait des tannins [C] = 300mg/ml	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	7.0	00
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	00	00
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	00	00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	00	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	00	00
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13047	00	00

L'extrait des tannins de *P. chloranthus* dont la concentration est égale à 300 mg/ml n'a pas empêché la croissance des bactéries testées, à l'exception d'une faible inhibition de l'ordre de 7mm a été démontrée sur *Staphylococcus aureus*, bactérie Gram positif.

La levure *Candida albicans* apparait plus résistante vis-à-vis de notre extrait, donc ce dernier est sans effet sur la croissance de cette levure (Tableau 14).

Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de *P.chloranthus* pour la levure testée.

Les souches testées	Diamètres des zones d'inhibition (en mm)	
	Extrait des tannins	DMSO
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	00	00

Il a été rapporté par **Bouaziz et al (2009)** que les extraits obtenus par l'hexane et l'eau de *P.chloranthus* ont révélés une activité inhibitrice sur *P.aeruginosa* et sur *E.coli* avec des zones d'inhibition 14,12mm respectivement.

D'après les travaux de **Athamena et al (2010)**, *S.aureus* ATCC une bactérie Gram (+), s'est révélée sensible à l'extrait hydro-méthanolique de *Cuminum cyminum* L. (famille des Apiacées) avec des zones d'inhibition de 16.33 ± 0.58 mm utilisant une concentration de 10µl par disque.

L'hypersensibilité de la souche *S.aureus* ATCC peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels (**Balentine et al., 2006**).

Selon les travaux de **Benmekhbi et al (2008)**, l'extrait butanolique de *P. scoparius* avec une concentration de (128µg/ml) et suivant la méthode de diffusion de disque montre une bonne activité antibactérienne contre les microorganismes *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, et *Staphylococcus doré* avec des zones d'inhibition de l'ordre de 30mm.

Les résultats de l'activité antifongique obtenue par **Athamena et al (2010)** ont montré l'inefficacité de l'extrait brut hydro-méthanolique du *Cuminum cyminum* L. contre l'ensemble des souches testées (*Candida albicans*, *Candida kefyr* et *Aspergillus niger*). Par conséquent, les résultats d'**Ertürk (2006)**, ont démontré des zones d'inhibition de 14 mm de l'extrait éthanolique du *Cuminum cyminum* L. vis-à-vis de *Candida albicans*, ce qui explique que l'activité antifongique dépend du solvant utilisé pour l'extraction.

Nous pouvons conclure que notre extrait tannin n'a aucune activité antimicrobienne malgré l'utilisation de forte concentration de l'ordre de milligramme par rapport aux autres travaux réalisés ayant des concentrations très faibles de l'ordre de microgramme. Certains auteurs ont mis en évidence le pouvoir antibactérien important des flavonoïdes (épigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine) (**Shan et al., 2007**).

CONCLUSION GENERALE

Les plantes aromatiques et médicinales sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale. Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les antioxydants sembleraient de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre du jour.

Notre étude porte sur l'espèce *Pituranthos chloranthus* qui est utilisée en médecine traditionnelle comme antidiabétique, contre les rhumatismes et les céphalées.

Les tests phytochimiques nous révèlent la présence des tannins, des flavonoïdes, des stérols et triterpènes, coumarines, des saponosides et hétérosides.

La détermination du rendement de l'extrait brut de *P.chloranthus* (10.07 %) issus de l'extraction aqueuse est supérieur à l'extrait méthanolique avec un rendement de (8.45 %).

Le dosage des tannins des deux extraits (aqueux et méthanolique) montre une teneur considérable dans l'extrait brut méthanolique ($9,01 \pm 0,60$ mg EC/g MS) par rapport à l'extrait aqueux ($1,66 \pm 0,10$ mg EC/g MS). L'extraction sélective des tannins utilisant le mélange acétone, eau nous donne un rendement de 0.68%.

L'étude du pouvoir antioxydant de l'extrait des tannins est réalisée par trois méthodes, la CAT (capacité antioxydante totale), réduction de fer (FRAP) et piégeage de radicale libre DPPH.

Les résultats par le piégeage de radical libre DDPH nous révèlent une certaine activité des tannins avec une concentration $EC_{50} = 1.49 \pm 0.032$ mg/ml. Les tannins présentent une capacité réductrice considérable avec 0.82 ± 0.191 mg/ml comparée à celle de l'acide ascorbique (0.06 ± 0.002 mg/ml) et une faible capacité antioxydante totale de (0.9538 ± 0.0995 mg EAA/g MS).

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion des disques de l'extrait de tannin dissout dans le DMSO vis-à-vis de six souches bactériennes (trois Gram(+)) et trois Gram(-)) a permis de visualiser une faible action inhibitrice de notre extrait sur *Staphylococcus aureus* par rapport aux autres souches qui possèdent une croissance normale et en comparaison avec les antibiotiques testés qui donnent des activités inhibitrices très remarquables.

L'étude de pouvoir antifongique de l'extrait ne montre aucune activité vis-à-vis de la levure testée *Candida albicans*. Cet résultat est confirmé par le test antifongique de la nystatine (30µg) et qui se révèle sans effet.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement actives.

Toutefois, il serait intéressant d'approfondir les investigations phytochimiques et biologiques sur cette espèce afin d'isoler les molécules responsables des activités observées, ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base des plantes médicinales.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIE

 **A**

Abdelwahad, A., Hayder N., Hilani, S., Mahmoud, A., Chibani, J., Hmami, M., Chekir-Gherdira, L., Ghedira, K.(2006).Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tourtuosud* (Coss). *Maire. Flavour Fragr. J.* (21): 129-133.

Ahamet, S. (2003). Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (*Balanitaceae*). Thèse Pharmacie, Bamako : 117.

Antolovich, M., Prenzler P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K.(2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* (127) : 183-198.

Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S.(2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L.

Atik Bekkara, F., Benhammou, N., Panovska, K.T. (2008). Biological activity of essential oil and the extract of the extract of the phenolic compounds of *Inula viscosa* of the area of Tlemcen (Algeria). *Advances in Food Science* : 30.

Atwal, R. (2003). In vitro Antimicrobial Activity Assessment of Zymox Otic Solution Against a Broad Range of Microbial Organisms. *Int. J. Res. Veterinary Medicine*. Rancho Dominguez. California.

Ayad, R. (2008) Recherche et Détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce : *Zygophyllum cornutum* (*Zygophyllaceae*).Thèse de Magister spécialité chimie organique Université Mentouri de Constantine.

 **B**

Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W. (2006). The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*. (73): 413-421.

- Bandoniene, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P.R., Gruzdiene, D. (2002). Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and online HPLC-DPPH methods. *Eur Food Res Technol*,(214): 143-147.
- Barlow, S.M. (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, *Food Antioxidants*: 253-307.
- Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*,(9) 5-21.
- Bate-Smith, E. (1973). Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* (12) : 1809 -1812.
- Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., Danae, C., Ange, B., Felix, T. (2012). Chemical Variability of the Essential Oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chemistry and Biodiversity*,(9): 2743-2753.
- Belarbi-Benmahdi, M., Khaldi, D., Beghdad, C., Gouzi, H., Bendimerad, N., Hammouti, B. (2009). Physicochemical and nutritional study of argan oil (*Argania spinosa* L.) in south-western Algeria. *Pigment & Resin Technology*,(2) : 38
- Belkhiri, F. (2009). Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *Tymus communis* L. et *Carthamus caeruleus* L. Mémoire de Magister, Université de SETIF : 26-27- 47.
- Belkheiri, N. (2010). Dérivés phénoliques et activités antiathérogènes. Thèse en vue de l'obtention du Doctorat de l'université de Toulouse : 113.
- Bendimerad, N., Taleb-Bendiab, S. A., Breme, K., Fernandez, X. (2007). Essential oil composition of aerial parts of *Sinapis arvensis* L. from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*(19).
- Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Panovska, K.T. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*,(2).

- Benmekhbi, L., Kabouche, A., Kabouche, Z., Ait-Kaki, B., Touzani, R., Bruneau, C. (2008). Five glycosylated flavonoids from the antibacterial butanolic extract of *Pituranthos scoparius*. *Chemistry of Natural Compounds* (44) : 5.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13 (2), 184-196.
- Bessas, A., Benmoussa, L., Kerarma, M. (2007). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien.
- Biaye, M. (2002). Action pharmacologique des tannins. Thèse pour l'obtention de Doctorat en Pharmacie. Université de Cheikh Anta Diop de Dakar:101.
- Blois, M.S. (1958). Antioxydant determination by the use of stable free radical, *Nature* : 181.
- Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, *INRA* : 79-82.
- Bouaziz, M., Abdelhafidh, D., Slim, L., Makki, B., Sami, S.(2009). Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *African Journal of Biotechnology*.8 (24) :7017-7027.
- Boulekbache-Makhlouf, L., Slimani, S., Madani, K. (2012). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products* . (41): 85–89.
- Boumaza, A.(2009). Effet de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* coss contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation. Université Mentouri-Constantine.2. In Midoun T.(2011). Extraction des composés phénoliques et étude de leurs activités antioxydantes par la voltametrie cyclique : 32.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxydant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und technologie*(28) : 25-30.

Broadasky, T. F., Lewis, C., Eble T.E. (1976). Bioautographic thin layer chromatophic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr.*, (123): 33-44.

Bruneton, J.(1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3ème Ed. Lavoisier. Paris :199-388.

Burda, S., Oleszek, W.(2001).Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.(49): 2774-2779.



Calderon-Justavio, Angela, Isabel.(2002).Phytochemical study of plants from panama “Henriettella faxicularis”(SW) C. Wright and “Miconia serrulata”(DC) Naud. (Melastomataceae) and chemotaxonomic comparison of “justacia Species (Acanthaceae). Thèse de doctorat, Lausanne.

Cavin . (1999).Invistigationphytochimique de trois plantes Indonisiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire :Tinospora crispa (Ménispermacées),Merremia emarginata(Convulvacées) et Oropea enneandra (Annonacées).Thèse présentée en vue de l’optention du garde de Docteur en Biochimie,Univercité de Lausanne.Suisse.

Chaabi, M.(2008). *Etude phytochimique et biologique d’espèces végétales africaines :Euphorbia stenoclada Baill. (Euphorbiaceae),Anogeissus leiocarpus Guill. & Perr. (Combretaceae), Limoniastrum feei (Girard) Batt. (Plumbaginaceae)*. Thèse de Magister ; spécialité phytochimie ; Universite Mentouri de Constantine et Universite Louis Pasteur.

Charfi, D. (2001). Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol. La production et la composition minérales de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'Elhajeb (SFAX). Mémoire de thèse de doctorat en Ecologie. COI/T.15NCn°2/Rev.10.

Chebil, L. (2006). Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'institut national polytechnique de Lorraine. INPL, Nancy.

Colette, E. (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse Pharmacie Bamako : 147.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations (2012). Pr C.J. Soussy, R. Bonnet, F. Caron, P. Weber.

Curtay, J.P., Robin, J.M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info*. Centre d'étude et de développement de la nutrithérapie.

D

Debray, M ; Jacquemin, H ; Razafindrambo, R. (1971). Travaux et documents de l'Orstom. Paris.(8).

Del-Bubba, M., Giordanie, E., Pippucci, L., Cincinelli, A., Checchini, L., Galvan, L.(2009). Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different postharvest treatments. *J. Food Comp. Anal.* 22 (7-8): 668-77.

Diallo, A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de Bamako, Mali.

Djeridane, M., Yousfi, B., Nadjemi, D., Boutassouna, P., Stocker, N., Vidal. (2006). Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing Phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97 (4): 654-660.

Dupont, F., Guignard, J.L. (2007). Abrèges botanique systématique moléculaire. 14^{ème} édition révisée, Masson.

E

Earnsworth, N.R., Berderka, J.P., Moses, M. (1974). Screening of Medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (63): 457-459.

Ertürk, Ö. 2006. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia Bratislava*,(61): 275-278.

F

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, (11) : 108-115.

G

Gaffney, S., Williams, V., Flynn, P., Carlino, R., Mowry, C., Dierenfeld, E., Babb, C., Fan, J., Tramontano, W.A.(2004). Tannin/polyphenol effects on iron solubilization *in vitro*. 75(2): 43-52.

Garait, B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université Joseph Fourier-Grenoble.

Gazi, M.R., Kanda, K., Yasuda, M., Kato, F. (2004). Optimisation of cultural conditions and some properties of radical scavenging substances from *sporobolomyces salmonicolor* pak. *Journal Biol. Sci*; (7): 1365-1370.

Guyot, S., Marnet, N. et Drilleau, J.F. (2001). Thiolytic-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerisation states. *J. Agric. Food Chem.* (49) 14-20.



Haba, H., Benkhaled, M.G, Log., C, Lavaud, C.(2004). Natural Product Reseqrch. 18(5) :409- 413.

Hagerman, A.E. (2002). Tannin Chemistry (www.users.muohio.edu/hagermae) In : Séverine, Brunet . Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat .Université de Toulouse.

Halim, A.F., Saad, H.E.A., Lahloub, M.F., Ahmed, A.F.(1995). Phytochemistry, 40 (30) : 927-929.

Hammiche, V., Maiza, K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. J Ethnopharmacol (105) : 358-367.

Hennebelle, T. (2006). Investigation chimique et chimiotoxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota Pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire. France.

Ho, S.C., Tsai, T.H., Tsai, P.J., Lin, C.C. (2008). Protective capacities of certain spices against peroxynitrite-mediated biomolecular damage. Food and Chemical Toxicology, (46): 920-928.

Horn, J., Hayes, J., Lawless, HT.(2002). Turbidity as a measure of salivary protein reactions withastringent substances. Chem. Senses 27 (7): 653-9.

http://www.florasilvestre.es/mediterranea/Umbelliferae/Pituranthos_chloranthus.htm.

 **I**

Iserin, P. (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd édition, Dorling Kindersley Limited, Londres

 **J**

Jean-Blain, C. (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev. Méd. Vét.*(149) : 911-920.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F.(2002). Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. 1ère Edition De Boeck Université. Paris : 383.

Julkunen-Titto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journa of Agricultur and Food Chemistry*, (33):213-217.

 **K**

Kandra, L., Gyeman, G., Zajaez, A., Batta, G.(2004). Inhibitory effects of tannins of human salivary alpha-amylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319(4): 1265-71.

Karagozler, A., Erdag, B., Calmaz- Emek, Y. (2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, *Food Chemistry*, (111): 400-407.

Kocisko, DA.(2004). Evaluation of new cell culture inhibitors of protease resistant prion protein against serape infection in mice. *J. Gen. Verol.*, 85 (8): 2479-83.

 **L**

Lahouel, M., Amedah S., Zellagui A., Touil A., Rhouati S., Benayache F., Leghouchi E., Bousseboua, H. ; (2006). The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effect and flavonoids concentration. *Thérapie*, 61(4), 347-355.

Laraoui, .H.(2007). Docteur de l'université Louis pasteur "*Etude Phytochimique L'Extrait Chloroformique de BupleurumAtlanticum*" 2007.

Lazarus, S.A., Kelm, M.A., Wachter, G.A., Hammerstone, J.F. et Schmitz, H.H. (2003). Analysis and purification of proanthocyanidin oligomers. In: *Methods in polyphenol analysis*, SANTOS-BUELGA et WILLIAMSON (Eds.): 267-283.

Lebham, (2005). Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Lecasble , (2012). Le marc de café comme source atypique de tanins condensés dans le contrôle intégré des nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants du Yucatan, Mexique. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat. École Nationale Vétérinaire d'Alfort : 32.

Lesueur, D., Serra D.de Rocca, Bighelli, A., Hoi, T.M., Ban, N.K., Thai, T.H., Casanova, J.; (2007). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveolata* Meryll ex Dandy from Vietnam. *Flavour and Fragrance Journal*, (22) 317-321.

Li, P., Anu, H., Jari, S., Teijo, Y., Heikki, V. (1999). TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology , *Chemistry and Nutrition*,(10) : 123-187.

Lisu, W., Jui-Hung, Y., Hsiao-Ling, L., Ming-Jiuan, W. (2003). Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifeca* Gertn), *Journal of food and drug analysis*, 11(1): 60-66.

Liuk, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H., Zeng, X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng, *Food chemistry*, 112: 35-4.

Lugasi, A ; Hovari, J ; Sagi, K.V ; et Biro, L.:(2003). The role of antioxydant. phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biologica Szegedientsis* 1(4): 119-125.



Majhenic, L., Kerget, M.S., Knez, Z.(2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, (104), 1258–1268.

Marais, J.P.J., Mueller-Harvey, I., Brandt, E.V. et Ferreira, D. (2000). Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *J. Agric. Food Chem.*(48) 3440-3447.

Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., Fritsch, P.; (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxidant dans les aliments. *Médecines Sciences*,(20) 458-464.

Miller, N-J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A.(1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, (384) 240-242.

Mole, S., Waterman, P.G. A.(1987). critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II, Techniques for biochemically defining tannins. *Oecologia*, ,(72) : 148-156.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Song Klama Karin J.Sci. Technol*, 26 (2): 211-219.

Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86 (13), 2010-2037.



Nait-Said, N.(2007).Etude phytochimique des extraits chlorophormiques des plantes: Pituranthos chluranthos et Marrubium vulgare. Mémoire de Magister de Université EL-Hadj Lakhdar- Batna : 88.

 O

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, (44): 307-315.

Ozenda, P. Flore du Sahara, 1958, Ed. CNRS Paris France.

 P

Paolini, V., Dorchies, Ph., Hoste, H. (2003). Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Alter. Agri*: 17-19.

Paris, R., Moyse, H. (1969). Précis de matière médicale (Tome 3). Paris : Masson et Cie.

Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Koleva, I., Ilieva, M. (2002). Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Naturforsch*, (57): 640-644.

Pincemail, J., Defraigne J.O. (2004). Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène, Symposium « antioxydant et alimentation » institut Danone.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.

Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidin. *Phytochemistry* (1) 223-230.

Pourrut ,B. (2008). Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité : Ecotoxicologie. France.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, (269): 337-341.

Q

Quezel, F., Sanata, S. Nouvelle Flore de l'algérie et des Régions Désertiques Méridionales, 1(2) Ed. CNRS, Paris France, 1962, 1963.

R

Rahal, K., Benslimani, A., Tali –Maamar, H., Missoum, M.F.K., Kechih-Boumar, S., Ammari, H. (2011). Standardisation de l'antibiogramme a l'échelle nationale (medecine humaine et veterinaire) : 25.

Rizk, A.M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia*, 52 (2) : 35-42.

Rock, E. (2003). Stress oxydant, micronutriments et santé. Inra – CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments 63122 St Genès Champanelle. Université d'été denutrition – Clermont- Fenand :37-42.

S

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (76): 270-276.

Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*.8 (3) :121-137.

Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* (91), 21-40.

Séverine. (2008).Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants.These pour l'obtention du Diplôme de Doctorat .Univercité de Toulouse : 58-60-62.

Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J. Food Microbiology*, (117): 112- 119.

Simon, C., Barathieu, K., Laguerre, M., Schmitter, J.M., Fouquet, E., Pianet, I. et Dufourc, E.J. (2003). Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochemistry* 42 (35),10385-10395.

Singab, A.N., Khalifa, T., Mahran, G.H., Okada, Y., Matsumaru, Y., Nishino, H., Okuyama, T. (1998). *Natural Medicines*, 1. 52 (2),: 191-194.

T

Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Kirimer, N., Baser, K.H.C., Bedir, E., Khan, I.A., Wedge, D.E. (2006) - Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography. A*,(1117) : 194–205.

Teuscher, E., Anton, R., Lobstein, A. (2005). *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments huiles essentielles*. Tec et Doc éditions, Paris.

Trease, E., Evans, W.C. (1987). *Pharmacognosiy*, 13th edition, Balliere Tindall, London: 61-62.

V

Vérité, P., Nacer, A., Kabouche, Z., Seguin, E. (2004). Composition of seeds and stems essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss. & Dur.) Shinz. *Flavour Fragr. J.* (19):562-564.

W

Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R.(2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.*, (105): 940-949.

 Y

Yu, R., Mandlekar, S., Tony, Kong, A.N. (2000). "Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c". *Molecular Pharmacology*, (58): 431- 437. EPHE.

 Z

Zhang, S.Y., Zheng, C.G., Yan, X.Y., Tian, W.X. (2008). Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (371): 654-658.

Zimmer, Z., Cordesse, R. Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Prod. Anim.* 1996, 9 (3): 167-79.

ANNEXES

Annexe 1 : Réactifs de caractérisation

Amidon

L'amidon est caractérisé par un réactif spécifique connu sous le nom d'amidon. Ce dernier a été préparé comme suit :

- Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium ;
- Chauffer pendant 5 minutes ;
- Diluer jusqu'à 500 ml.

La détection d'amidon s'effectue comme suit :

- Chauffer 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition ;
- Ajouter le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-violacée.

Alcaloïdes

La caractérisation des alcaloïdes se fait par :

- **Réactif de Mayer** : la préparation de ce réactif s'effectue comme suit :
 - Dissoudre 1,358 g de HgCl_2 dans 60 ml d'eau ;
 - Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau ;
 - Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité blanc

- **Réactif de Wagner** : ce réactif a été préparé comme suit :
 - Dissoudre 2 g de KI et 1,27 de I_2 dans 75 ml d'eau ;
 - Ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

Annexe 2: Comparaison en rendements de différents extraits de *P.chloranthus*.

Les extraits	Les solvants utilisés	Rendement %
Extrait brut	méthanol	8.45
	Eau distillée	10.07
Extrait sélectif des tannins	Acétone /eau	0.68

Annexe 3: *Calculs des teneurs en tannins condensées des différents extraits de P.chloranthus.*

Extraits bruts	Tannins (mg EC/g MS)
Extrait méthanolique	9.0146 ± 0.604
Extrait aqueux	1.6602 ± 0.106

Annexe 4: Résultats de piégeage de radical libre DPPH trouvés pour l'extrait sélectif des tannins de la partie aérienne de *P.chloranthus*.

Extrait étudié	Concentration [C] mg/ml	Densité Optique (valeur moyen) DO	Pourcentage d'inhibition % I
Extrait sélectif des tannins	4	0.1993	76.02 %
	2	0.3303	60.26 %
	1	0.4928	40.71 %
	0.5	0.6895	17.04 %
	0.25	0.7671	07.71 %
	0.125	0.7970	04.11 %

Annexe 5: Résultats de l'analyse FRAP trouvés pour l'extrait sélectif des tannins de la partie aérienne de *P.chloranthus*.

Extrait étudié	Concentration [C] mg/ml	Densité Optique DO moyen
Extrait sélectif des tannins	2	1.0423
	1	0.6768
	0.5	0.4328
	0.25	0.2398
	0.125	0.1209
	0.0625	0.0753

Annexe 6 : Composition de différents milieux utilisés**Pour un litre :****Mueller-Hinton**

Infusion de Viande de Bœuf.....	4
Peptone de Caséine	17,5 g
Amidon de Maïs.....	1,5 g
Agar.....	15g
Eau distillé	1000 ml
pH	7.4

Milieu Sabouraud (Liquide)

Peptone pepsique de viande	10g
Glucose.....	40g
pH=5.6 ± 0.2	

Milieu B. H. I. B

Protéose-peptone	10.0g
Infusion de cervelle de veau.....	12 ,5g
Infusion de cœur de bœuf.....	5g
Glucose.....	2g
Chlorure de sodium.....	5g
Hydrogénophosphate de sodium	2,5g.

Annexe 7: Lecture de l'antibiogramme d'*Escherichia coli*.

Antibiotique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	15	R
Gentamicine	24	S
Acide nalidixique	20	S
Oxacilline	6	R
Bacitracine	6	R
Spyramicine	13	R
Cefalexine	8	R
Colistine	15	S
Lincomycine	6	R
Cotrimoxazole	28	S
Doxycycline	10	R
Ampicilline	12	R
Neomicyne	24	S

Annexe 8: Lecture de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	20	I
Gentamicine	6	R
Acide nalidixique	6	R
Oxacilline	6	R
Bacitracine	6	R
Spyramicine	6	R
Cefalexine	6	R
Colistine	16	S
Lincomycine	6	R
Cotrimoxazole	6	R
Doxycycline	6	R
Ampicilline	6	R
Neomicyne	13	R

Annexe 9: Lecture de l'antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*.

Antibiotique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	10	R
Gentamicine	16	I
Acide nalidixique	12	R
Oxacilline	6	R
Bacitracine	6	R
Spyramicine	10	R
Cefalexine	6	R
Colistine	17	S
Lincomycine	6	R
Cotrimoxazole	21	S
Doxycycline	6	R
Ampicilline	6	R
Neomicyne	21	S

Annexe 10: Lecture de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

Antibiotique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	12	R
Gentamicine	30	S
Acide nalidixique	21	S
Oxacilline	6	R
Bacitracine	6	R
Spyramicine	13	R
Cefalexine	13	I
Colistine	17	S
Lincomycine	6	R
Cotrimoxazole	31	S
Doxycycline	11	R
Ampicilline	16	I
Neomicyne	27	S

Annexe 11: Lecture de l'antibiogramme de *Micrococcus luteus*..

Antibiotique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	18	I
Gentamicine	27	S
Ac nalidixique	6	R
Oxacilline	6	R
Bacitracine	6	R
Spyramicine	17	R
Cefalexine	11	R
Colistine	17	S
Lincomycine	6	R
Cotrimoxazole	33	S
Doxycycline	13	R
Ampicilline	16	I
Neomicyne	25	S

Annexe 12: Lecture de l'antibiogramme de *Listeria monocytogenes*.

Antibiotique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	6	R
Gentamicine	20	S
Ac nalidixique	6	R
Oxacilline	6	R
Bacitracine	6	R
Spyramicine	6	R
Cefalexine	6	R
Colistine	16	S
Lincomycine	6	R
Cotrimoxazole	6	R
Ampicilline	6	R
Neomicyne	11	R

Résumé

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes d'origine naturelle. Notre travail est l'étude phytochimique visant à caractériser les différentes familles des composés chimiques contenues dans la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*, puis l'extraction sélective de la classe des tannins.

Les tests phytochimiques nous ont permis de mettre en évidence les familles chimiques suivantes : les flavonoïdes, les tannins, les coumarines, stérols et triterpènes, hétérosides et les saponosides.

Les rendements obtenus des extraits aqueux et méthanoliques sont de l'ordre de 10.07 % et 8.45 % respectivement.

Les teneurs en tannins sont de l'ordre de $9,01 \pm 0,60$ mg EC/g MS et $1,66 \pm 0,10$ mg EC/g MS respectivement dans l'extrait méthanolique et aqueux.

L'extraction sélective des tannins nous a révélé un rendement de 0.68% dans la partie aérienne de *P.chloranthus*.

Les méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant nous ont révélés que : la capacité antioxydante totale montre une faible activité de l'ordre de 0.9538 ± 0.0995 mg EAA/g MS, le pouvoir réducteur utilisant la méthode de FRAP révèle une activité moyenne avec $EC_{50} = 0.82 \pm 0.191$ mg/ml, et que l'activité par le piégeage de radical libre DPPH donne une valeur d' $EC_{50} = 1.49 \pm 0.032$ mg/ml.

L'effet antimicrobien de l'extrait de tannins de *P.chloranthus* est signalé négatif à l'exception d'une faible activité inhibitrice remarquée vis-à-vis de la bactérie Gram positif *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 7mm.

Mosts clés : *Pituranthos chloranthus*, étude phytochimique, tannins, pouvoir antioxydant, effet antimicrobien, FRAP, DPPH et CAT.

Abstract

Most of the interest of current research relates to the study of antioxydant molecules of natural origin. Our work is the phytochimic study aiming at characterizing the various families of the chemical compounds contained in the air part of *Pituranthos chloranthus*, then the selective extraction of the class of tannins.

The tests phytochimic have allowed to us of meter in obviousness the following chemical families: flavonoïdes, tannins, coumarins, sterols and triterpènes, heterosides and saponosides.

The outputs obtained of the extracts aqueous and methanolic are about 10.07% and 8.45% respectively.

The contents tannins are about $9,01 \pm 0,60$ Mg EC/g MS and $1,66 \pm 0,10$ Mg EC/g MS respectively in the extract methanolic and aqueous.

The selective extraction of tannins revealed us an output of 0.68% in the air part of *P.chloranthus*.

The methods evaluation of the antioxydant capacity revealed us that: the total antioxydant capacity shows a weak activity of about 0.9538 ± 0.0995 mg EAA/g MS, the reduction using the method of FRAP reveals an average activity with $EC_{50} = 0.82 \pm 0.191$ mg/ml, and that the activity by the free trapping of radical DPPH gives a value of $EC_{50} = 1.49 \pm 0.032$ mg/ml.

The antimicrobic effect of the tannin extract of *P.chloranthus* is announced negative except for a weak inhibiting activity noticed with respect to the bacterium positive Gram *Staphylococcus aureus* with a diameter of inhibition of 7mm.

Key Mosts: *Pituranthos chloranthus*, phytochimic study, tannins, antioxydant capacity, antimicrobic effect, FRAP, DPPH and CAT.

الملخص

تركز الكثير من الاهتمامات البحثية الحالية على دراسة الجزيئات المضادة للأكسدة ذات الأصل الطبيعي. يهدف عملنا هذا إلى دراسة المركبات الكيميائية الواردة في الجزء الهوائي واستخلاص التاننا من *Pituranthos chloranthus*.

تسمح لنا التجارب الفيتوكيميائية من تحديد العائلات الكيميائية التالية: مركبات الفلافونويد، التاننا، الكومارين، تارين، تريبارين، جليكوزيدات و الصابونين.

كان مردود المحلول المائي و الميتانولي حوالي 10.07 بالمائة و 8.45 بالمائة على التوالي.

محتويات التاننا $9,01 \pm 0,60$ ملغ/غ و $1,66 \pm 0,10$ ملغ/غ على التوالي في مستخرجات الميتانول و المائي.

تحصلنا على مردود قدره 0,68 بالمائة من المستخلص النقي للتاننا. و قد اثبتت تجارب التقييم المضادة للأكسدة انخفاض النشاط من حوالي 0,0995 ملغ مع ما يعادل حمض الغاليك.

أظهرت لنا تجربة الفراب FRAP نشاط معتدل مع $EC_{50} = 0,82 \pm 0,191$ ملغ/غ، ونشاط الجذور الحرة DPPH أعطى قيمة EC_{50} قدرها $1,49 \pm 0,032$ ملغ/غ.

أما بالنسبة لدراسة التاننا كمضاد لنشاط البكتيريا فقد كانت سلبية ولم تؤثر على نشاط البكتيريا ماعدا بالنسبة مع *Staphylococcus aureus* أعطت قطر تثبيط قدره 7mm.

الكلمات المفتاحية: *Pituranthos chloranthus*، FRAP، DPPH، البكتيريا، التجارب الفيتوكيميائية.