

UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID-TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Science de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Présenté pour obtenir le grade

DE MASTER ACADEMIQUE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Option : Alimentation et Nutrition

Par

MELLOUK KHADIDJA

Soutenue le lundi 8 juillet 2013

Intitulé

**Étude des activités antioxydante et antimicrobienne des
flavonoïdes et des fractions flavoniques de la partie
aérienne de *Pituranthos chloranthus* (Guezze) de la
région de Biskra**

Jury

M ^{me} . BENDIMERAD N.	Professeur à l'Université de Tlemcen	Présidente
M ^{me} . ATIK BEKKARA F.	Professeur à l'Université de Tlemcen	Examinatrice
M ^{me} . BELYAGOUBI N.	Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen	Examinatrice
M ^r . BELYAGOUBI L.	Maître assistant à l'Université de Tlemcen	Encadreur

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à ALLAH tout puissant pour m'avoir donné la volonté, la patience et le courage nécessaire pour mener ce modeste travail à bout.

Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), du département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, de l'Université Abou BAKR BELKAID-TLEMCEM, sous la direction de Monsieur BELYAGOUBI Larbi.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur BELYAGOUBI Larbi., Maître Assistant A à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, pour avoir encadré et dirigé ce travail, tout au long de sa réalisation, pour ses précieux conseils et qu'il puisse voir en ce travail l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mme BENDIMERAD Nassima, Professeur à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, m'avoir fait honneur de présider ce jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme ATIK BEKKARA Fawzia, Professeur à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Que Madame BELYAGOUBI Née BENHAMMOU Nabila, Maître de Conférences B, à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, trouve ici l'expression de ma gratitude pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail.

Je ne saurai oublier de remercier les doctorants du laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), Département de Biologie, Université de Tlemcen, je cite ici : Mme GHEMBAZA N, Mr TOUL F, Mme ZITOUNI A et Melle BEDOU F. Pour leurs gentillesse et leurs aides dans la réalisation de ce modeste travail.

Résumé

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes d'origine naturelle.

L'étude de l'espèce *Pituranthos chloranthus* de la famille des Apiacées a porté sur un screening phytochimique visant à caractériser les différentes familles de composés chimiques contenus dans la partie aérienne. L'évaluation des pouvoirs antimicrobien et antioxydant des flavonoïdes et des fractions flavoniques a été aussi envisagée.

Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence les flavonoïdes, les tanins, les stérols et stéroïdes, les hétérosides stéroïdiques, les coumarines et les saponosides en faible teneur.

Les rendements obtenus des flavonoïdes et des fractions flavonique acétate d'éthyle et butanolique sont de l'ordre de 4.48, 3.21 et 1.39 %, respectivement. Alors, les rendements élevés sont égales à 10.07% pour l'extrait aqueux et 8.45 % pour l'extrait méthanolique.

Les teneurs en flavonoïdes et en flavonols sont élevées dans l'extrait méthanolique de 4.284 ± 0.004 mg EC/g MS et 2.586 ± 0.098 mg EQ/ g MS, respectivement comparativement à l'extrait aqueux où les teneurs sont de 1.656 ± 0.075 mg/ g pour les flavonoïdes et 0.633 ± 0.038 mg/ g pour les flavonols.

Les propriétés antioxydantes utilisant trois tests révèlent que la fraction butanolique possède la capacité antioxydante totale élevée de l'ordre de 2.907 ± 0.03 mg EAA/g MS. Cette fraction détient les meilleures activités à réduire le fer et à piéger le radical DPPH avec des concentrations à 50 % de 0.922 ± 0.008 et 2.730 ± 0.164 mg/ml, respectivement par rapport aux flavonoïdes et à la fraction acétate d'éthyle.

Les flavonoïdes présentent une sélectivité d'activité antimicrobienne élevée vis-à-vis les deux souches Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Microcoques luteus* avec des diamètres des zones d'inhibition de 8 mm et 7mm respectivement.

Mots clés : *Pituranthos chloranthus* ; Etude phytochimique ; Flavonoïdes ; Activité antioxydante ; CAT ; FRAP ; DPPH ; Activité antibactérienne.

Abstract

Much of the current research interest focuses on the study of antioxidant molecules of natural origin.

The study of the species *Pituranthos chloranthus* the Apiaceae family was on a phytochemical screening to characterize different families of chemical compounds in the aerial part.

Evaluation of antimicrobial and antioxidant power of flavonoids and flavonoid fractions was also considered.

Phytochemical tests helped highlight flavonoids, tannins, sterols and steroids, steroidal glycosides, coumarins and saponins in low.

The yields of flavonoids and flavonic ethyl acetate and butanol fractions are of the order of 4.48, 3.21 and 1.39%, respectively. So the yields are equal to 10.07% for the aqueous extracts and 8.45% for the methanol extract.

The contents of flavonoids and flavonols are higher in the methanol extract of 4.284 ± 0.004 mg EC / g DM and 2586 ± 0098 mg EQ / g DM, respectively compared to the aqueous extract where the contents are 1.656 ± 0.075 mg / g flavonoids and 0.633 ± 0.038 mg / g for flavonols.

The antioxidant properties using three tests reveal that the butanol fraction has the highest total antioxidant capacity in the range of 0.03 ± 2.907 mg EAA / g DM. This fraction has the best activities to reduce the iron and trap the DPPH radical with concentrations of 50% 0.922 ± 0.008 and $2.730 \pm \pm 0.164$ mg / ml, respectively, compared to the flavonoids and the ethyl acetate fraction.

Flavonoids exhibit high antimicrobial activity selectivity vis-à-vis the stem deus Gram positive *Staphylococcus aureus* and *Micrococci luteus* with diameters of inhibition zones of 8 mm and 7 mm respectively.

Keywords: *Pituranthos chloranthus*; phytochemical study, flavonoids, antioxidant activity, CAT, FRAP, DPPH, antibacterial activity.

المخلص

جزء كبير من البحوث المهمة حاليا تعمل على دراسة الجزيئات الطبيعية المضادة للأكسدة. يندرج هذا البحث ضمن دراسة نبتة القزاح (*Pituranthos chloranthus*) التي تنتمي الى العائلة الكرفسية حيث تمعلى الفحص الكيميائي النباتي لتحديد العائلات المختلفة من المركبات الكيميائية في سيقانها واعتبر أيضا تقييم القوة المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة لمختلف المحاليل الفلافونية. ساعدت الاختبارات النباتية تسليط الضوء على مركبات الفلافونويد والتانان، الستيرول،الستيروويد،الايبيروزيديات، الكومارين والصابونوزيد باقل كمية.

تم تسجيل كل من الفلافونويد واسيتات الإيثيل وبيتانول هي من أجل من 4.48، 3.21 و 1.39٪، على التوالي . وبالتالي فإن مردود المستخلص مائي هو 10.07٪ و 8.45٪ لمستخلص الميثانول. محتويات مركبات الفلافونويد ومركبات الفلافونول هي أعلى في لمستخلص الميثانول 4.284 ± 0.004 مغ مع معادل الكاتشين/غ من المادة الجافة، 2.568 ± 0.098 مغ مع معادل الكارستين/غ من المادة الجافة على التوالي مقارنة مع المستخلص المائي حيث محتويات هي 1.656 ± 0.075 مغ مع معادل الكاتشين/غ فلافونيدات و 0.633 ± 0.038 مغ مع معادل الكارستين/غ.

تمت دراسة الخصائص المضادة للأكسدة باستخدام ثلاث اختبارات كشفت عن أن جزء بيوتانول لديه أعلى قدرة الكلية المضادة للأكسدة 2.907 ± 0.03 مغ مع معادل حمض الاسيتيك /غ من المادة الجافة. كما ان هذا الاخير له اكبر قدرة على ارجاع الحديد و تثبيط الجذر الحر DPPH لتركيز 50% بقيمة تقدر ب 0.922 ± 0.008 و 2.730 ± 0.164 مغ/ملل بالترتيب مقارنة مع المستخلص الفلافونويدي و مستخلص الاسيتات .

اثبت مستخلص الفلافونويد قدرة مضادة للميكروبات اتجاه كل من البكتيريتين غرام إيجابي *Staphylococcus aureus* و *Microcoques luteus* مع أقطار مناطق التنشيط من 8 ملم و 7 ملم على التوالي.

الكلمات المفتاحية: القزاح *Pituranthos chloranthus* ، مضادات الاكسدة ، DPPH ، FRAP ، CAT ، الفلافونيدات، مضادات البكتيريا .

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C: Degré Celsius

µl: Microlitre

CAT : capacité antioxydante totale.

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde

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

EC : Equivalent de catéchine

FAcOEt : Fraction acétate d'éthyle

F1-buOH : Fraction butanolique

Fe : Fer

Fe²⁺ : Ions ferreux

Fe³⁺ : Ions ferriques

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

g: Gramme

GAE : Equivalent d'acide gallique

h: Heure

HE : Huile Essentielle

IC₅₀ : Concentration permettant d'inhiber 50 % du radical DPPH

l: Litre

mg : Milligramme

ml: Millilitre

nm : Nanomètre

PM : poids moléculaire.

UV/VIS: Radiation ultraviolette/ Visible

v: Volume

Liste des tableaux

Tableau 01: Les principales classes de composés phénoliques	8
Tableau 2 : Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe	11
Tableau 03: Situation géographique et bioclimatique de la station d'étude.....	15
Tableau 04 : Souches utilisées dans les différents tests antimicrobiens	26
Tableau 05 : Liste des antibiogrammes testés sur les bactéries et la levure.....	27
Tableau 06: Les extraits et leurs concentrations	29
Tableau 07 : Résultats des tests phytochimiques sur la partie aérienne de <i>P. chloranthus</i>	31
Tableau 09 : Rendement (%) en extrait bruts de <i>P. chloranthus</i>	32
Tableau 09 : Teneur en flavonoïdes et en flavonols dans les extraits bruts de <i>P. chloranthus</i>	34
Tableau 10 : Valeurs des concentrations EC ₅₀ des flavonoïdes et des fractions flavoniques de <i>P. chloranthus</i> obtenues par le test de la réduction du fer.....	37
Tableau 11 : Valeurs des concentrations EC ₅₀ des flavonoïdes et des fractions flavoniques de <i>P. chloranthus</i> obtenues par le test du DPPH.....	40
Tableau 12 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	42
Tableau 13 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13047	44
Tableau 14 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 2785	46
Tableau 15 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>S. aureus</i> ATCC 6538 ..	48
Tableau 15 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>M. luteus</i> ATCC 13047	50
Tableau 16 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	52

Liste des figures

Figure 01 : Structure de base d'un flavonoïde	09
Figure 02 : Biosynthèse des flavonoïdes	10
Figure 03 : Carte géographique de la région de récolte.....	16
Figure 04 : Protocole d'extraction des fractions flavoniques	23
Figure 05 : Méthode de Lesueur et al (2007)	30
Figure 06 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes	33
Figure 07 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonols.....	33
Figure 08 : Comparaison de la capacité antioxydante totale des flavonoïdes et les fractions flavoniques de <i>P. chloranthus</i>	35
Figure 09 : Pouvoir réducteur des flavonoïdes et des fractions flavoniques (acétate d'éthyle et butanolique) par le test du FRAP	36
Figure 10 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH [•]	38
Figure 11 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH [•] en fonction des concentrations des flavonoïdes et les fractions flavoniques de la partie aérienne de <i>P.chloranthus</i>	39
Figure 12 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	41
Figure 13 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13047.....	43
Figure 14 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	46
Figure 15 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	47
Figure 16 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>M. luteus</i> ATCC 13047.....	49

Figure 17 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	51
Figure 18 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des différentes fractions	53
Figure 19 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition de la levure <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 en fonction des extraits	54

Liste des photos

Photo 01 : <i>Pituranthos chloranthus</i> (Coss et Dur).....	4
Photo 02 : Antibiogramme d' <i>E. coli</i> ATCC8739.....	42
Photo 03 : Antibiogramme de <i>S. aureus</i> ATCC 6538	48
Photo 04 : Antibiogramme de <i>M. luteus</i> ATCC 13047	50

Table des matières

Remerciements

Résumé

Liste d'abréviation

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Présentation de Pituranthos chloranthus

1. Description botanique	3
2. Position systématique.....	3
3. Usages traditionnels	3
4. Travaux antérieurs sur le genre <i>Pituranthos</i>	4

Chapitre II : Les composées phénoliques

1. Généralités	7
2. Les composées phénoliques.....	7
3. Les flavonoïdes	8
3.1. Définition	8
3.2. La biosynthèse des flavonoïdes	9
3.3. Classification des flavonoïdes	11
3.4. Intérêts thérapeutique des flavonoïdes.....	12

Chapitre III : Les radicaux libres et les antioxydants

1. Les radicaux libres.....	13
2. Conséquences de la production des ERO sur l'organisme	13
3. Systèmes de défense	13
3.1. Les antioxydants endogènes.....	14
3.2. Les antioxydants exogènes	14

4. Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	14
--	----

Partie II : Matérielles et méthodes

Chapitre I : Matériel végétal

1. Origine géographique et période de récolte des plantes	15
2. Identification de la plante	15
3. Station d'étude	15
4. Conservation des échantillons	15

Chapitre II : Test phytochimique

1. Introduction	17
2. Tests phytochimiques.....	17
2.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaude	17
2.1.1. Détection d'amidon	17
2.1.2. Détection des Saponosides.....	17
2.1.3. Détection des tannins.....	18
2.2. Epuisement du matériel végétal avec du l'éthanol	18
2.2.1. Détection des flavonoïdes	18
2.2.2. Détection des tannins galliques et cathéchine	18
2.2.3. Détection des composés réducteurs	18
2.3. Macération du matériel végétal avec l'acide sulfurique (H ₂ SO ₄).....	19
2.3.1. Détection des alcaloïdes.....	19
2.4. Détection des coumarines.....	19
2.5. Détection des stérols et triterpènes	19

Chapitre III : Dosage des flavonoïdes et des flavonols

1. Extraction de l'extrait brut méthanolique et aqueux.....	21
2. Dosage des flavonoïdes.....	21
3. Dosage des flavonols	22
4. extraction des flavonoïdes.....	22

Chapitre IV : Etude du pouvoir antioxydant et antimicrobien

1. Etude du pouvoir antioxydants	24
1.1. Activité antioxydante totale (CAT)	24
1.2. Réduction du fer (FRAP : <i>Ferric reducing antioxidant power</i>)	24
1.3. Piégeage du radical DPPH par les extraits de <i>P.chloranthus</i>	25
2. Etude du pouvoir antimicrobien	25
2.1. Les souches testées	25
2.2. Conservation des souches	26
2.3. Les milieux de culture utilisés	26
2.4. Les techniques microbiologiques	26
2.4.1. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et antifongiques	26
2.4.2. Choix des antibiogrammes	26
2.4.3. Préparation de l'inoculum	27
2.4.4. Ensemencement	28
2.4.5. Application des disques d'antibiogramme	28
2.4.6. Incubation	28
2.4.7. Lecture	28
2.4.8. Préparation de l'extrait	28
2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des différentes fractions flavoniques	29
2.5.1. Méthode de diffusion sur agar (méthode des disques)	29
3. Analyse statistique	30

Partie III : Résultat et Discussion

Test phytochimique	31
Extraction et dosage des flavonoïdes et flavonols	32
2.1. Rendement en extrait et fraction sec	32
II.2-Teneur des extraits bruts en flavonoïdes et flavonols	32
Etude de l'activité antioxydante	34
3.1. La capacité antioxydante totale(CAT)	34
3.2. Réduction du fer : FRAP	35
3.3- Piégeage du radicale libre DPPH : 2,2 diphenyl-1- picrylhudrazyl	37
Activité antimicrobienne.....	41
4.1. Pouvoir antimicrobienne des antibiotiques	41
4.2. Pouvoir antifongique.....	52
4.3. Résultats de la méthode de disques.....	52
Conclusion générale.....	55
Références bibliographiques	57

Annexes

INTRODUCTION

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base: nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité (**Gurib-Fakim, 2006**).

Bien qu'une grande partie du XXème siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs de sources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (**Gurib-Fakim, 2006**).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires (**Bahorun, 1997**).

En Algérie, l'industrie pharmaceutique, mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années (**Djebaili, 1984, Bouattoura, 1988, Maizak et al, 1993**).

L'intérêt des antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement ces dernières années. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agro-alimentaires (**Sanchez-Moreno, 2002 ; Marc et al., 2004 ; Huang et al., 2005**). Parmi ces composés, 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**).

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 (Bendimerad *et al.*, 2007 ; Atik Bekkara *et al.*, 2008 ; Benhammou *et al.*, 2008 ; Belarbi *et al.*, 2009 ; Bekhechi *et al.*, 2012).

C'est pourquoi nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique de la plante *Pituranthos chloranthus* et évaluer les activités antioxydante et antimicrobienne de leurs extraits.

Notre travail a été divisé en trois parties :

- **La première partie** concernant l'étude bibliographique, comprend l'étude botanique de l'espèce *Pituranthos chloranthus* en premier chapitre, les généralités sur les composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes en deuxième chapitre et en troisième chapitre, nous décrivons les radicaux libres et les antioxydants.
- **La deuxième partie** reporte la description du protocole expérimental en cinq étapes en exposant les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail :
 - ✓ Les tests phytochimiques pour la mise en évidence des familles des composés phénoliques, des saponosides, des alcaloïdes, des stérols et stéroïdes, l'amidon et les composés réducteurs ;
 - ✓ Dosage des flavonoïdes et des flavonols dans l'extrait brut méthanolique et aqueux ;
 - ✓ L'extraction des flavonoïdes et des fractions flavoniques (acétate d'éthyle et butanolique) ;
 - ✓ L'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits cités en utilisant trois méthodes : la capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer (FRAP) et le piégeage du radical DPPH ;
 - ✓ L'étude du pouvoir antimicrobien des flavonoïdes et ses fractions flavoniques en testant sept (7) souches microbiennes: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* ; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonias* et la levure *Candida albicans*.
- **Dans la troisième partie**, nous interprétons et discutons les résultats obtenus.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Présentation de l'espèce *Pituranthos chloranthus*

1- Description botanique

Pituranthos chloranthus appartient à la famille des Ombellifères sahariennes qui diffèrent les unes des autres et leur détermination n'offre pas de grandes difficultés. Exclusivement, la distinction entre les espèces de *Pituranthos* est souvent difficile (**Ozenda, 1958**).

En effet, elles ne se distinguent les unes des autres que par la couleur des fleurs et la taille de leur pédoncule (**Haba, 2002**).

Le genre *Pituranthos* possède plus de vingt espèces, dont certaines sont spécifiques à l'Afrique du nord (**Quezel et Sanata, 1963; Kaabeche, 1990**) et sont souvent rencontrées dans les régions arides ou désertiques.

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

- *Pituranthos chloranthus*, l'objet de notre travail, espèce particulièrement moins présente.
- *Pituranthos scoparius*, espèce abondante dans les Aurès.
- *Pituranthos battandieri* (Mair): endémique au Sahara marocain et l'oranie (**Bellakhdar, 1997**).

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

L'espèce *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Houk, selon Ozenda 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 (**Ozenda, 1958**).



Photo 01 : *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur)

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

2- Position systématique de *Pituranthos chloranthus* :

L'espèce *P. chloranthus* est classée d'après **Quezel et santa (1963)** et **Dupon et Guignard (2007)** comme suit :

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiosperme

Classe : Eudicot

S/classe: Euastéridées II

Famille: Apiacées

Ordre : Apiale.

Genre : *Pituranthos*

Espèce : *Pituranthos chloranthus* (Coss et Dur) Benth et Houk)

3- Usages traditionnels

L'espèce *P. chloranthus* est appelée localement Guezzeh, d'après **Gattefossé (1937)**. Elle est employée en cataplasmes sur la tête et contre les céphalées (**Bellakhdar, 1997**).

Les huiles obtenues des tiges et des graines du *P. scoparius* sont largement utilisées comme remède contre le rhumatisme et la fièvre (**Al kadi, 1989**).

Les espèces *triradiatus* et *tartuosus*, sont utilisées par la population bédouine contre les douleurs d'estomac, les parasites intestinaux ou comme agent régulateur de la menstruation chez les femmes (Novak *et al.*, 1966).

4 -Travaux antérieures

Une recherche bibliographique exhaustive faite sur les espèces du genre *Pituranthos*, nous a permis de constater que ces plantes sont peu étudiées.

D'après Singab *et al* (1998), quatre composés flavoniques : isorhamnétine, chrysoériol, isorhamnétine3-O-glucoside et isorhamnétine3-O-rutinoside avec un nouveau flavonoïde glucoside, le glucopyranosyloxy-3 trihydroxy-4',5,7 méthoxy-3' flavone, 2''-O-β-D-apiofuranosyl 6''-O-α-L-rhamnopyranosyl ont été isolés et identifiés dans l'espèce *Pituranthos tortuosus*.

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle extraite à partir de *P. tortuosus* a révélé la présence de 17 composés monoterpéniques, 3 composés sesquiterpéniques et 10 composés monoterpéniques oxygénés (Abdelwahed *et al.*, 2006).

Pour l'espèce *P. triradiatus*, un nouveau monoterpénoïde coumarinique, le (-)-S-trans-marmine et pituranthoside(-)-s-trans-marmine-7'-O-β-D-glucopyranoside a été identifié dans les jeunes pousses de cette plante (Halim *et al.*, 1995).

Les travaux réalisés par Haba *et al* (2004) sur les racines de l'espèce *P. scoparius* ont permis d'isoler deux nouveaux composés isocoumariniques : hydroxy-6 méthoxy-5 propyl-3 isocoumarine et diméthoxy-5,7 hydroxy-6 propyl-3 isocoumarine. Par contre, l'étude chimique des huiles essentielles obtenues à partir des graines et des tiges a mis en évidence la présence de l'α-pinène, l'apiol, le bornyl-acétate, monoterpènes, les dérivés phénoliques et les sesquiterpènes (Vernin *et al.*, 1999 ;Vérité,2004)

A propos de l'espèce *P. chloranthus*, Touil *et al* (2006) ont pu isoler quatre flavonoïdes glucosidiques dans les parties aériennes de cette espèce collectée dans la région d'El Hoggar.

Les travaux de Bouaziz *et al* (2009) sur les activités biologiques (antioxydantes et antimicrobiennes) des quatre extraits (méthanolique, aqueux, acétate d'éthyle et l'hexane) sur la partie aérienne de *P.chloranthus*.

Hammiche et Maiza (2006) ont été montrés l'activité de *P. chloranthus* contre la fièvre, Rhumatisme et diabète.

Chapitre II : Les composés phénoliques et les flavonoïdes

1- Généralités

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées (**Macheix et al., 2005**).

En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéines et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Herbert, 1989**).

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques, etc. (**Macheix et al., 2005**).

2- Les composés phénoliques (les polyphénols)

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (**Gee et Johnson, 2001**). Ils forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels qui sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (**Dacosta, 2003**).

Ces classes se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, ...etc.) (**Herbert, 1989; Macheix et al., 2005**).

Tableau 01: Les principales classes de composés phénoliques (**Harborne, 1980; Macheix et al., 1990**).

Squelette carboné	Classe	Exemple	origine
C_6	Phénols simples	Catéchol	
$C_6 - C_1$	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
$C_6 - C_3$	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique Scopolétine, esculétine	Citrus Citrus
$C_6 - C_4$	Naphtoquinones	Juglone	Noix
$C_6 - C_2 - C_6$	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Déidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleure, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
$(C_6 - C_3)_2$	Lingnanes	Pinorésinol	Pin
$(C_6 - C_3)_n$	Lignines		Bois, noyau des fruits
$(C_{15})_n$	Tannins		Raisin rouge, Kaki

Dans cette étude, nous décrivons la classe des flavonoïdes car elle représente plus que la moitié des composés phénoliques.

3- Les flavonoïdes

3.1- Définition

Le terme « flavonoïde » est dû à leur couleur jaune (= flavus en latin) qu'ils engendrent. D'ailleurs, leurs fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration ; au delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaines (**Wilson, 1987**). Les flavonoïdes sont présents dans différentes parties des végétaux supérieurs selon le type de l'espèce: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois...etc. Aussi, ils varient quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal (**Fritch et Griesbach, 1975**). Certains sont plus spécifiques de certains tissus. Exemple : les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales de fleurs.

Les flavonoïdes possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques ; deux cycles en C6 (A et B), reliés par un hétérocycle en C3 (**Figure 01**) (**Heller et Forkmann, 1993**)

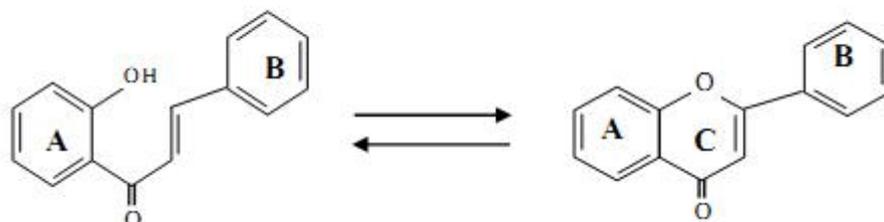


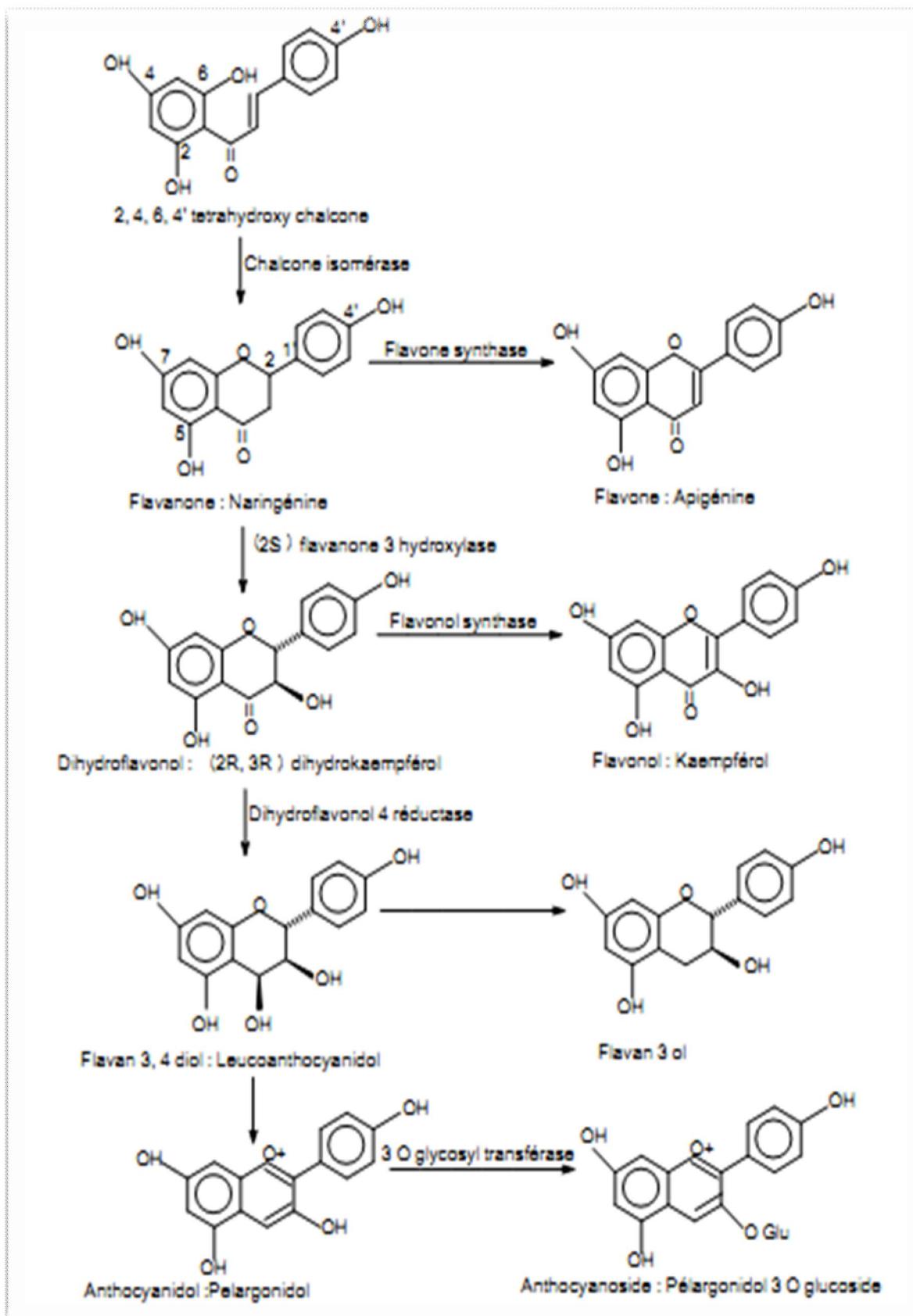
Figure 01 : Structure de base d'un flavonoïde (**Heller et Forkmann., 1993**).

3.2- Biosynthèse des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons. Certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles (**Elicoh-Middleton, 2000**).

Le chalcone représente le précurseur commun de tous les autres flavonoïdes. Il est métabolisé sous l'action de la chalcone isomérase en flavanone : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)- flavanone 3-hydroxylase pour donner les flavones : apigénine, dihydroflavonol et (2R-3R) dihydrokaempférol respectivement (**Remesy et al., 1996**).

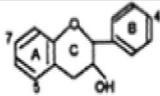
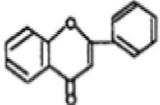
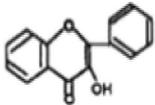
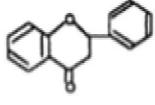
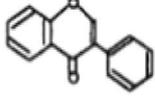
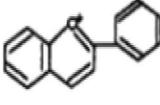
Les deux enzymes citées fonctionnent différemment : la première introduit la double liaison entre les carbones 2 et 3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du C3. Le dihydroflavonol en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol, kaempférol ou en flavan-3,4-diol et leucoanthocyanidol respectivement (**Ono et al., 2006 ; Seeram et al., 2006**).

Figure 02 : Biosynthèse des flavonoïdes (Remesy *et al.*, 1996)

3.3- Classification des flavonoïdes

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (**Pietta, 2000**), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés : flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (**Heim et al., 2002 ; Hendrich, 2006**).

Tableau 2 : Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe (**Heim et al., 2002**).

Classe	structure générale	flavonoïdes typiques	Substituants
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoses 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7'-glucose
Flavonol		kaempferol quercetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH
		myricetin tamarixetin	3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe
Flavanone (dihydroflavon)		naringin naringenin taxifolin eriodietylol hesperidin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoses
Isoflavone		genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

3.4 - Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes

Des expériences menées sur des souris ont montré que la quercétine et la quercétrine avaient une activité antidiarrhéique très importante (**Galvez *et al.*, 1993a ; Galvez *et al.*, 1993b**). Aussi d'autres flavonoïdes, comme l'apigénine, ont été décrits comme des composés bactéricides et bactériostatiques très efficaces (**Basile *et al.*, 1999 ; Cushnie *et al.*, 2003 ; Martini *et al.* 2004**). De même les flavonoïdes ont déjà été utilisés pour le traitement des cataractes d'origine diabétique (**Goodarzi *et al.*, 2006 ; Ouali *et al.*, 2007**).

D'autres propriétés thérapeutiques sont attribuées aux flavonoïdes notamment l'activité antioxydante. En effet, les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique (**Laughton *et al.*, 1989 ; Puppo, 1992**). De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que le cuivre et le fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (**Puppo, 1992 ; Van Acker *et al.*, 1995**). Ils sont aussi de puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (**Laughton *et al.*, 1989 ; De Whalley *et al.*, 1990**).

Chapitre III : Les radicaux libres et les antioxydants

1- Les radicaux libres

Un **radical libre** est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (ERO) (**Gutteridge, 1993**).

2- Conséquences de la production des ERO sur l'organisme

Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces espèces (**Gutteridge, 1993**). Ce déséquilibre est à l'origine de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons, l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac et l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (**Favier, 2003**).

En raison de leur capacité à endommager les cellules, les tissus et les organes, les ERO sont impliquées dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (**Gutteridge, 1993**). Parmi les, nous citons, les maladie d'Alzheimer (**Smith et al., 1996 ; Smith et al., 2004**), de Parkinson (**Boltn et al., 2000**), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (**Jha et al., 1995**), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (**Georgetti et al., 2003**) et le cancer (**Ali et al., 2008**).

3- Systèmes de défense

Des systèmes de défense permettent de prévenir la formation radicalaire ou de limiter les lésions d'oxydation résultantes. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle.

3.1- Les antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborées par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (**Mika et al., 2004**).

3.2- Les antioxydants exogènes :

Ils sont présents dans l'alimentation telle que les vitamines A, C, E et les polyphénols en particulier les flavonoïdes, ainsi que les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes antioxydants endogènes comme le sélénium, le zinc et le manganèse. Ces antioxydants nutritionnels sont indispensables mais leur action est limitée jusqu'à ce qu'ils soient régénérés.

4- Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* :

D'après **Sanchez-Moreno (2002)** et **Huang et al (2005)**, les techniques d'évaluation des propriétés antioxydantes peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron.

Les tests du premier groupe sont employés pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (**Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998**).

Alors, les tests du deuxième groupe sont ceux qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Ils comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hypochloreux ($HOCl$), de l'hydroxyle (OH^\bullet), des anions superoxyde ($O^{\bullet-2}$), du peroxyde (ROO^\bullet) et de l'oxyde nitrique (NO^\bullet) (**Sanchez-Moreno, 2002**).

**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 (03) et la figure 03.

Tableau 03: 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 bien conservé pour des utilisations ultérieures.

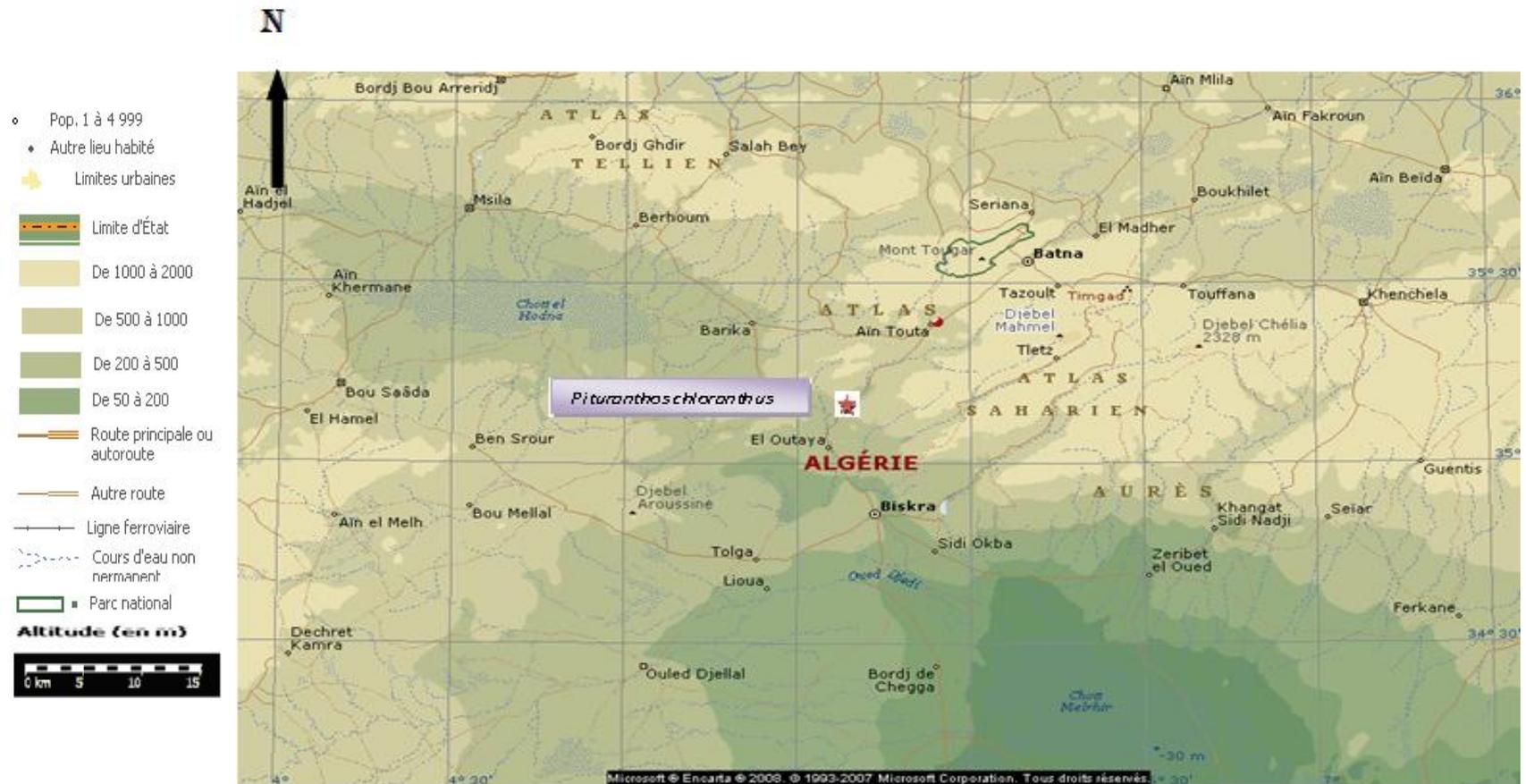


Figure 03 : Carte géographique de la région de récolte (Encarta 2008).

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 H_2SO_4 ;

2.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau 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 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 (Paris et al, 1969).

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 flavonoïdes et des flavonols

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.

➤ 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.

2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est déterminée en utilisant la technique de **Zhishen et al (1999)**. Une quantité de 500 µl de solution méthanolique de catéchine à différentes concentration ou de l'extrait brut (méthanolique, aqueux ou mélange méthanol/eau) convenablement diluée est ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % (m/v) est ajouté. Après l'incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionnée. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu.

L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EC/ g MS).

3. Dosage des flavonols

Le contenu des flavonols a été déterminé par la méthode décrite par **Kumaran et al (2007)**. Une quantité de 0.25 ml d'extraits a été mélangée à 0.25 ml d' AlCl_3 (2 mg/ ml) et à 1.5 ml d'acétate de sodium (50 mg/ ml). L'absorbance à 440 nm a été enregistrée après 2.5 h. La teneur en flavonols a été exprimée en milligramme (mg) équivalents de quercétine par gramme du poids de la matière sèche (mg QE/g MS). Les expériences ont été répétées deux fois.

4. Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes est réalisée à partir de deux méthodes :

a) Méthode de Lee et al (1995) pour l'extrait des flavonoïdes

Une quantité de 5 g de la poudre de *P. chloranthus* a été chauffée à 90°C sous reflux dans un mélange eau distillée/ éthanol absolu (50/50) pendant 4 h puis l'extrait a été filtré. La phase aqueuse a été ensuite extraite par 100 ml de n-butanol puis acidifier par le HCl à 10% au pH 3. La phase butanolique a été évaporée à sec sous pression réduite par le rotavapor à 40°C. Le résidu sec a été extrait 3 fois par 100 ml du mélange eau distillé/acétate d'éthyle (50/50) pendant 1 h. La phase organique a été basifiée par le NaHCO_3 au pH 9. Après 15 min de repos, la phase organique (flavonoïdes) a été évaporée à sec à 40°C. Le résidu sec obtenu pesé est repris par quelques ml du méthanol.

b) Méthode de Bekkara et al (1998) pour les fractions flavoniques (acétate d'éthyle et butanolique)

Le diagramme suivant décrit la méthode d'extraction des deux fractions des flavonoïdes : d'acétate d'éthyle et butanolique:

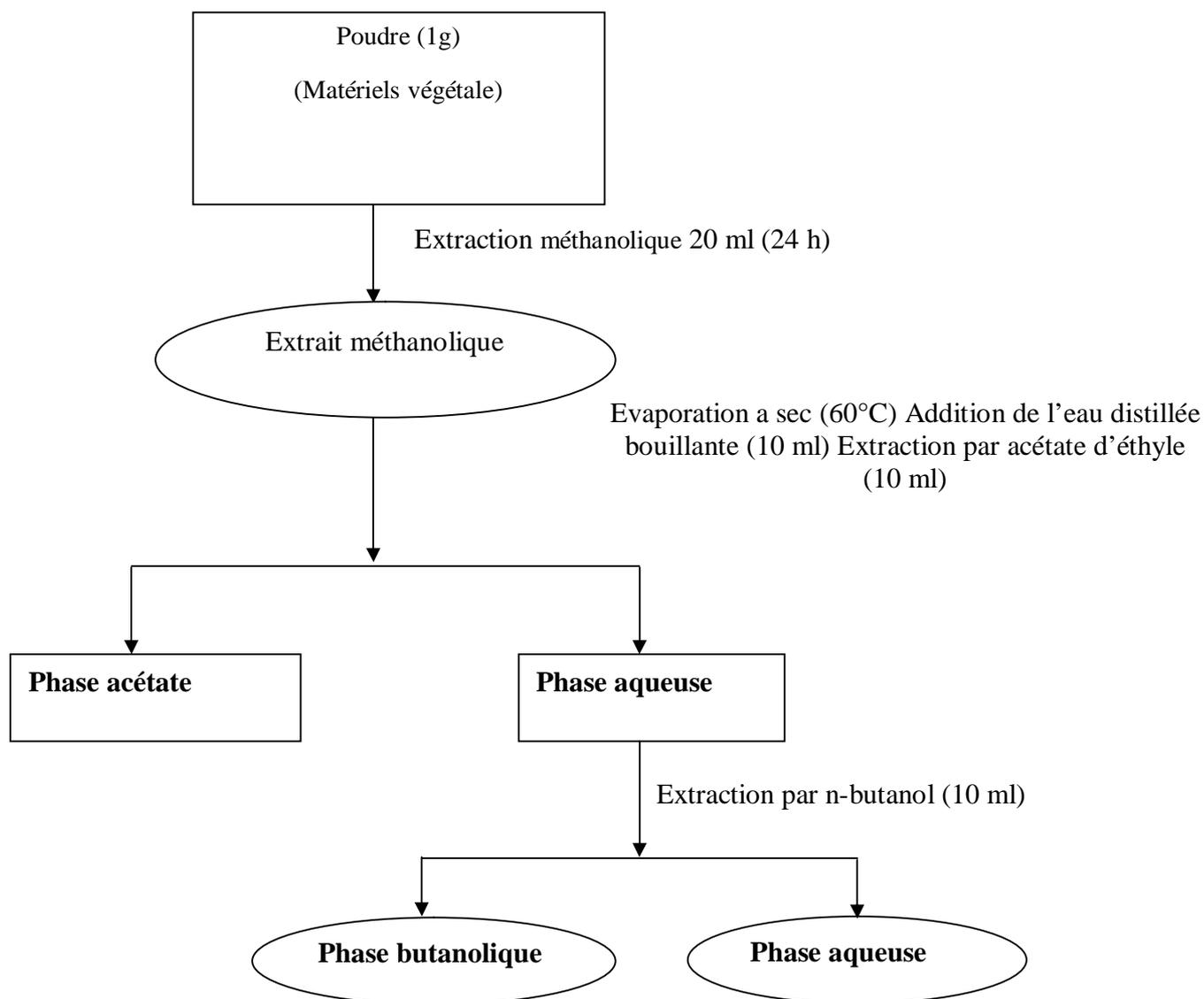


Figure 04 : Protocole d'extraction des fractions flavoniques (**Bekkara et al., 1998**)

Chapitre IV : Etude des pouvoirs antioxydant et antimicrobien

1. Etude du pouvoir antioxydant

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des flavonoïdes (fractions aqueuse et méthanolique) et des fractions flavoniques (acétate d'éthyle et butanolique) 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) 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 .

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait 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 des extraits 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 de chaque extrait 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 des extraits 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 exprimées en 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 (efficace 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 des flavonoides et les fractions flavoniques acétate d'éthyle et butanolique 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 05 :

Tableau 04 : 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 utilisé comme milieux de culture :

- 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

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

2.4.2. Choix des antibiogrammes

Nous avons utilisé 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 05 : Liste des antibiogrammes testés sur les bactéries et la levure.

Antibiogrammes	Code	Charge
Amoxicilline + Acide clavulanique	AMP	20-10 µg
Gentamicine	GEN	10 µg
Acide nalidixique	NAL	30 µg
Oxacilline	OXA	1 µg
Bacitracine	B	10 UI
Spiramicine	SPI	10 µg
Cefalexine	LEX	30 µg
Colistine	COL	50 µg
Lincomycine	L	15 µg
Cotrimoxazole	SXT	25 µg
Doxycycline	DOX	30 µg
Ampicilline	AMP	10 µg
Neomicyne	NEO	30 UI
Nystatine	-	30 µg

2.4.3. Préparation de l'inoculum

Pour la fixation de l'inoculum de départ, nous avons employé une méthode photométrique (Atwal, 2003).

- ✓ A partir d'une préculture d'environ 20 h sur bouillon Mueller Hinton pour les bactéries et 48 h sur bouillon Sabouraud pour la levure, préparer une suspension bactérienne et l'homogénéiser, la densité optique doit être de 0.08 à 0.1 mesuré à 625 nm (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.

2.4.4. 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 de gélosé 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**).

2.4.5. 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**).

2.4.6. Incubation

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

2.4.7. 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.

2.4.8. Préparation de l'extrait

Après l'extraction sélective des flavonoïdes et les fractions flavoniques (**Figure 05**), les extraits secs sont récupérés dans le DMSO pour obtenir des concentrations mentionnées dans le tableau 07.

Tableau 06: Les extraits et leurs concentrations.

Extraits	Acétate d'éthyle	n-butanolique	Flavonoïdes
Concentration (mg/ml)	200	300	200

2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes et les fractions flavoniques

La méthode de diffusion 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 et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans cette technique, il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (**Broadsky et al., 1976**).

2.5.1. Méthode de diffusion sur agar (méthode des disques)

L'activité antimicrobienne a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion sur agar (**Lesueur et al., 2007; Boulekbache-Makhlouf et al., 2012**).

Dans des boîtes de Pétris stériles préalablement coulées par des milieux (Müller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure), un volume de 0.1 ml contient 10^7 cellule/ml des microorganismes a été déposé sur la surface des géloses à l'aide d'un écouvillon stérile. Puis, des disques de papier filtre stérile de 6 mm de diamètre, imprégnés de 10 μ l des différents extraits flavoniques ont été déposés stérilement sur la surface des milieux, préalablementensemencée. Après l'incubation de 24 h à $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition.

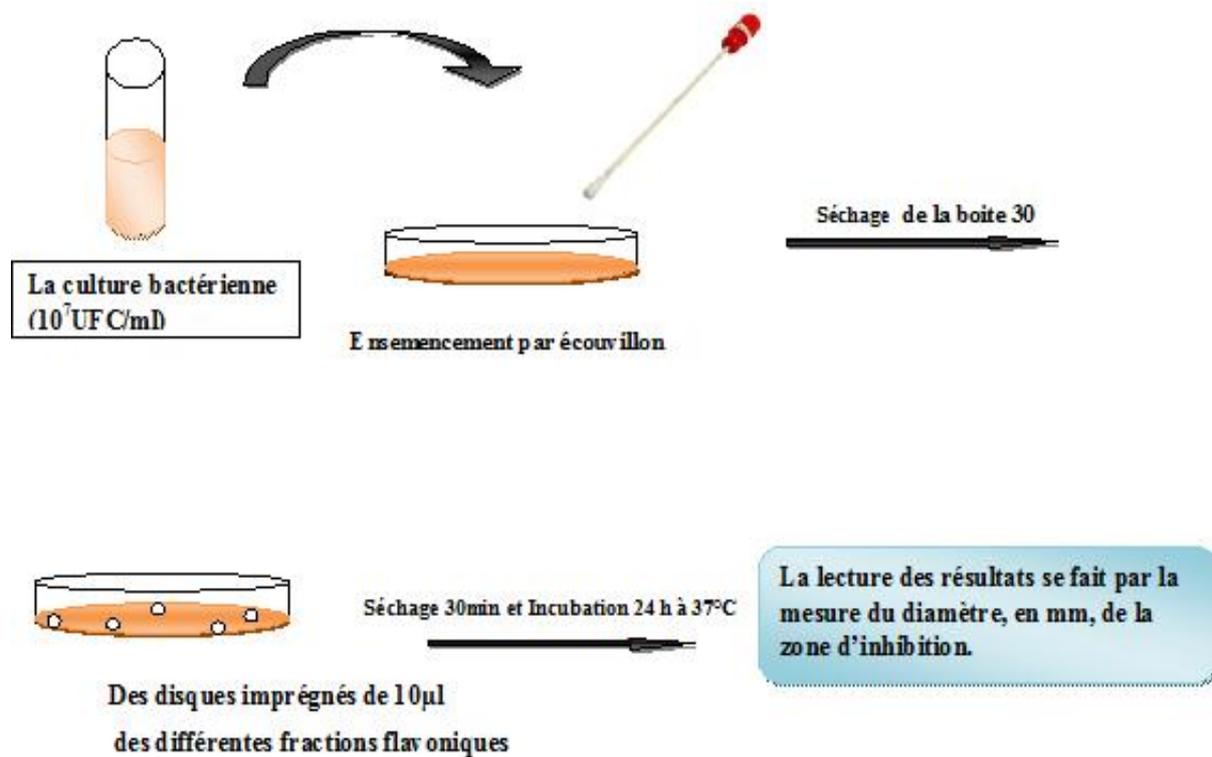


Figure 05 : Méthode de Lesueur et al (2007).

3. Analyse statistique

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. Concernant le pouvoir antimicrobien, toutes les expériences ont été répétées en triple.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1- Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par les réactions qualitatives de caractérisation.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur la partie aérienne de plante étudiée *P. chloranthus* épuisés par l'eau, l'éthanol et l'acide sulfurique sont regroupés dans le tableau 7.

Dans la partie aérienne de plante étudiée *P. chloranthus*, la recherche des alcaloïdes, des anthocyanes, des composés réducteurs, de l'amidon s'est montrée négative. Par contre, les flavonoïdes, les tanins et les coumarines sont présents en quantités considérables. La mise en évidence de cette dernière classe a été prouvée par **Halim et al (1995)** sur la plante *P. triradiatu*.

Nous notons que les saponosides, les stérols, les stéroïdes et les hétérosides sont présents en faible quantité.

Tableau 07 : Résultats des tests phytochimiques sur la partie aérienne de *P. chloranthus*.

Classes recherchées	Résultat trouvé
Flavonoïdes	++
Tanins	++
Stérols et stéroïdes	+
Alcaloïdes	-
Amidon	-
Composés réducteurs	-
Saponosides	+
Anthocyanes	-
Coumarines	++
Hétérosides	+

- : Test négatif ; ++ : Test positif ; + : Test faiblement positif

2. Extraction et dosages des flavonoïdes et flavonols

2.1- Rendement des extraits secs

Les résultats obtenus dans le tableau 9 montrent que le rendement en extrait aqueux de l'ordre de 10.07% est supérieur par rapport aux autres extraits, suivi par l'extrait méthanolique à raison de 8.45 %.

Les rendements en flavonoïdes et les fractions flavoniques acétate d'éthyle et butanolique sont de l'ordre de 4.48, 3.21 et 1.39 % respectivement.

Nous expliquons cette variation du rendement entre les extraits bruts dans notre étude au solvant d'extraction ainsi que la nature des polyphénols présents dans notre plante.

Tableau 8 : Rendement (%) en extrait bruts de *P. chloranthus*

	Rendements (%)
Extrait méthanolique	8.45
Extrait aqueux	10.07
Flavonoïdes	4.48
Fraction flavonique d'acétate d'éthyle	3.21
Fraction flavonique butanolique	1.39

Comparativement à la littérature, nos résultats sont supérieurs par rapport à l'étude de **Bouaziz et al (2009)**. Ces auteurs ont pu montrer que les rendements en composés phénoliques de *P. chloranthus* obtenus par l'extraction avec le méthanol à chaud et par l'eau sont de 3.10 et 5.0 % respectivement.

D'autres résultats reportés par **Çoruh et al (2005)** sur trois plante de la famille des Apiacées : *Prangos ferulacea*, *Chaerophyllum macropodium* et *Heracleum persicum* ont montre que les rendements en extrait méthanolique sont d'ordre de 4.18, 3.38 et 5.99 %. Ces valeurs sont inférieures à celle de notre extrait méthanolique (8.45%).

2.2. Teneurs des extraits bruts en flavonoïdes et flavonols :

Des dosages spectrophotométrique ont été effectués à partir des extraits bruts méthanolique et aqueux de la partie aérienne de *P. chloranthus* afin de déterminer les teneurs en flavonoïdes et en flavonols à partir des courbes d'étalonnage de la catéchine et de la quercétine respectivement (**Figure 06 et Figure 07**).

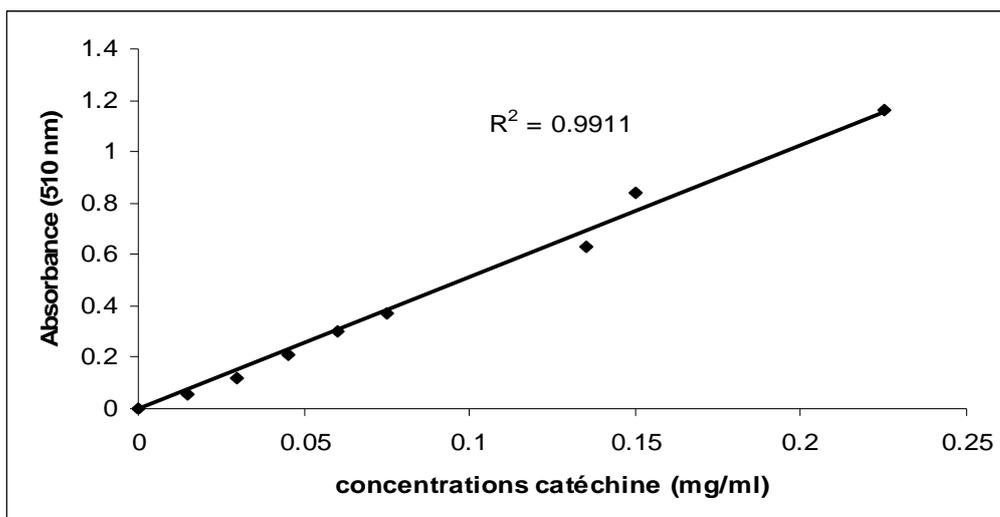


Figure 06 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

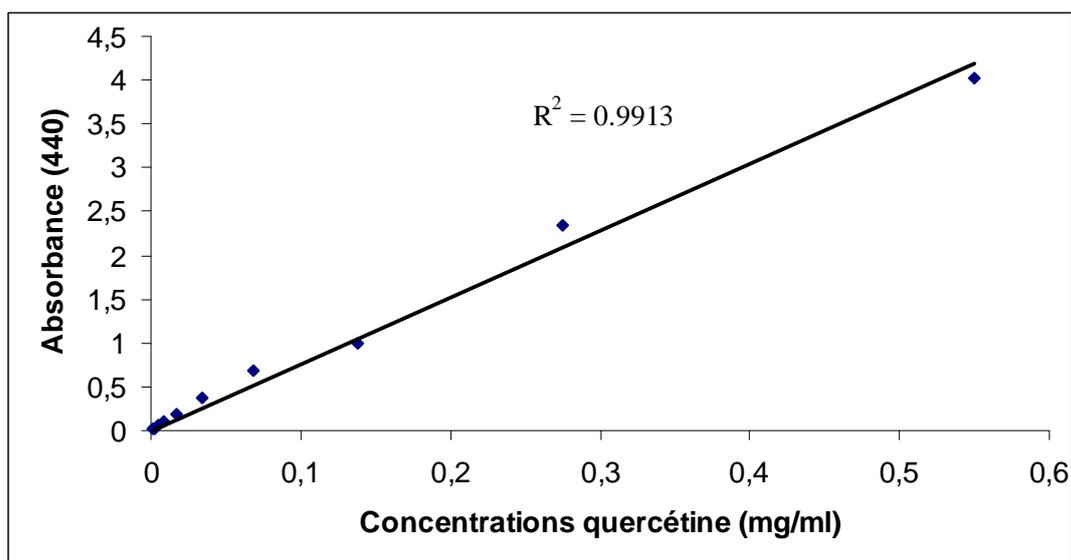


Figure 07 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonols.

Le tableau 10 résume les résultats obtenus des teneurs en flavonoïdes et en flavonols.

Tableau 09 : Teneur en flavonoïdes et en flavonols dans les extraits bruts de *P. chloranthus*.

Teneurs	Flavonoïdes (mg EC/ g MS)	Flavonols (mg EQ/ g MS)
Extrait méthanolique	4.284 ± 0.004	2.586 ± 0.098
Extrait aqueux	1.656 ± 0.075	0.633 ± 0.038

Nous observons que les teneurs élevées en flavonoïdes et en flavonols sont enregistrées dans l'extrait méthanolique avec des concentrations de 4.284 ± 0.004 mg EC/ g MS et 2.586 ± 0.098 mg EQ/ g MS. Pour l'extrait aqueux, les teneurs obtenus sont faibles.

Les résultats de **Bouaziz et al (2009)** ont révélé que l'extrait aqueux de *P. chloranthus* possède une teneur élevée en flavonoïdes par rapport à celle de l'extrait méthanolique avec des valeurs de 0.38 ± 0.04 mg équivalent de rutine/ g et 0.19 ± 0.02 mg/ g respectivement. Pour les flavonols, les mêmes auteurs ont reporté la présence de forte teneur dans l'extrait aqueux (0.24 ± 0.02 mg équivalent de rutine / g) par rapport à celui de l'extrait méthanolique (0.10 ± 0.01 mg/ g).

L'étude portée sur les graines de cumin (*Cuminum cyminum*) de la famille des Apiacées reportée par **Ho et al (2008)** a révélé une teneur en flavonoïdes de l'ordre de 241.1 ± 0.00 mg EC/ g qui est supérieure par rapport à nos résultats.

Cette différence trouve probablement son explication dans la différence d'un certains nombres de facteurs intrinsèques et extrinsèques à savoir la méthode d'extraction, l'origine de la plante et le cycle végétatif de la plante.

3. Etude de l'activité antioxydante

Les trois tests employés pour évaluer le pouvoir antioxydant des flavonoïdes et les deux fractions flavoniques acétate d'éthyle et butanolique sont la capacité antioxydante totale, la méthode de la réduction du fer et le piégeage du radical DPPH.

3.1- Capacité antioxydante totale (CAT)

Le résultat obtenu sur la figure 8 nous montre que tous les extraits présentent des différents degrés de la CAT dont les flavonoïdes et la fraction acétate d'éthyle révèlent presque les mêmes capacités de l'ordre de 1.999 ± 0.02 et 1.926 ± 0.08 mg EAA/g MS respectivement. Alors que, la fraction butanolique détient la meilleure capacité à raison de 2.907 ± 0.03 mg EAA/g MS.

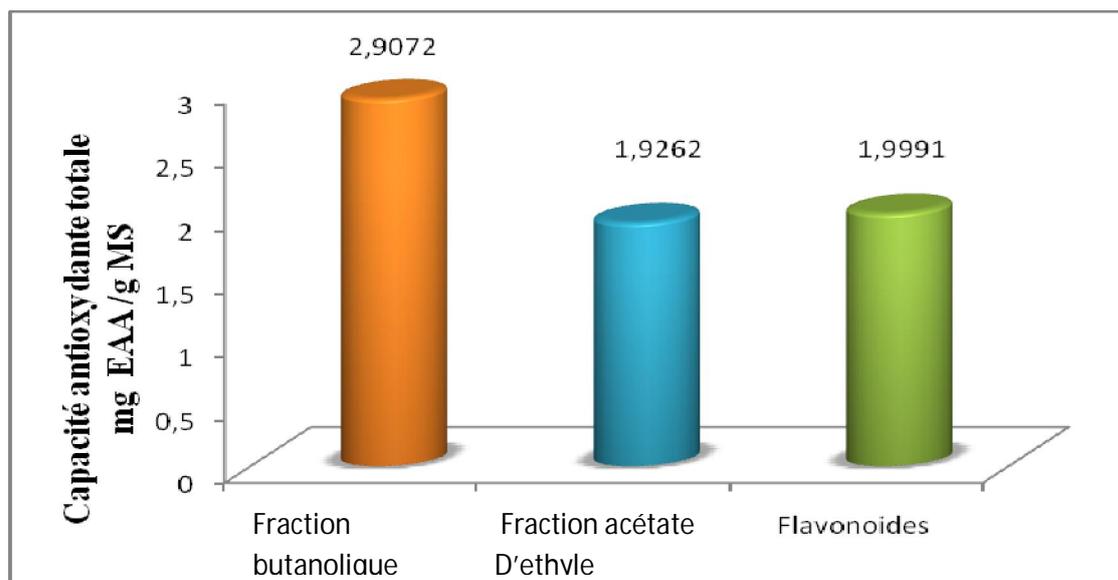


Figure 08 : Comparaison de la capacité antioxydante totale des flavonoïdes et des fractions flavoniques de *P. chloranthus*.

3.2. Réduction du fer

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des flavonoïdes à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (Karagozler *et al.*, 2008).

Le résultat représenté dans la **figure 09** nous a montré que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons, c'est-à-dire que le pouvoir réducteur des extraits est dose dépendante (concentration dépendante). Ce qui est confirmé par plusieurs auteurs (Ozturk *et al.*, 2007 ; Su *et al.*, 2008 ; Liuk *et al.*, 2009).

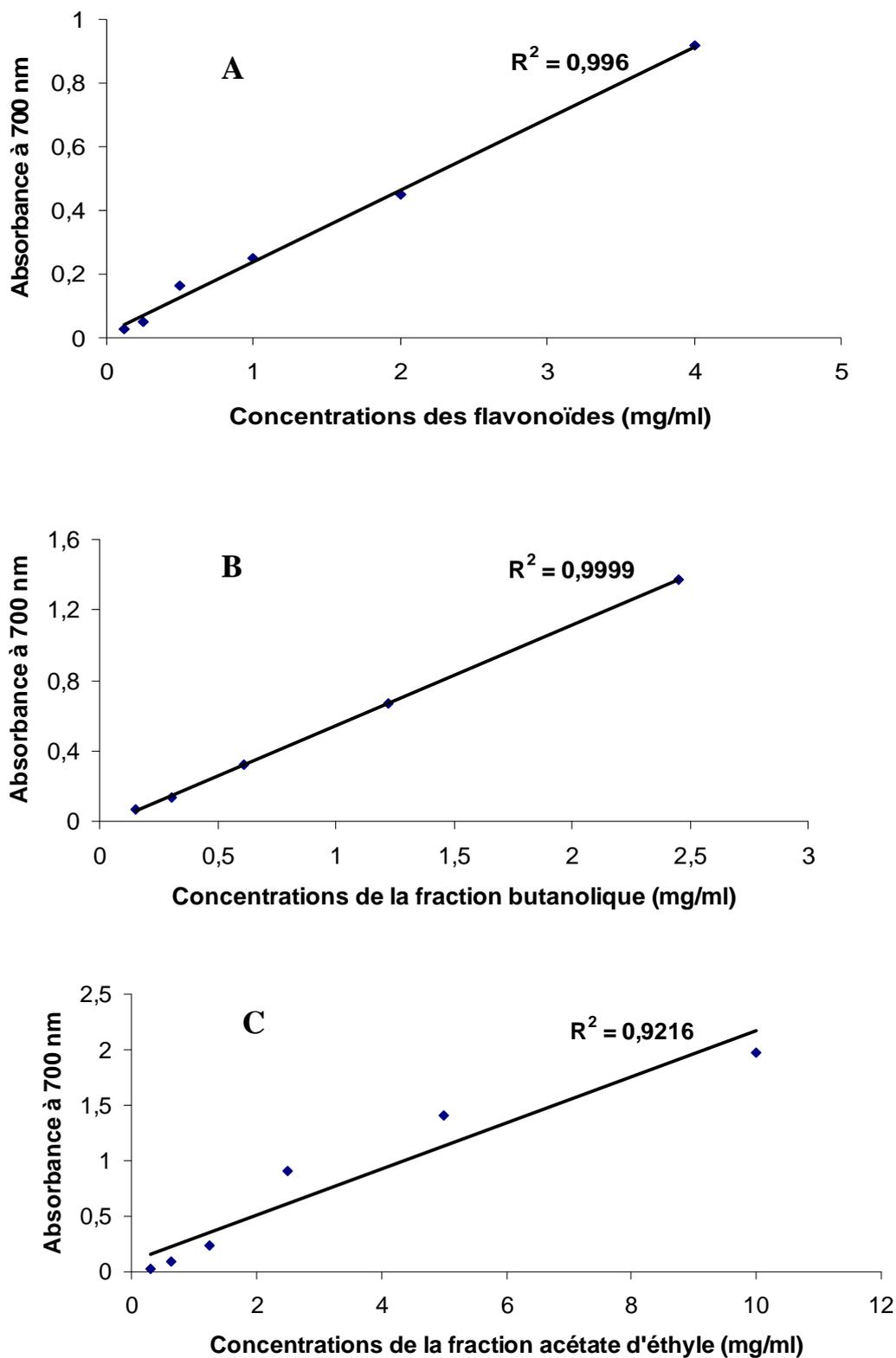


Figure 09 : Pouvoir réducteur des flavonoïdes et des fractions flavoniques (acétate d'éthyle et butanolique) par le test du FRAP.

A la concentration de 2.45 mg/ ml, le pouvoir réducteur de la fraction butanolique est largement supérieur (DO=1.377) par rapport aux extraits.

Afin de comparer l'activité réductrice de ces extraits de la plante par cette méthode, nous avons calculé la concentrations EC_{50} qui est défini comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du fer.

Le résultat obtenu illustrée dans le tableau 10 nous montre que la fraction butanolique possède une activité réductrice intéressante avec une concentration égale à 0.922 ± 0.008 mg/ ml suivi par la fraction acétate d'éthyle (1.9652 ± 0.0386 mg/ ml) et les flavonoïdes (2.158 ± 0.0399 mg/ ml). Ces valeurs restent faibles par rapport à l'acide ascorbique (0.06 mg/ml).

Tableau 10 : Valeurs des concentrations EC_{50} des flavonoïdes et des fractions flavoniques de *P. chloranthus* obtenues par le test de la réduction du fer.

Les extraits		IC_{50} (mg/ml)
Fractions flavoniques	Fraction acétate d'éthyle	1.9652 ± 0.0386
	Fraction butanolique	0.922 ± 0.008
Flavonoïdes		2.158 ± 0.0399
Acide ascorbique		0.063 ± 0.002

3.3. Piégeage du radical libre DPPH[•]

L'activité antiradicalaire des flavonoïdes et des fractions flavoniques (acétate d'éthyle et butanolique) de *P. 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 515 nm (Figure 10) Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires, ceci est expliquée par l'augmentation du pourcentage d'inhibition (Figure 11).

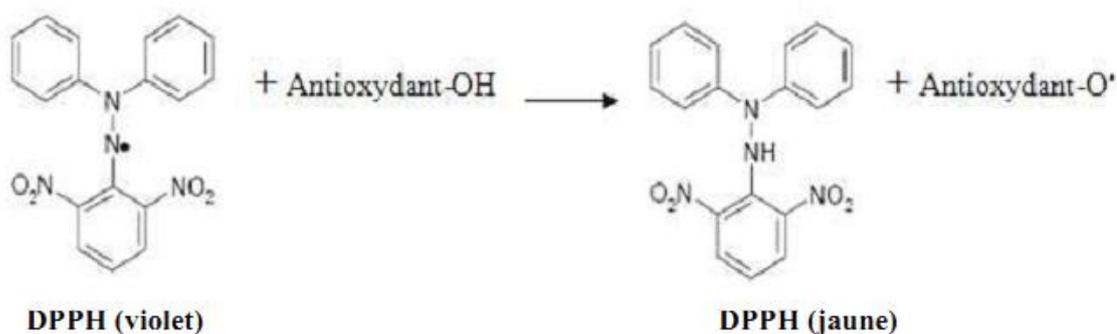


Figure 10 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH[•]

Les valeurs obtenues de ce test exprimées en pourcentages d'inhibition (%) en fonction des concentrations ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire (Figure 11).

A la concentration 4 mg/ ml, les pourcentages d'inhibition à neutraliser le radical DPPH sont égales à 40.23 et 41.35 % pour les flavonoïdes et la fraction acétate d'éthyle respectivement. Par contre, la fraction butanolique enregistre un pourcentage de l'ordre de 49.03 % à la concentration 2.45 mg/ ml, ce qui explique la forte activité antiradicalaire.

Ces résultats sont conformes aux travaux réalisés par **Athamena et ses collaborateurs (2010)** sur les graines de cumin. Ces auteurs ont reporté qu'à concentration 0.1 mg/ ml, la fraction butanolique a présente le pourcentage d'inhibition le plus élevée (94.55%), suivi par la fraction acétate d'éthyle (58.11%).

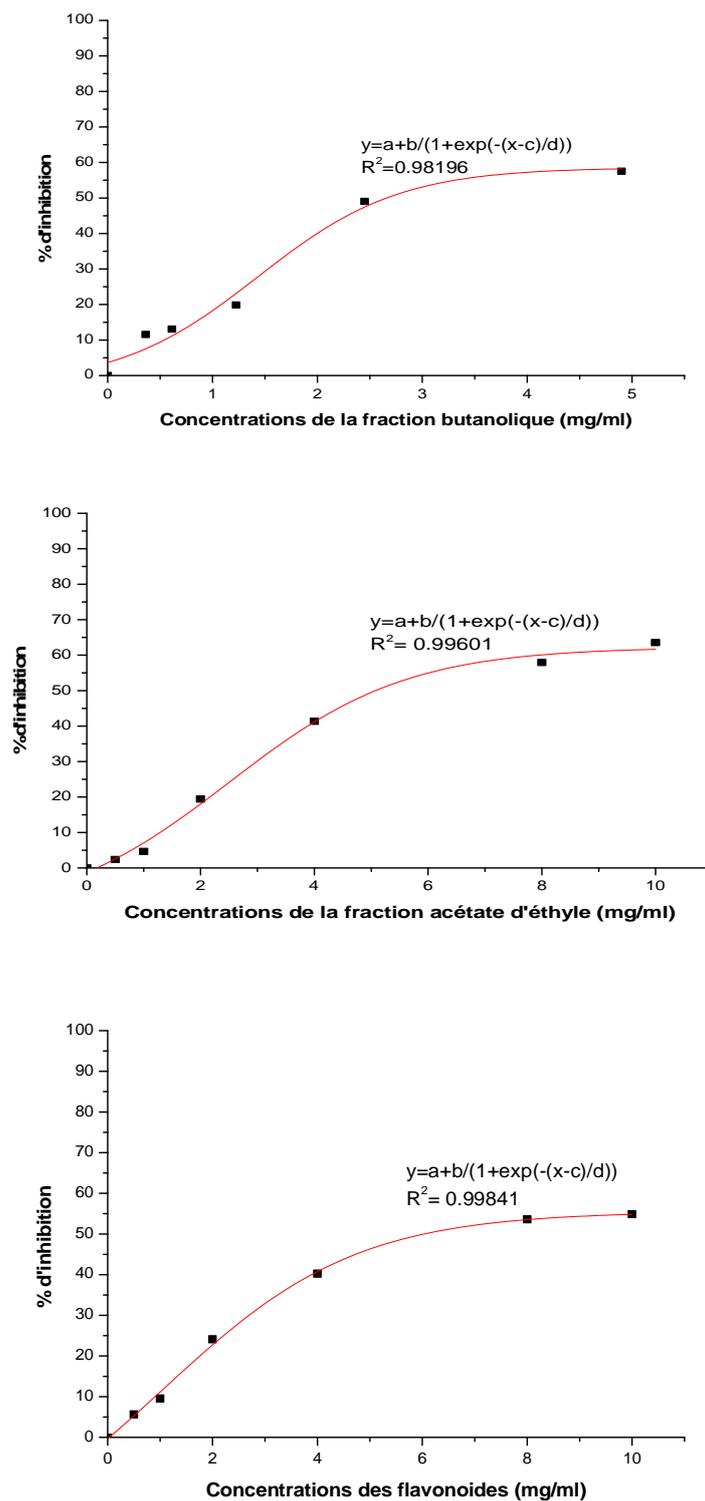


Figure 11 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH[•] en fonction des concentrations des flavonoïdes et les fractions flavoniques de la partie aérienne de *P.chloranthus*.

A partir de ces courbes illustrées dans la figure 11, nous pouvons calculer la concentration EC_{50} correspond à chaque extrait pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant.

Tableau 11 : Valeurs des concentrations EC_{50} des flavonoïdes et des fractions flavoniques de *P. chloranthus* obtenues par le test du DPPH.

Les extraits		EC_{50} (mg/ ml)
Fractions flavoniques	Fraction acétate d'éthyle	5.029 ± 0.102
	Fraction butanolique	2.730 ± 0.164
Flavonoïdes		5.996 ± 0.521
Acide ascorbique		0.11 ($R_2 = 0.96$)

Nous constatons comme le test du FRAP que la fraction butanolique représente la fraction la plus active avec une concentration de EC_{50} égale à 2.730 ± 0.164 mg/ ml. Les flavonoïdes et la fraction acétate d'éthyle ont des concentrations presque identiques à raison de 5.029 ± 0.102 et 5.996 ± 0.521 mg/ ml respectivement. Ces activités antiradicalaire sont faible en comparaison à l'acide ascorbique (0.11 mg/ ml).

La corrélation entre les trois tests du pouvoir antioxydant et les extraits étudiés révèle l'existence d'une relation étroite entre la CAT et les deux tests FRAP et DPPH de la fraction butanolique. Par contre, les flavonoïdes malgré la teneur élevée dans l'extrait brut (4.284 ± 0.004 mg EC/ g MS) montrent des activités faibles à réduire le fer et à piéger le radical DPPH avec une faible valeur de la CAT. Ceci peut être expliqué par la présence de synergie entre les molécules des flavonoïdes qui diminue le pouvoir antioxydant et que le fractionnement de cette famille en deux fractions acétate d'éthyle et butanolique renforce ce pouvoir. Notant que l'expression de l'activité antioxydante d'un extrait est corrélée non seulement de la quantité des molécules flavoniques mais aussi de leur structure chimique. Cette confirmation a été reportée par plusieurs auteurs (Montoro *et al.*, 2006). D'autres études ont montré que l'acide gallique est le composé le plus actif dans les tests DPPH et FRAP en comparaison avec d'autres antioxydants et que les flavonoïdes et les acides phénoliques sont considérablement plus antioxydants que la vitamine C et la vitamine E (Cao *et al.*, 1997 ; Vinson *et al.*, 1995 ; Schlesier *et al.*., 2002).

4. Activité antimicrobienne

4.1. Résultats de l'Antibiogramme

4.1.1. *Escherichia coli* ATCC8739

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans la figure ci-dessous et dans le tableau 12 (Annexe 13), les antibiotiques à savoir le cotrimoxazole, néomycine et gentamicine possèdent les zones d'inhibitions les plus élevées avec des valeurs de 28, 24 et 24 mm, respectivement.

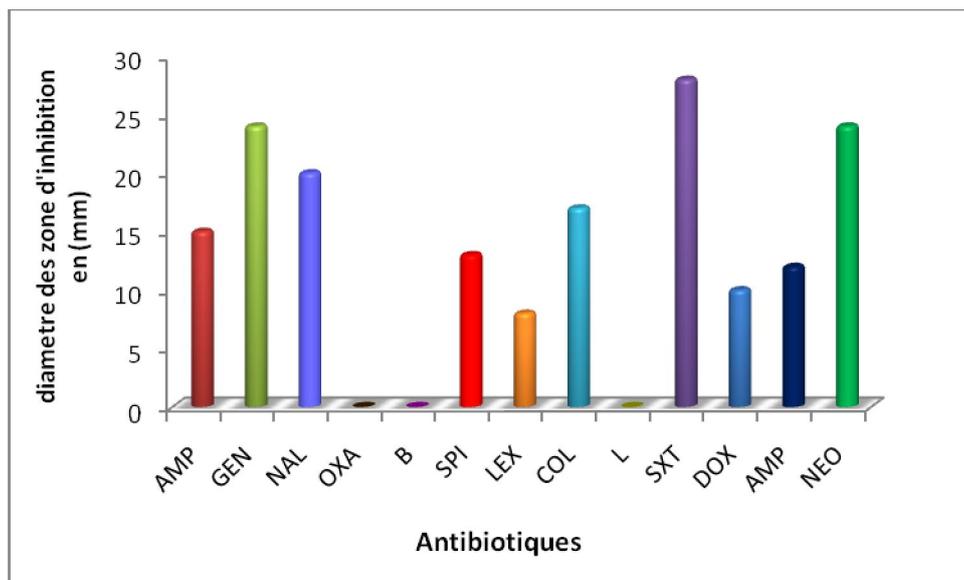


Figure 12 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *E. coli* ATCC 8739.

Le tableau 12 résume les interprétations des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques où cette souche est résistante à sept (07) antibiotiques qui sont : oxacilline, bacitracine, spiramicine, cefalexine, lincomycine, ampicilline et doxycycline, par contre elle est sensible pour les autres.

Tableau 12 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *E. coli* ATCC 8739 (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline + acide clavulanique	R
Gentamicine	S
Acide nalidixique	S
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spiramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	R
Ampiciline	R
Néomycine	S

S : Sensible, R : Résistante.

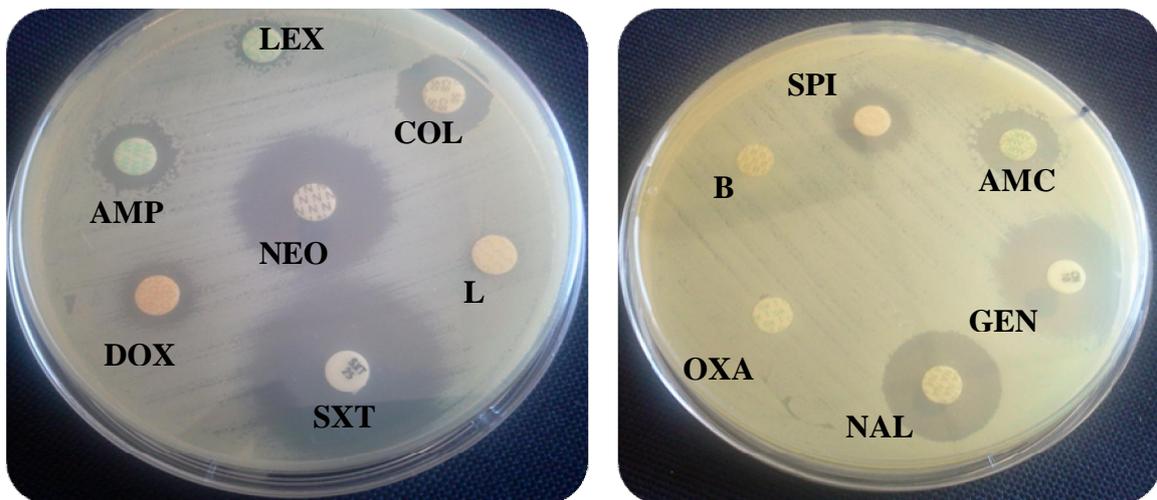


Photo 02 : Antibiogramme d'*E. coli* ATCC8739.

4.1.2. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13047:

Nous constatons une sensibilité remarquable de la souche *K. pneumoniae* testée vis-à-vis gentamicine, colistine, cotrimoxazole, ainsi qu'une résistance aux antibiotiques restant (Tableau 14).

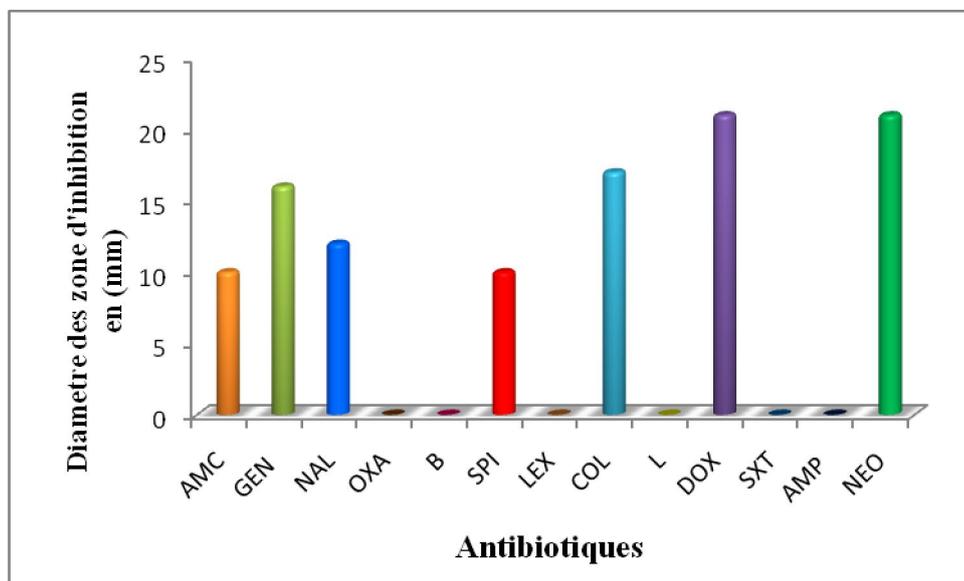


Figure 13 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *K. pneumoniae* ATCC 13047.

D'après le tableau 13 et la figure 13, *Klebsiella pneumoniae* est sensible aux quatre antibiotiques (néomycine, cotrimoxazole, colistine et gentamicine) et résistante aux autres.

Tableau 13 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *K. pneumoniae* ATCC 13047 (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline +Acide clavulanique	R
Gentamicine	S
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spiramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	R
Ampiciline	R
Néomycine	R

S : Sensible, **R** : Résistant

4.1.3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 :

Cette souche à Gram négatif a une résistance à presque tous les antibiotiques testés et une sensibilité à trois antibiotique : Colistine, l'amoxicilline + acide clavulanique et la néomycine (**Figure 14, Tableau 14, Annexe 13**).

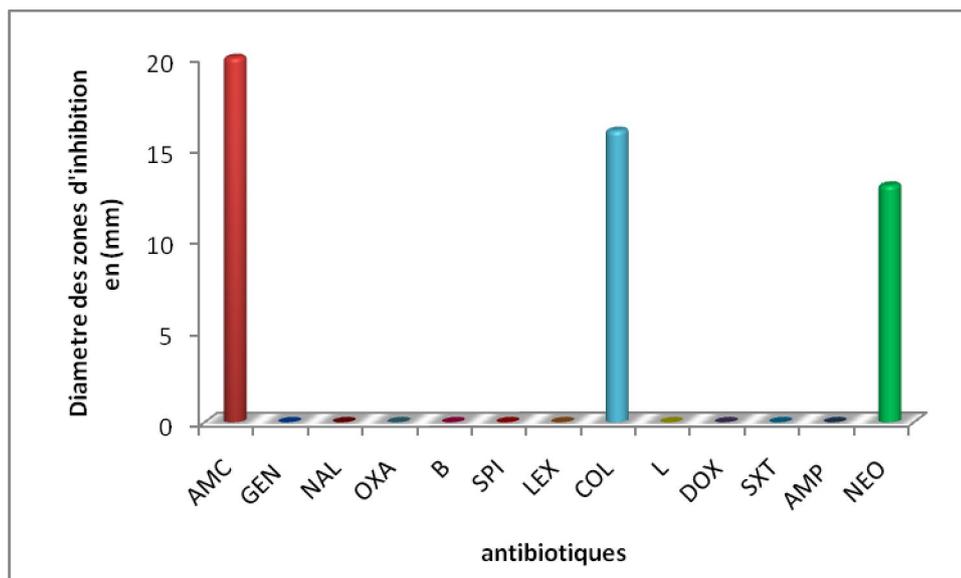


Figure 14 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Nous constatons une résistance totale remarquable de la souche *P. aeruginosa* testée vis-à-vis de tous les antibiotiques et une sensibilité contre Colistine et l'amoxicilline + acide clavulanique (**Tableau 14**).

Tableau 14 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	I
Gentamicine	R
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spiramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	R
Doxycycline	R
Ampiciline	R
Néomycine	S

S : Sensible, I : Intermédiaire, R : Résistante

4.1.4 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 :

D'après la figure 15, nous constatons que la souche à Gram positif *S. aureus* possède une sensibilité contre : gentamicine, acide nalidixique, colistine, cotrimoxazole et ampiciline avec des diamètres qui varient entre 14 et 27 mm

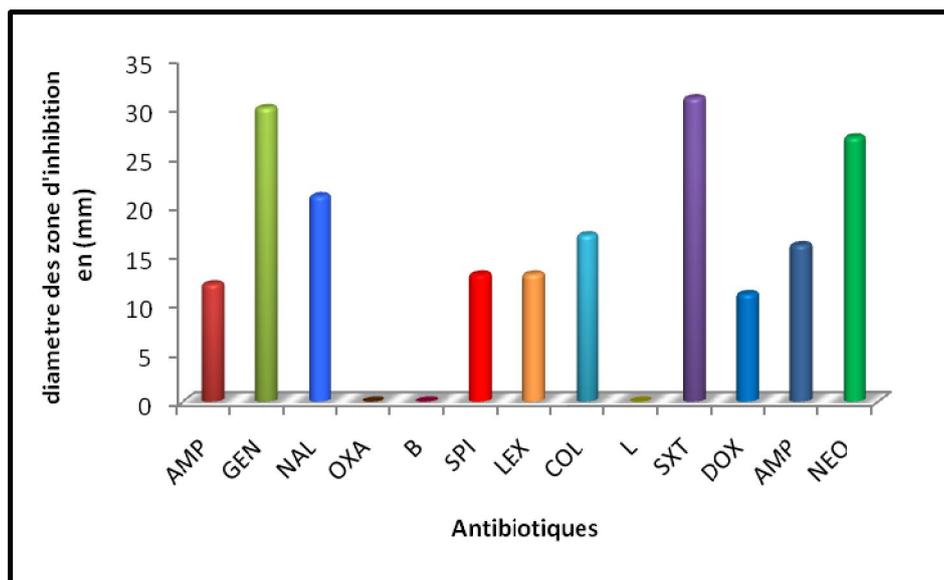


Figure 15 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *S. aureus* ATCC 6538.

Nous avons révélé une résistance de la souche *S. aureus* aux : gentamicine, oxacilline, bacitracine, spiramicine, lincomycine, néomycine et doxycycline, alors que les autres antibiotiques possèdent une sensibilité intermédiaire (ampiciline, cefalexine) et une sensibilité pour les autres antibiotiques (gentamicine, acide nalidixique, colistine et cotrimoxazole) (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *S. aureus* ATCC 6538 (CASFM, 2012).

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

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

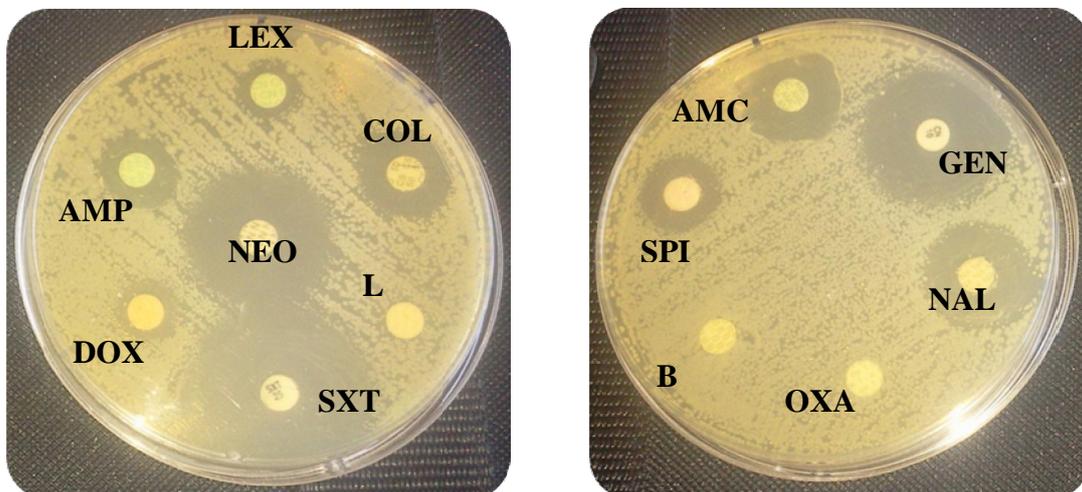


Photo 03: Antibiogramme de *S. aureus* ATCC 6538

4.1.5. *Micrococcus luteus* ATCC 13047:

D'après la figure 16 nous constatons, qu'à l'exception de l'acide nalidixique, oxacilline, bacitracine et lincomycine, il y'a des zones d'inhibitions sous l'effet des antibiotiques avec des diamètres qui varient entre 11 et 33 mm.

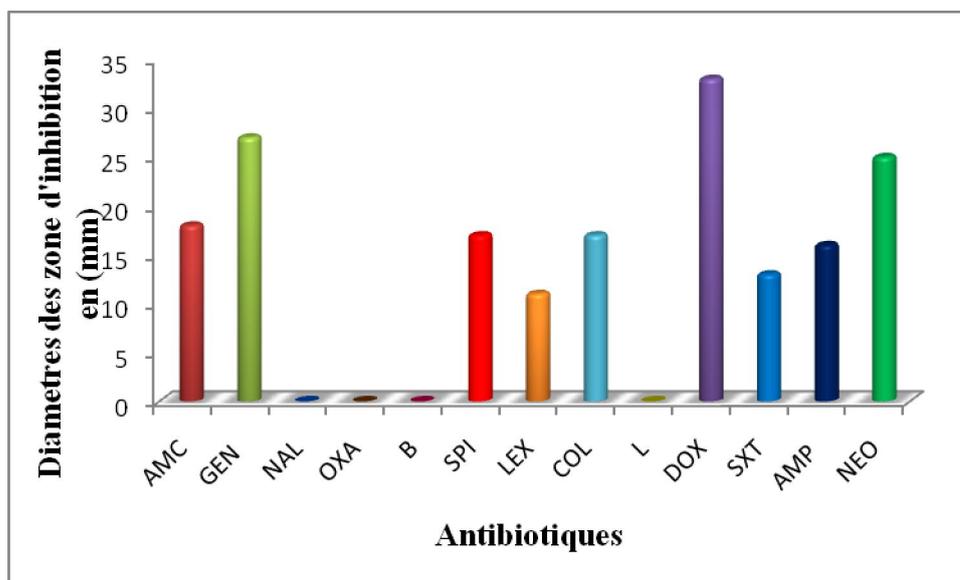


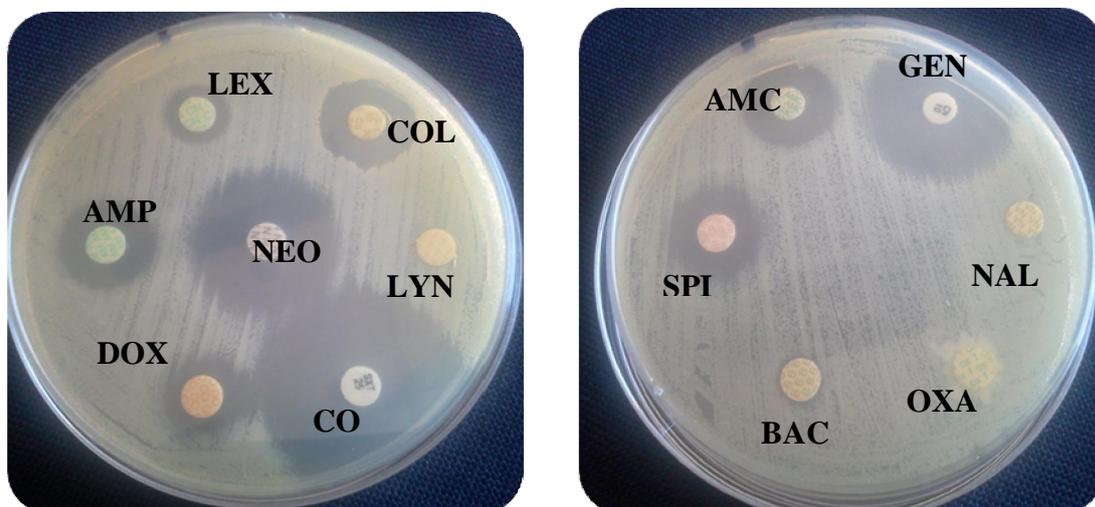
Figure 16 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *M. luteus* ATCC 13047.

Nous avons révélé une sensibilité totale de la souche *M. luteus* à gentamicine, colistine, cotrimoxazole, alors que l'amoxicilline + acide clavulanique et ampicilline possèdent une sensibilité intermédiaire, par contre elle représente une résistance contre les autres antibiotiques (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *M. luteus* ATCC 13047.

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline + Acide clavulanique	I
Gentamicine	S
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spiramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	S
Doxycycline	I
Ampiciline	R
Néomycine	R

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

**Photo 04** : Antibiogramme de *M. luteus* ATCC 13047.

4.1.6. *Listeria monocytogenes* ATCC15313 :

D'après la figure 17 et le tableau 17 (Annexe 13), nous constatons, qu'à l'exception de gentamicine, colistine et néomycine où il y'a des zones d'inhibitions qui varient entre 11 et 20 mm. La souche à Gram positif *L. monocytogenes* a présenté une résistance remarquable contre les autres antibiotiques testés.

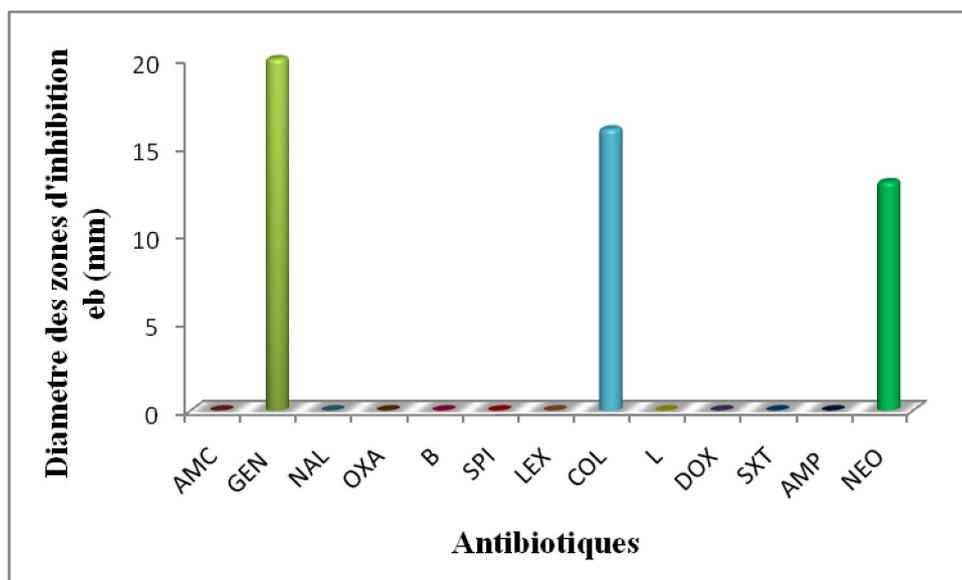


Figure 17 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *L. monocytogenes* ATCC15313.

Le tableau 17 résume les interprétations des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques où cette souche est résistante à la plupart des antibiotiques.

Nous avons révélé une sensibilité intermédiaire de la souche *L. monocytogenes* à la néomycine, alors que cette bactérie présente une sensibilité vis-à-vis les antibiotiques : gentamicine et la colistine (**Tableau 18**).

Tableau 18 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *L. monocytogenes* ATCC15313.

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme
Amoxicilline+acide clavulanique	R
Gentamicine	S
Acide nalidixique	R
Oxacilline	R
Bacitracine	R
Spiramicine	R
Cefalexine	R
Colistine	S
Lincomycine	R
Cotrimoxazole	R
Doxycycline	–
Ampiciline	R
Néomycine	I

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

4.2. Pouvoir antifongique

Afin de tester le pouvoir antifongique, la levure *Candida albicans* ATCC10231 est mise en contact avec la nystatine (30 µg). Le résultat nous montre une résistance totale.

4.3. Résultats de la méthode de disques

Du fait que les flavonoïdes et les fractions flavoniques ont été récupérés par le DMSO, ce dernier est testé vis-à-vis les six souches bactériennes afin de vérifier son pouvoir antimicrobien avec une concentration de 10 µl. Les résultats obtenus ont révélé négatifs, ce qui prouve qu'il n'a aucun effet inhibiteur.

Les diamètres des zones d'inhibition des flavonoïdes et des fractions flavoniques observés sur les six souches bactériennes ont été mesurés et représentés dans la figure 18.

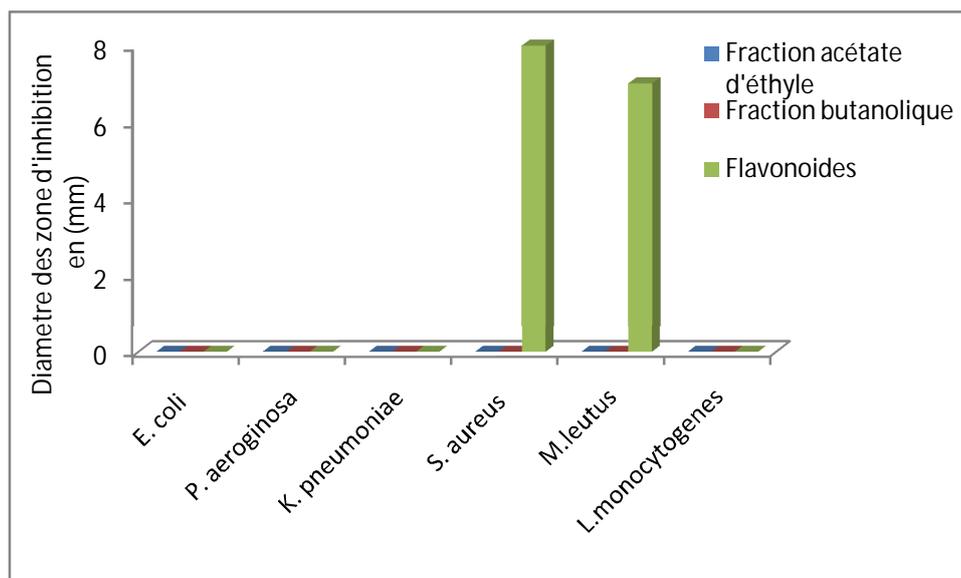


Figure 18 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des différentes fractions.

Selon la figure 18 et le tableau 19 (**Annexe 13**), nous remarquons une faible zone d'inhibition des flavonoïdes à la concentration 200 mg/ml sur les deux souches bactériennes Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*. Alors que la fraction acétate d'éthyle et la fraction butanolique de *P. chloranthus* se sont avérées inactifs contre l'ensemble des souches testées. Par contre, les résultats de **Benmekhbi (2008)** sur la fraction butanolique d'espèce *P. scoparius* ont révélé une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les souches testées à la concentration 128 µg/ml.

L'hypersensibilité de *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* 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**).

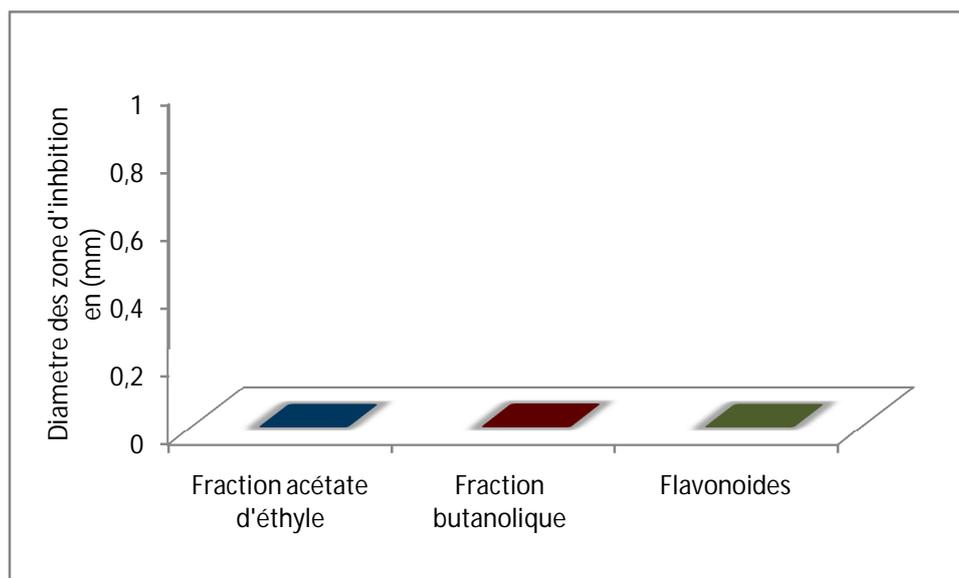


Figure 19 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition de la levure *Candida albicans* ATCC 10231 en fonction des extraits.

D'après la figure 19, les résultats de l'activité antifongique ont révélé l'inefficacité de tous les extraits contre la levure *Candida albicans*.

Pour cela, nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement de la quantité des composés phénoliques mais aussi de la structure des ces molécules.

CONCLUSION GENERALE

La présente étude a porté sur les flavonoïdes et les fractions flavoniques de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus* qui appartient à la famille des Apiacées, une des familles la plus importante de la flore saharienne algérienne.

Après le criblage phytochimique, nous avons pu mettre en évidence la présence des tanins, des flavonoïdes, des stérols et stéroïdes, les hétérosides et des coumarines.

Les rendements les plus élevés sont de l'ordre de 10.07 % pour l'extrait aqueux et 8.45 % pour l'extrait méthanolique. Pour les flavonoïdes et les fractions flavoniques acétate d'éthyle et butanolique, les rendements sont de 4.48, 3.21 et 1.39 % respectivement.

La quantification des flavonoïdes et des flavonols dans l'extrait méthanolique égale à 4.284 ± 0.004 mg EC/ g MS et 2.586 ± 0.098 mg EQ/ g MS, respectivement. Ces teneurs sont élevées comparativement à l'extrait aqueux qui révèle des quantités de 1.656 ± 0.075 mg/ g pour les flavonoïdes et 0.633 ± 0.038 mg/ g pour les flavonols.

L'étude des propriétés antioxydantes des flavonoïdes et des fractions flavoniques par trois tests nous montre l'efficacité de la fraction butanolique à réduire le fer (0.922 ± 0.008 mg/ ml) et à neutraliser le radical DPPH (2.730 ± 0.164 mg/ ml) par rapport aux autres extraits. Ce pouvoir est corrélé à la capacité antioxydante totale qui est de 2.907 ± 0.03 mg EAA/g MS.

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode de la diffusion de disque, les deux souches *S. aureus* et *M. luteus* sont sensibles aux flavonoïdes. Par contre, les autres fractions acétate d'éthyle et butanolique présentent aucun effet sur les souches testées.

Par ailleurs, aucune activité anti-*Candida albicans* n'a été révélée sous l'effet des extraits.

Un travail complémentaire s'impose en vue d'identifier les différentes molécules en particulier les flavonoïdes isolés des fractions acétate d'éthyle et butanolique et les purifier en utilisant diverses techniques chromatographiques et spectrales.

Dans le cadre d'application pharmacologique et industrielle comme des conservateurs alimentaires, il est souhaitable d'évaluer et tester ces molécules actives pour d'autres propriétés biologiques *in vivo*.

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*, (21): 129-133.

Al kadi, A. A. (1989). Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en Libie, (11) :2.

Alan, L., Miller, N. D. (1996). Antioxidant flavonoids: Structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev*, 1(2): 103-111.

Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int*, 41: 1–15.

Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S. (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11(1) :69

Atik Bekkara, F., Benhammou, N., Panovska, K.T. (2008). Biological activity of essential oil and the extract of the phenolic compounds of *Inula viscosa* of the area of Tlemcen (Algeria). *Advances in Food Science*, 30(3):132-139

Atwal, R. (2003). In vitro Antimicrobial Activity Assessment of *Zymox Otic* Solution Against a Broad Range of Microbial Organisms. *Int. J. Res. Vet Med*, 1(3) :240-252.

-B-

Bahorun, T. (1997). Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.

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.

Basile, A., Giordano, S., Lopez Saez, J.A., Cobianchi, B.C. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochem*, (8): 1419-82.

Bekhechia, C., Atik Bekkaraa, F., Consigliob, D., Bighellib, A., Tomi, F., (2012). Chemical Variability of the Essential Oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinate* from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, (9): 2743-2753.

Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R., Rome S. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil*, 203: 27-36.

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*, 38 (2), 96–99.

Bellakhdar, J. (1997). Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle, ibis Press.

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 : 206-208.

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: 022-028.

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):639-641.

Bouattoura, N. (1988). Les ressources phytogénétiques. Importance Préservation-Utilisation. *Annales, INA, El Harrach-Alger*, 12 (1): 43-63.

Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol*, 13, 135.

Bouaziz, M., Dhouib, A., Loukil, S., Boukhris, M. ; and Sayadi, 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.

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

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3^{ème} édition, Tec & Doc, Paris, 387-402.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} édition., Paris, Editions TEC & DOC Lavoisier, 1120-7.

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 (2013) :85– 89.

-C-

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships. *Free Radic Biol Med*, 22: 749–60.

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

Cushnie, T.P., Hamilthoh, V.E.S., Lamb, A.J. (2003). Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoïds and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res*, 158 (4): 281-9.

-D-

Dacosta, Y. (2003) Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317 p.

Djebaili, S ; (1984). Steppe algérienne. Phytosociologie et écologie. Ed. OPU, Ben-Aknoun, Alger, p177.

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

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 plant flavonoïdes. *Méd. Nut*, 32 : 17-27

Elicoh-Middleton, J.r ., Chithan, K ., Theoharis, C. (2000). Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 4(52): 673-751.

-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.

Fritch, H., Griesbach, H. (1975). Biosynthesis of cyaniding in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochem*,14: 2437-42.

-G-

Galvez, J., Crespo , J., Jimenez, J .,Suarez, A., Zarzuelo, A. (1993a). Antidiarrhoeic activity of quercitin in mice and rats. *J. Pharmacol* ; 45: 157-9.

Galvez, J., Zarzuelo, A., Crespo, J., Lorente, M.D., Acete, M.A., Jimenez, J. (1993b). Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med*, 59: 333-6.

Garnier, J.P., Noel, G.L., Beadeux, J.L. (2005). Actualité en pharmacie et biologie clinique. Pathologie cardiaque et Vasculaire. Ed Jahn Libbey Eurotexte, 87.

Gee, J.M., Johnson, I.T. (2001) Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 1-182.

Goodarzi, M.T., Zal, F., Malakooti, M., Safari, M.R., Sadeghian, S. (2006). Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Med. Iran*, 44(1): 41-5.

Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini Ana, E.C.S., Fonseca Maria, J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Method. *AAPS Pharm Sci*, 5 (2) : 1-5.

Gurib-Fakim, A. (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1-93.

Gutteridge, J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun*, 19:141-158.

-H-

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

Haba, H. (2002). Thèse de magister chimie, Univ. Batna Algérie.

Halim, A.F., Saad, H., Lahloub, M.F., Ahmed, A.F. (1995).Pituranthoside from Pituranthos Triradiatus. *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.

Harborne, J.B. (1989). Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep*, 25 (7): 85-109.

Heim, E.K., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572-584.

Heller, W., Forkmann, G. (1993). The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 399-425.

Herbert, R.B. (1989). The biosynthesis of secondary metabolites. 2^{ème} edition Chapman and Hall p2 ,11-115.

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.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.

-J-

Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M., Yusuf, S. (1995). The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann. Intern Med*, **123**: 860.

-K-

Kaabeche, M. (1990). Les groupements végétaux de la région de Bou saad (Algérie). Essai de synthèse sur la végétation steppique du Maghreb. *Thèse de Doctorat en sciences*, Université de Paris Sud, Centre d'Orsay, 93.

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

Kumaran, S.P., Kutty, B.C., Chatterji, A., Subrayan, P.P., Mishra, K.P. (2007). Radioprotection against DNA damage by an extract of Indian green mussel, *Perna viridis* (L). *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 26 (4): 263–272.

-L-

Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, P.J., Houlst, J., Robin, S. (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol*, 38 (17): 2859-2865.

Lee, Y., Howard, L.R., Villalon, B. (1995). Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J. Food Sci*, 60 (3): 473–476.

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*. *Flavour and Fragrance Journal*, (22): 317-321.

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

-M-

Macheix, J.J., Fleurit, A., et Billot, U. (1990). Fruits phenolics. CRC Inc Boca a ton Florida. 378.

Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Jay–Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes, 4-5.

Marc, F.r., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C. et al. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S : médecine sciences*, 20(4) : 458-463.

Martini, A., Katerere, D.R., Eloff, J.N.(2004). Seven flavonoïds with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharmacol*, 93 (2-3): 207-12.

Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., Lüthje, S. (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, 3: 173-193.

Montoro, P., Tuberoso, C.I.G., Piacente, S., Perrone, A., De Feo, V., Cabras, P., Pizza, C. (2006). Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 41: 1614–1619.

-N-

Novak, I., Buzas, G., Minker, E., Kolfai, M., Szendrei, K. (1966). *Planta med*, (14): 57.

-O-

Ono, E., Hatayama, M., Isono, Y., Sato, T., Watanabe, R., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T., Nakayama, T. (2006). Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J*, 45: 133-43.

Ouali, K., Trea, F., Toumi, L., Bairi, A., Maurel, D., Guellati, M.A. (2007). L'hespéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations fœtales au cours du diabète gestationnel expérimental. *Phytothér*, 5 (4): 204-9.

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

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

Ozturk, M., Aydogmus-Ozturk, F., Duru, M.E., Topcu, G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant. *Food Chemistry*, 106: 1264-1270.

-P -

Paris, R., Moyse, H. (1969). Précis de matière médicale (Tome 3).

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63: 1035-1042.

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.

Puppo, A. (1992). Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type reactions; Influence of the Iron Chelator. *Phytochemistry*, 31(1):85-88.

-Q-

Quezel, P.; Santa, S. (1963). Nouvelle flore de L'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du Centre National de la recherche scientifique. Tome II.

-R-

Rahal, K., Benslimani, A., Tali-Maamar, H., Missoum, M.F.K., Kechih-Bounar, S., Ammari, H. (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 6^{ème} édition

Remesy, C., Manach, C., Demigne, C., Texier, O., Regeat, F. (1996). Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut*, 32 (1):17-27.

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

-S-

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Sci. Technology International*, 8:121-137.

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

Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res*, 36(2): 177–87.

Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., Heber, D. (2006). Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J. Nutr*, 136 (10): 2481-5.

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

Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F., et al. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's [letter]. *Nature*, 382: 120.

Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M. (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem*, 11: 1135– 1146.

Su, M.S., Shyu, Y.T., Chien, P.J. (2008). Antioxidant activities of vetrus herbal product extracts. *Food Chemistry*, 111: 892-896.

-T-

Touil, A., Rhouati, S., Creche. (2006). Flavonoid glycosides from *Pituranthos chloranthus*. *Chemistry of compounds*, 42(1):104-105.

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

-V-

Van Acker, S., Tromp, M., Haenen, G. R. M. M., van der Vijgh, W., Bast, A. (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochem. Biophy. Res. Co*, 214(3): 755-9.

Vérité, P., Nacer, A., Kabouche, K., and Segbuin. E. (2004). Composition of seeds and stems essential Oils of *Pituranthos scoparius* (Coss. & Dur). *Schinz. Flavour Frage. J*, 19: 562-564.

Verni, G., Zamkotsian, R-M., Verbin, G., Ghiglione, C., Dahia, M., Pqrkqnyim, C. (1999). Abstracts of papers American Chemical Society. (217) :1-2

Vernin, G., Lageot, C., Ghiglione, C., Dahia, M., et Parkanyi, C. (1999). *Journal of Essential Oil Research*. 11 (6): 673-676.

-W-

Wilson, A. (1987). Flavonoids pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridonpoda*) and other lycaenid butterflies. *J. Chem. Ecol*, 13(3): 473-493.

-Z-

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64 (4): 555-559.

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: les rendements (%) des différentes fractions et extrait flavonoïdes de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*.

Extrait ou fraction	Rendements %
Extrait aqueux	10.07
Extrait méthanolique	8.45
Les flavonoïdes	4.478
Fraction acétate d'éthyle	3.21
Fraction butanolique	1.39

Annexe 3: Calculs des teneurs des flavonoïdes et flavonol de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus*

Extrait	Concentration des flavonoïdes (mg/g)	Concentration des flavonols (mg/g)
Extrait méthanolique	4.2842 ± 0.0004	2.5868 ± 0.0982
Extrait aqueux	1.6561 ± 0.7590	0.6337 ± 0.0386

Annexe 4 : Résultat de la capacité antioxydante totale (CAT) trouvé pour les différentes fractions.

Extrait	Concentration (mg EAA/g MS)
Fraction Acétate d'éthyle	1.9262 ± 0.0843
Fraction butanolique	1.7443 ± 0.1408
Fraction méthanolique	1.9991 ± 0.0250

Annexe 5: Résultat du test de DPPH trouvé pour la fraction acétate d'éthyle et les flavonoïdes

Concentrations mg/ml	Fraction acétate d'éthyle		Les flavonoïdes	
	DO Moyenne	% d'inhibition	DO Moyenne	% d'inhibition
10	0.2495	63.46	0,3077	54,87
8	0.28735	57.92	0,3164	53,60
4	0.40055	41.35	0,4075	40,24
2	0.5503	19.42	0,5175	24,10
1	0.6511	4.67	0,6169	9,53
0.5	0.6666	2.40	0,6435	5,63

Annexe 6 : Résultat du test de DPPH trouvé pour la fraction butanolique

Concentrations mg/ml	Moyenne DO	% d'inhibition
4.9	0.2534	57.54
2.45	0.3042	49.02
1.225	0.4783	33.35
0.6125	0.5188	13.06
0.3625	0.5278	11.46

Annexe 7 : Résultat du test de DPPH trouvé pour la fraction flavonique aqueuse

Concentrations mg/ml	Moyenne DO	% d'inhibition
15,3	0,7292	7,74
7,65	0,7427	6,03
3,825	0,7577	4,13
1,9125	0,7729	2,21
0,9562	0,7775	1,63
0,4787	0,7855	0,61

Annexe 08 : Résultat du test de FRAP trouvé pour la fraction acétate d'éthyle

Concentrations mg/ml	Moyenne DO
10	1.9825
5	1.4036
2,5	0.9111
1,25	0.2334
0,625	0.0857
0,3125	0.0229

Annexe 09: Résultat du test de FRAP trouvé pour la fraction butanolique

Concentrations mg/ml	Moyenne DO
2,45	1,37235
1,225	0,67145
0,6125	0.3236
0,3062	0,13905
0,1531	0,06905

Annexe 10: Résultat du test de FRAP trouvé pour la fraction flavonique méthanolique

Concentrations mg/ml	Moyenne DO
4	0,9176
2	0,4481
1	0,2487
0,5	0,1625
0,25	0,0506
0,12	0,02725

Annexe 11: Résultat du test de FRAP trouvé pour la fraction flavonique aqueuse

Concentrations mg/ml	Moyenne DO
15,3	0,5696
7,65	0,2864
3,825	0,1825
1,9125	0,0530
0,9562	0,0257
0,4787	0,01425

Annexe 12 : Composition des milieux de culture

Mueller Hinton Agar (MH) :

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar.....	17
Eau distillée.....	1L

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

Bouillon Sabouraud

Peptone de gélatine.....	10g
Glucose	20g
Eau distillée.....	1000ml
pH	5,6

Sabouraud

Peptone de gélatine.....	10g
Glucose	20g
Agar	17g
Eau distillée.....	1000ml
pH	5,6

Annexe 13 : Résultats des antibiotiques et des différentes fractions.

Tableau 13 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Escherichia coli* (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme	Diametre des zones d'inhibition
Amoxicilline + Acide clavulanique	R	15
Gentamicine	S	24
Acide Nalidixique	S	20
Oxacilline	R	0
Bacitracine	R	0
Spiramicine	R	13
Cefalexine	R	8
Colistine	S	15
Lincomycine	R	0
Cotrimoxazol	S	28
Doxycycline	R	10
Ampicilline	R	12
Neomicyne	S	24

S : Sensible, **R** : Résistante

Tableau 14 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition Pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme	Diametre des zones d'inhibition
Amoxicilline + Acide clavulanique	I	20
Gentamicine	R	0
Acide Nalidixique	R	0
Oxacilline	R	0
Bacitracine	R	0
Spiramicine	R	0
Cefalexine	R	0
Colistine	S	16
Lincomycine	R	0
Cotrimoxazol	R	0
Doxycycline	R	0
Ampicilline	R	0
Neomicyne	S	13

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

Tableau 15 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13047 (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme	Diametre des zones d'inhibition
Amoxicilline + Acide clavulanique	R	10
Gentamicine	S	16
Acide Nalidixique	R	12
Oxacilline	R	0
Bacitracine	R	0
Spiramicine	R	10
Cefalexine	R	0
Colistine	S	17
Lincomycine	R	0
Cotrimoxazol	S	21
Doxycycline	R	0
Ampicilline	R	0
Neomicyne	R	21

S : Sensible, **R** : Résistant.

Tableau 16 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* ATCC6538 (CASFM, 2012).

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme	Diametre des zones d'inhibition
Amoxicilline + Acide clavulanique	R	12
Gentamicine	S	30
Acide Nalidixique	S	21
Oxacilline	R	0
Bacitracine	R	0
Spiramicine	R	13
Cefalexine	I	13
Colistine	S	17
Lincomycine	R	0
Cotrimoxazol	S	31
Doxycycline	I	11
Ampicilline	R	16
Neomicyne	R	27

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

Tableau 17 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Listeria monocytogenes*

ATCC15313.

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme	Diametre des zones d'inhibition
Amoxicilline + Acide clavulanique	R	0
Gentamicine	S	20
Acide Nalidixique	R	0
Oxacilline	R	0
Bacitracine	R	0
Spiramicine	R	0
Cefalexine	R	0
Colistine	S	16
Lincomycine	R	0
Cotrimoxazol	R	0
Doxycycline	-	-
Ampicilline	R	0
Neomicyne	I	11

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

Tableau 15 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Micrococcus luteus* ATCC 13047.

Antibiotique	Lecture de l'antibiogramme	Diametre des zones d'inhibition
Amoxicilline + Acide clavulanique	I	18
Gentamicine	S	27
Acide Nalidixique	R	0
Oxacilline	R	0
Bacitracine	R	0
Spiramicine	R	17
Cefalexine	R	11
Colistine	S	17
Lincomycine	R	0
Cotrimoxazol	S	33
Doxycycline	I	13
Ampicilline	R	16
Neomicyne	R	25

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

Tableau 16 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits algaux exprimés en diamètres des zones d'inhibition (mm).

	DMSO	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Flavonoïdes
Volume (µl)	10	10	10	10
bactéries				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Esherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	7 ± 0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	8 ± 0.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-

(-) : pas d'inhibition.