

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement « LAMAABE »

THESE

Présentée par M^{me}TOUAMI Chafika née BELLAHSENE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Microbiologie Appliquée

Examen phytochimique et Pouvoir antimicrobien et anti-radicalaire des extraits de *Nepeta amethystina* (Gouzia) de la région d'Aïn Sefra (Algérie)

Soutenue le 31/01/2017 Devant le jury :

Président	Djaziri R.	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	Abdelouahid D.E.	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	Kahloula K.	Dr Maître de conférences A	U. de Saida
Examineur	Benmehdi H.	Dr Maître de conférences A	U. de Bechar
Directeur de thèse	Bendahou M.	Professeur	U. de Tlemcen

Année universitaire : 2016-2017

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement «
LAMAABE »

THESE

Présentée par M^{me} TOUAMI Chafika née BELLAHSENE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Microbiologie Appliquée

**Examen phytochimique et Pouvoir antimicrobien et anti-radicalaire des
extraits de *Nepeta amethystina* (Gouzia) de la région d'Aïn Sefra (Algérie)**

Soutenue le 31/01/2017 Devant le jury

Président	Djaziri R.	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	Abdelouahid D.E.	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	Kahloula K.	Dr Maître de conférences A	U. de Saida
Examineur	Benmehdi H.	Dr Maître de conférences A	U. de Bechar
Directeur de thèse	Bendahou M.	Professeur	U. de Tlemcen

Année universitaire : 2016-2017

Dédicace

Je dédie ce travail

*A la mémoire de mon père qu'il repose en paix et à ma mère que dieu la protège.
En témoignage de ma profonde affection, qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien. Je leur suis très reconnaissante, leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.*

A Ahmed mon mari qui a toujours été à mes côtés pour me soutenir, pour m'aider dans la mesure du possible, mais surtout pour donner du goût à ma vie par sa présence malgré les distances.

A mes yeux Wael et Abderrahmane

A mes frères, mes sœurs et mes amies

Remerciements

Je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au **Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire**, au **Biomédical** et à l'**Environnement « LAMAABE »** de la faculté des sciences, Université de Tlemcen, sous la direction de Monsieur **Bendahou Mourad**, Professeur à l'Université de Tlemcen. Je tiens à le remercier particulièrement, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant la direction de ma thèse. Sa pleine disponibilité, son aide permanent, ses précieux conseils et ses connaissances scientifiques, m'ont permis de réaliser ce travail. Je le remercie, également, pour ses grandes qualités humaines et son soutien moral tout au long de ces années. Cela, a été un privilège pour moi de travailler sous sa direction.

Je remercie le professeur **Moussa-Boudjemaa Boumediène** directeur du laboratoire LAMAABE et madame le professeur **Hassaine haféda**, responsable de la formation doctorale «Maitrise du développement microbien» de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire LAMAABE.

J'exprime ma gratitude à Monsieur **Djaziri Rabah**, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

Ma reconnaissance va également à Monsieur **Abdelouahid Djamal Eddine**, Professeur à l'Université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également Mr **Kahloula K.** Maître de conférences à l'université de Saida et Mr **Benmehdi H.** maître de conférences à l'université de Bechar pour m'avoir fait l'honneur d'acceptés d'examiner et de juger cette thèse.

Je remercie l'équipe de chimie des substances naturelles dirigée par le professeur **Jean Costa** de l'université de Corse (France) pour l'analyse de l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat.

Nos remerciements s'adressent également à Mme **Grignon-Dubois M.** directeur de recherche au CNRS, laboratoire PhyValBio, Université de Bordeaux 1– France, pour le fractionnement et les analyses des extraits par CCM, HPLC et RMN.

J'adresse également mes remerciements les plus vifs à Mr **Medjahedi B.** maître de conférences à l'université de Tlemcen, pour son aide à l'identification botanique de l'espèce *Nepeta amethystina*.

Aussi, je voudrais exprimer mes remerciements à tous les Professeurs, Maîtres de Conférences et doctorants du laboratoire LAMAABE pour l'ambiance et leurs soutient tout au long de la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier particulièrement El-hadj Faradji, pour la collecte d'échantillons de *Nepeta* sur les flancs de Djebel Mekhter à Aïn-Esefra.

Je remercie également tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Ce travail est une démarche visant à analyser l'huile essentielle et les flavonoïdes de *Nepeta amethystina*, ainsi que leurs activités antimicrobienne et antiradicalaire.

L'analyse des extraits alcoolique, hydroalcoolique et éthérique a montré que l'espèce *Nepeta amethystina* est riche en huile essentielle, en flavonoïdes et en tanins. Le dosage des polyphénols totaux par le reactif de Folin-Ciocalteu et les flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 ont révélé la richesse de l'extrait aqueux en polyphénols (11,84 mg EAG /gMs) et l'extrait butanolique en flavonoïdes (7,68 mg EQ/g Ms). L'analyse par CPG/SM de l'huile essentielle obtenu par hydrodistillation (0,6%) et l'extrait d'hydrolat (0,39%) obtenu par extraction liquide-liquide a permis l'identification de 34 composés appartenant majoritairement à la classe des monoterpènes oxygénés dont les népétalactones de type trans-cis (72,40% et 49,21% respectivement) sont les plus abondants.

Les analyses par CCM et HPLC ont mis en exergue la présence des terpènes (népétalactones), des acides phénoliques (acides caféique, sirigique, hydroxybenzoïque, p-coumarique, chlorogénique, cinnamique) et des flavonoïdes (cathéchines, quercétine, kampférol). Alors que l'analyse par RMN (^{13}C , ^1H) a révélé la présence des népétalactones, l'acide oléanolique et l'acide 7-déoxyloganique.

Les tests de l'activité antimicrobienne des différents extraits réalisés sur quatorze souches (9 bactéries, 3 candidas et 2 moisissures) ont montré que l'huile essentielle et l'hydrolat sont plus antifongiques qu'antibactériens. Par contre, les deux fractions flavonoïdiques (acétate d'éthyle et 1-butanol) ont inhibé la croissance de *Candida albicans* à l'état biofilm. L'activité antioxydante évaluée par les deux méthodes DPPH et FRAP, a montré que l'hydrolat et les extraits flavonoïdiques sont dotés d'un pouvoir antioxydant intéressant.

Mots clés : *Nepeta amethystina*, Analyses, Criblage phytochimique, Huile essentielle, Flavonoïdes, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante.

Summary

This study is an approach to analyze the essential oil and the flavonoids of *Nepeta amethystina*, as well as their antimicrobial and antioxidant activities.

The analysis of the alcoholic, hydroalcoholic and etheric extract showed that the *Nepeta amethystina* is rich in essential oil, in flavonoids and in tannins. The dosage of the total polyphenols by the reactive of Folin-Ciocalteu and the flavonoids by the method of AlCl₃ revealed the wealth of the aqueous extract in polyphenols (11.84 mg EAG/gMs) and the butanolic extract in flavonoids (7.68 mg EQ/g Ms). The analysis by GPC/ MS of the essential oil obtained by hydrodistillation (0,6 %) and the hydrosol extract obtained by liquid- liquid extraction (0.39 %) allowed the identification of 34 compounds belonging mainly to the class of the oxygenated monoterpenes whose trans-cis type nepetalactones are the major compounds (72.40 % and 49.21 % respectively).

The analysis by TLC and HPLC highlighted the presence of terpenes (nepetalactones), phenolic acids (caffeic acid, syringic, hydroxybenzoic, p-coumaric, chlorogenic, cinnamic) and flavonoids (catechins, quercetin, kaempferol). While, the analysis by NMR (¹³C, ¹H) revealed the presence of nepetalactones, oleanolic acid and the 7-déoxyloganic acid.

The tests of the antimicrobial activity of the various extracts realized on fourteen strains (9 bacteria, 3 candidas and 2 molds) showed that the essential oil and the extract of hydrolat are more active on fungi than on bacteria. On the other hand, both flavonoidic fractions (ethyl acetate and 1-butanol) inhibited the formation of *Candida albicans* biofilm. The antioxidant activity estimated by two methods (DPPH and FRAP) showed that the hydrosol and the flavonoids extracts revealed an interesting antioxidant power.

Keywords: *Nepeta amethystina*, Analysis, Phytochemical screening, Essential oil, Flavonoids, Antimicrobial activity, Antioxidant activity.

ملخص

Nepeta

هذا البحث يهدف الى التحليل لزييت الطيار و الفلافونويدات المستخلصة من

amethystina بالاضافة لدراسة مفعولهم كمضادين للاكسدة و الميكروبات .

دراسة المستخلصات الكحولية، المائية و الاثيرية أظهرت بان هذا النبات غنية بالزييت الطيار، فلافونويدات تاتينات امامعايرة البوليفينوليكاشف Folin-ciocalteu و الفلافونويدات بطريقة ثلاثي كلوريد الالمنيوم أظهرت بان المحلول المائي غني بالفلافونويد و خلاصة بيوتانول غنية بالفلافونويد. تحليل لزييت الطيار و الهيدرولا المتحصل عليهما بمردود 0,6% و 0,39% على التوالي باستعمال تقنية الكروماتوغرافيا أظهر وجود 34 مركب الأكثر تواجدا من بينها المونوتاربانات و خاصة النيبيتالكتونات بنسب 72,4% و 49,21% .

مكننا التحليل الكروماتوغرافي من تحديد تواجد التاربينات و خاصة النيبيتالكتونات بالاضافة الى الاحماض الفينولية (acides caféique, sirringique, 2-hydroxybenzoïque, p-coumarique, chlorogénique, cinnamique)

و الفلافونويدات (cathéchines, quèrcétine, kampférol) و تحاليل (^{13}C , ^1H) RMN اظهرت تواجد النيبيتالكتونات، حمض الاوليبيانوليك و حمض 7 دي اوكسيلو غانيك .

اختبار النشاط المضاد للميكروبات (9 بكتيريا و 3 خمائر من نوع *Candida albicans* و نوعين من الفطريات) اظهر بان الزيت الطيار و الهيدرولا يتمتعان بقوة مضادة للجراثيم و مستخلص الفلافونويد يمنع نمو بيوفيلم الخاص ب *Candida albican* اما دراسة مقدرة المستخلصات كمضادات للاكسدة باستعمال طريقتي DPPH و FRAP بينت فعالية كل من الهيدرولا و الفلافونويدات .

الكلمات المفتاحية *Nepeta amethystina*: تحاليل ، فحص كيميائي نباتي ، زيت عطري ، فلافونويد ، القدرة المضادة للاكسدة ، النشاط المضاد للمكروبات .

Table des matières

Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Présentation de <i>Nepeta amethystina</i>	3
I.1. Généralités sur le genre <i>Nepeta</i>	3
I.2. Description botanique de <i>Nepeta amethystina</i>	3
I.3. Classification	4
I.4. Utilisation traditionnelle	4
I.5. Travaux chimiques antérieurs	4
I.6. Propriétés bio-pharmacologiques	8
Chapitre II: Donnés biochimiques et pharmacologique des métabolites secondaires	8
II.1. Définition.....	8
II.2. Synthèse, distribution et rôles	9
II.3. Les huiles essentielles.....	9
II.3.1. Définition.....	9
II.3.2. Composition chimique	10
II.3.3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	10
II.3.4. Activités biologiques et pharmacologiques.....	10
II.3.5. Domaines d'utilisation	11
II.4. Les hydrolats	12
II.4.1. Définition.....	12
II.4.2. Composition.....	12
II.4.3. Activités biologiques et pharmacologiques.....	12
II.5. Les polyphénols.....	13
II.5.1. Définition	13
II.5.2. Classification des composés phénoliques	14

II.5.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques des polyphénols.....	17
Chapitre III : Activité antibiofilms des métabolites secondaires	19
III.1. Généralités sur le biofilm	19
III.2. Résistance des biofilms aux antifongiques.....	20
III.3. Effets connus des métabolites secondaires sur le biofilm.....	21
Chapitre IV: Pouvoir anti-radicalaire	22
IV.1. Origine du stress oxydatif	22
IV.2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques	23
IV.3. Les antioxydants	24
IV.3.1. Classification des antioxydants	25
IV.3.2. Mécanisme d'action des antioxydants.....	26
Partie II :Materiel et méthodes	
Chapitre I :Matériel végétal	28
I.1. Origine du matériel végétal.....	28
I.2.Traitement du matériel végétal.....	29
I.3. Enquête ethnopharmacologique.....	29
I.4. Criblage phytochimique	30
I.4.1. Extraction	30
I.4.2. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud	30
I.4.3. Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol.....	31
I.4.4. Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique.....	34
I.5. Extractions sélectives.....	34
I.5.1. Procédé d'obtention de l'huile essentielle	34
I.5.2. Procédé d'extraction de l'hydrolat.....	35
I.5.3. Obtention des flavonoïdes totaux	35
I.5.4. Extraction liquide-liquide et fractionnement sur colonne.....	37
I.5.4.1. Extraction liquide-liquide.....	37
I.5.4.2. Fractionnement par colonne ouverte.....	37

I.5. Dosages et analyses chromatographiques.....	37
I.5.1. Rendements en huile essentielle et en extrait d'hydrolat.....	37
I.5.2. Dosage des composés phénoliques.....	38
I.5.2.1. Dosage des polyphénols totaux	38
I.5.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux	38
I.5.3. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	39
I.5.4. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat par CPG /Ir et CPG/SM	40
I.5.5. Analyse des flavonoïdes par HPLC.....	40
I.5.6. Analyse par RMN.....	41
<u>Chapitre II : Matériel microbien</u>	41
II.1. Les souches testées.....	41
II.2. Conservation des souches.....	42
II.3. Préparation des précultures.....	42
II.4. Etude de l'activité antimicrobienne.....	42
II.4.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme).....	42
II.4.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide.....	43
II.4.3. Essai anti-moisissure.....	43
II.4.4. Activité antibiofilm	43
II.4.4.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de biofilm (CMIB)	43
II.4.4.2. Détermination des concentrations minimales éradicatrices de biofilm (CMEB) ...	44
<u>Chapitre III : Pouvoir anti-radicalaire</u>	44
III.1. Méthode de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	44
III.2. Détermination du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	45
IV. Etude statistique	46

Partie III : Résultats et discussion

3.1. Résultats de l'enquête ethnopharmacologique.....	47
3.2. Criblage phytochimique	47
3.2. Rendements des extraits bruts	48
3.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques.....	49
3.3.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux	49
3.3.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux	50
3.4. Résultats du fractionnement par colonne et analyse par CCM.....	53
3.5. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat par CPG et CPG/SM.....	57
3.6. Analyse des fractions par RMN.....	60
3.7. Analyse par HPLC	61
4. Evaluation <i>in vitro</i> des activités biologiques	
4.1. Etude de l'activité antimicrobienne.....	65
4.1.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme).....	65
4.1.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide.....	68
4.1.3. Essai anti-moisissure.....	70
4.1.4. Activité antibiofilm.....	71
4.2. Etude du pouvoir anti-radicalaire.....	72
4.2.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	72
4.2.2. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	75
Conclusion	79
Références bibliographiques.....	81
Annexes	

Listes des figures

Figure 1a: Photographie de <i>N. amethystina</i>	3
Figure 1b: <i>N. amethystina</i>	3
Figure 2 : Structure chimique de Nepetalactone.....	4
Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes.....	14
Figure 4: Structures des squelettes de base des flavonoïdes.....	14
Figure 5 : Structures des tannins hydrolysables et des acides associés.....	16
Figure 6 : Structures de tannins condensés.....	16
Figure 7 : Principales étapes de la formation d'un biofilm de <i>C .albicans</i>	20
Figure 8 : Situation géographique de station de collecte	28
Figure 9 : <i>N. amethystina</i> (tiges, feuilles) (Photos prises à Djebel Mekhter en juin 2011.....	29
Figure 10 : Appareil d'extraction sous reflux.....	30
Figure 11 : Photo d'un montage d'hydrodistillation type Clevenger	35
Figure 12 : Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	36
Figure 13: Rendements (%) des extraits bruts de <i>N. amethystina</i>	48
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux..	49
Figure15: Teneur en polyphénols totaux (exprimée en mg EAG/g Ms).....	50
Figure 16: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	51
Figure 17: Teneur en flavonoïdes (mg EC/g Ms).....	51
Figure 18 : Protocole de fractionnement de l'extrait éthanolique par colonne SiO ₂	53
Figure19: Rendements (%) du fractionnement sur colonne SiO ₂ Flash de l'extrait éthanolique de la partie aérienne (tiges, feuilles) de <i>N. amethystina</i>	54
Figure 20: Composés volatiles de la partie aérienne de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de <i>Nepeta Amethystina</i>	59
Figure 21 : Principaux produits identifiés par la RMN ¹ H et ¹³ C.....	60
Figure 22 : Chromatogramme HPLC de l'extrait au méthanol de la partie aérienne (feuilles, tiges) de <i>N. amethystina</i>	61

Figure 23: Chromatogramme HPLC de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la partie aérienne (feuilles, tiges) de <i>N. amethystina</i>	62
Figure 24 : Chromatogramme HPLC de l'extrait au 1-ButOH de la partie aérienne (feuilles, tiges) de <i>N. amethystina</i>	62
Figure 25: Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérés comme sites d'action pour les composés naturels.....	68
Figure 26: Photo de l'Influence de la concentration d'HE sur l'intensité de la couleur du DPPH.....	73
Figure 27: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations d'HE et de l'HY par rapport à l'acide ascorbique et BHT.....	73
Figure 28: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits (H ₂ O, EtOH, Et ₂ O).....	73
Figure 29: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations des fractions flavonoïdiques (brut ; EtoAc ; 1-ButOH).....	74
Figure 30a : Résultats du pouvoir réducteur de l'ion ferrique par le BHT, l'HE et l'HY de <i>N. amethystina</i>	76
Figure 30b: Résultats du pouvoir réducteur de l'ion ferrique par les extraits (H ₂ O, EtOH, Et ₂ O, MeOH, AcoEt, 1-ButOH) de <i>Nepeta amethystina</i>	77

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique des principaux composés d'huile essentielle de <i>N. amethystina</i> d'Espagne	7
Tableau 2 : Situations géographiques et étage bioclimatique de la station de récolte.....	29
Tableau 3 : les différentes souches microbiennes testées.....	41
Tableau 4 : Résultats des tests chimiques des extraits de <i>Nepeta amethystina</i>	47
Tableau 5 : Rendements et caractéristiques des extraits bruts de <i>N. amethystina</i>	48
Tableau 6 : Chromatographie sur couche mince des extraits bruts et des fractions de <i>N. amethystina</i>	55
Tableau 7: Composition chimique de l'huile essentielle (HE) et de l'extrait d'hydrolat (HY) de <i>Nepeta amethystina</i> récoltée à Aïn Sefra.....	57
Tableau 8 : Teneurs relatives des népétalactones d'huiles essentielles des travaux antérieurs.....	59
Tableau 09 : Temps de rétention des flavonoïdes standards.....	63
Tableau 10: Temps de rétention des flavonoïdes présents dans les extraits de <i>N.amethystina</i>	63
Tableau 11 : Résultats de l'activité antimicrobienne de <i>Nepeta amethystina</i> par la méthode de contact directe exprimés par le diamètre de zones d'inhibition (mm).....	66
Tableau 12 : Résultats de l'activité antibactérienne et anti-levure des extraits de <i>N. amethystina</i> exprimés par CMI (mg/mL).....	69
Tableau 13: Effets des extraits (HE, HY, H ₂ O, MeOH) de <i>N. amethystina</i> sur la croissance des hyphes <i>Aspergillus flavus</i> et <i>C. herbarum</i>	70
Tableau 14 : Effet des extraits (HE, HY, AcoEt, 1-ButOH) de <i>N. amethystina</i> vis-à-vis <i>Candida albicans</i> en état du biofilm, exprimée par les concentrations minimales inhibitrices (CMIB) et éradicatrices (CMEB) du biofilm (mg/ml).....	71
Tableau 15: Valeurs des IC ₅₀ des extraits de <i>N. amethystina</i>	74

Liste des abréviations

% : Pourcentage

μL : microlitre

°C : Degré Celsius

BHT : Butyhydroxytoluène

CCM : Chromatographie sur couche mince

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

DO : Densité optique

HE : Huile essentielle

HY : hydrolat

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

mg EC/g Ms : mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche

ml : millilitre

nm : nanomètre

RMN : Résonance magnétique nucléaire

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra-violet

Introduction

L'homme utilise depuis des millénaires des plantes médicinales pour se faire soigner. Si les médicaments (synthétiques) ont remplacé largement les plantes, il en demeure que plus de la moitié de la population mondiale (en particulier la population africaine) continue à utiliser ces plantes. L'activité grandissante des boutiques parapharmaceutiques en est une preuve. Pourquoi ce retour à la médecine traditionnelle et pourquoi cet intérêt scientifique pour les plantes ?

Le retour de la population à la médecine verte est dû à diverses raisons comme le coût relativement faible des plantes par rapport aux médicaments conventionnels, la disponibilité des plantes surtout dans les régions les plus éloignées et au sein des populations les moins favorisées, l'envie de consommer « bio » et ces effets bénéfiques sur la santé. Pour les scientifiques, cet intérêt est dû principalement à : (i) l'existence de maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement pharmaceutique efficace, (ii) la confirmation en laboratoire de l'efficacité et de l'innocuité d'un nombre de plus en plus important de plantes médicinales, (iii) l'échange culturel avec des cultures étrangères, notamment d'autres systèmes de traitements par les produits naturels.

Aujourd'hui, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes aromatiques et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis en faveur de l'industrie agroalimentaire (additifs, colorants, arômes, agents de conservation) et pharmaceutique. Parmi les composés, on peut citer les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

Cependant, la difficulté majeure reste l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques, la caractérisation de leur cible biologique, l'évaluation de leur innocuité et la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels elles agissent. D'où l'intérêt des études de criblage des plantes médicinales dans une perspective d'identification de nouvelles drogues. Il est important de souligner que la maîtrise des méthodes d'extraction, de criblage et d'évaluation de l'activité *in vitro* et *in vivo* de ces plantes et de leurs dérivés pourrait conduire à l'isolement de nouvelles molécules thérapeutiques et/ou à la reconnaissance de la valeur thérapeutique des plantes utilisées traditionnellement en médecine alternative.

Dans l'axe de recherche et de valorisation des substances de la flore aromatique et médicinale de l'ouest Algérien, nous avons choisis d'étudier le pouvoir antimicrobien et antiradicalaire des extraits de *Nepeta amethystina*, une plante de la famille des Labiées, poussant à l'état spontané dans la région d'Ain-Sefra.

Le choix de cette plante a été justifié par les indications d'usage traditionnel et par le manque de travaux sur cette plante.

Les principaux objectifs de ce travail sont (i) la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle, de l'hydrolat et des flavonoïdes de *Nepeta amethystina*, (ii) évaluation du pouvoir antimicrobien et antiradicalaire des différents extraits.

Dans la **première partie** de ce manuscrit, nous avons commencé par une étude bibliographique qui comporte trois chapitres.

➤ Dans le premier chapitre, nous avons présenté *Nepeta amethystina* (description botanique, systématique, propriétés thérapeutiques et travaux antérieurs).

➤ Dans le deuxième chapitre, nous avons évoqué la biochimie et la bio-pharmacologie des métabolites secondaires étudiés.

➤ Le troisième chapitre a porté sur le pouvoir antibiofilm des métabolites secondaires.

Dans la **deuxième partie**, nous avons rapporté le travail expérimental (récolte du matériel végétal, obtention des extraits de *Nepeta amethystina*, criblage phytochimique, analyse de la composition chimique des extraits, étude du pouvoir antimicrobien et antiradicalaire des extraits).

Dans la **troisième partie**, nous avons présenté les résultats obtenus et discussion suivie d'une conclusion générale.

1^{ere} partie:

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Présentation de *Nepeta amethystina*

I.1. Généralités sur le genre *Nepeta*

Le genre *Nepeta* de la famille des Labiées regroupe 280 espèces, réparties principalement en Europe, en Asie et en Afrique (Davis, 1982 ; Mabberly, 1997). Ce sont des plantes herbacées généralement vivaces, originaires des montagnes méditerranéennes (Boucher, 2000). 7% des espèces sont localisés dans la Péninsule ibérique et en Afrique du Nord (Saez *et al.*, 1985). D'après Quezel et Santa (1963), six espèces existent en Algérie à savoir *N. nepetella*, *N. amethystina*, *N. tuberosa*, *N. apulei*, *N. multibracteata* et *N. algeriensis*.

L'espèce *Nepeta amethystina* est rencontrée particulièrement dans l'Atlas saharien en petites populations et est connue sous le nom vulgaire Gouzia (Quezel et Santa, 1963). Selon Uberta et Valdés (1983) *N. amethystina* existe sous deux variétés : *Nepeta amethystina* Poir. subsp. *amethystina* et *Nepeta amethystina* Poir. subsp. *laciniata* (Willk.). Son odeur rappelle celle de *N. cataria* (l'herbe aux chats) et *Teucrium marum* (Beaupin *et al.*, 1977 ; Beaupin, 1978).

I.2. Description botanique de *Nepeta amethystina*

C'est un sous arbrisseau odorant, vivace de 20 à 50 cm d'hauteur, qui fleurit de Juin à Août. Tiges rameuses quadrangulaires, à feuilles opposées et à fleurs bleues en cymes. Calice à 5 dent et fruits à 4 akènes soudés. Corolle irrégulière, bilabée à 4 étamines inférieures plus courtes que les supérieures. Bractées florales très petites, inflorescences très lâches, plante grisâtre à feuilles lancéolées et crénelées. (Valdeset *al.*, 1987) (fig. 1a et 1b).



Figure 1a: Photographie de *N. amethystina*

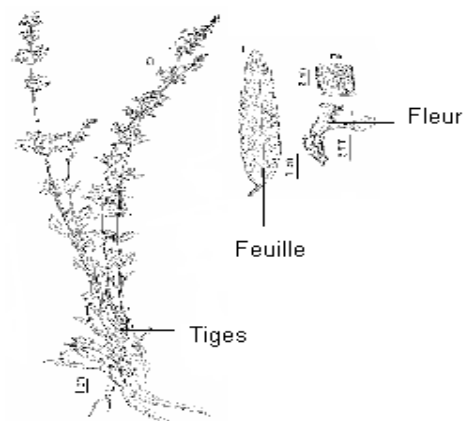


Figure 1b: *N. amethystina* (Valdeset *al.*, 1987)

I.3. Classification

Selon **Cantino et al (1992)**, **Ubera et Valdes (1983)** et **Valdes et al (1987)** *Nepeta amethystina* est classé comme suit :

Embranchement	Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Gamopétales
Ordre	Tubiflorales
Famille	Labiées
Sous famille	Nepetoide
Genre	<i>Nepeta</i>
Espèce	<i>Nepeta amethystina</i> Poir.

I.4. Utilisation traditionnelle

Les espèces du genre *Nepeta* sont utilisées comme fortifiant, diurétique, diaphorétique, antispasmodique, antiasthmatique, ainsi que contre les bactéries, les champignons, les virus et les insectes (**Usher, 1984 ; Gkinis et al., 2003**).

I.5. Travaux chimiques antérieurs

Le genre *Nepeta* a été investigué par plusieurs chercheurs notamment pour la mise en évidence d'une famille particulière de terpènes méthylcyclopentaniques : les iridoïdes connus sous le nom de népétalactones (**fig.2**). Ces derniers présentent des propriétés intéressantes : anti-inflammatoires, insecticides, psychotropes pour les félidés et anti-microbiens (**Plouvier et Fabre-Bonvin, 1971; Teisseire, 1991; Gkinis et al., 2003**). Plusieurs chercheurs se sont intéressés à la synthèse de ces produits (**Eisenbraun et al., 1981**) et sur les voies de biosynthèse empruntées par le métabolisme secondaire de la plante (**Bellesia et al., 1984 ; Hallahan et al., 1994**).

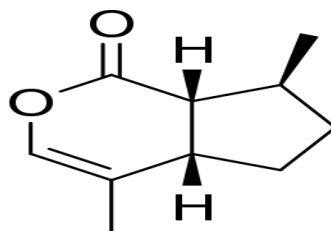


Figure 2 : Structure chimique de Népétalactone (**Bates et Sigel ,1963**).

Les iridoïdes népétalactones sont identifiées dans presque toutes les HEs des espèces de *Nepeta*. Par contre, certaines HE sont plutôt riches en 1,8 cinéole et dépourvues de népétalactones (*N. italica*⁽¹⁾, *N. sulfuriflora*⁽¹⁾, *N. denudata*⁽²⁾, *N. ispahanica*⁽³⁾, *N. royleana*⁽⁴⁾) et/ou sont présentes en quantité faible (*N. nuda*⁽⁵⁾, *N. binaludensis*⁽³⁾, *N. crispa*⁽⁶⁾). Hormis les népétalactones, les huiles essentielles du genre *Nepeta* contiennent d'autres constituants en proportions variables comme le α -pinène (*N. glomerulosa*⁽⁷⁾, *N. discolor*⁽⁴⁾), β -pinène (*N. cephalotes*⁽²⁾), linalol (*N. spicata*⁽⁸⁾, *N. flavida*⁽⁹⁾, *N. betonicifolia*^(10a), *N. satureioides*⁽¹¹⁾), citronellol (*N. cataria*⁽¹²⁾), nérol (*N. cataria*⁽¹²⁾, *N. floccosa*⁽⁴⁾), Terpinen-4-ol (*N. asterotrachus*⁽¹³⁾), géraniol (*N. cataria*⁽¹²⁾), géraniol (*N. floccosa*⁽⁴⁾), α -Terpinéol (*N. viscida*⁽¹⁴⁾), Thymol (*N. botryodes*⁽¹⁵⁾), β -caryophyllène (*N. curviflora*⁽¹⁶⁾), Oxyde caryophyllène (*N. cilicia*⁽¹⁷⁾, *N. betonicifolia*⁽¹⁸⁾), nerolidol (*N. nuda*⁽⁵⁾), D-germacrène (*N. ucrainica*⁽¹⁹⁾), spathulenol (*N. depauperata*⁽²⁰⁾), pregeijerene (*N. govaniiana*⁽²¹⁾).

Eisenbraun et son équipe isolent en **1980** l'acide népétalique caractérisé par rayons X et RMN. Une étude réalisée sur *N. cataria* par **Tagawa et Murai (1983)** a abouti à l'isolement d'un ester népétaglucosyl : l'acide 5-épéoxyloganique. **Zapesochaya et al. (1991)** ont isolé un nouveau glycoside iridoïde chez *N. velutina* : vilpetin alors que **Bottini et al. (1992)** ont isolés de nouveaux dérivés d'iridodial de *N. leucophylla* : acétate d'iridodial α -monoénol, dihydroiridodial diacétate) et iridodial diénol diacétate. Dans la même année trois nouveaux iridoïdes sont isolés : un iridodial β -monoénol acétate, de *N. leucophylla*, actinidine de *N. clarkei* et le népétacilicioside de *N. cilicia* (**Saxena et Mathela, 1996; Takeda et al., 1996**). Une recherche phytochimique sur *N. grandiflora* réalisée par **Nagy et al (1998)** a révélée la présence de 4 nouveaux iridoïdes glucosides: Acide 6'-O-acetoacetyl-, 2'-O-méthyl-, 4'-O-méthyl- et 6'-O-méthyl-1,5,9-épéoxyloganique. 2 nouveaux iridoïdes glucosides sont isolés de *N. racemosa* (**Takeda et al., 1999**) : nepetaracémose.

⁽¹⁾ Kökdil et al., 1997a; Baser et al., 1998a ; ⁽²⁾ Rustaiyan et al., 2000 ; ⁽³⁾ Rustaiyan et Nadjji, 1999 ; ⁽⁴⁾ Thappa et al., 2001; Kashyap et al., 2003 ; ⁽⁵⁾ Pavlovic et al., 1985 ; Kökdil et al., 1998 ; ⁽⁶⁾ Sefidkon et al., 2006 ; ⁽⁷⁾ Sajjadi et Ghassemi, 1999 ; ⁽⁸⁾ Bisht et al., 1997 ; ⁽⁹⁾ Baser et al., 1998b ; ^(10a) Senatore et Ozcan, 2003; ⁽¹⁰⁾ Tumen et al., 1999 ; Sefidkon et al., 2006 ; ⁽¹¹⁾ Hadian et al., 2006 ; ⁽¹²⁾ Holubek et Kroulik, 1957 ; Zamurenko et al., 1984 ; Timchuk, 1981; Malizia et al., 1996 ; Chalchat et Lamy, 1997; Klimek et al., 2004 ; ⁽¹³⁾ Rustaiyan et al., 1999 ; ⁽¹⁴⁾ Baser et al., 1995 ; ⁽¹⁵⁾ Pigulevskii et Chistova, 1935 ; ⁽¹⁶⁾ Senatore et al., 2005 ; ⁽¹⁷⁾ Kökdil et al., 1997b ; ⁽¹⁸⁾ Baser et al., 2001 ; ⁽¹⁹⁾ Javidnia et al., 2005 ; ⁽²⁰⁾ Mehrabani et al., 2004 ; ⁽²¹⁾ Kashyap et al., 2003 ; ⁽²¹⁾ Senatore et Ozcan, 2003.

D'autres terpènes furent isolés du genre *Népéta* comme du β -sitosterol de *N. nuda* (Kudrzycka-Bieloszabska, 1976), de la *népétidine* et du néphinal de *N. hindostana* (Ahmad et al., 1982). Les acides ursolique et oléanolique sont isolés chez *N. glechoma*, *N. leucophylla* et *N. sibthorpii* (Mishurova et al., 1981; Pandey et al., 2003).

En 2008, Zenasni et ses collaborateurs ont montré que les huiles essentielles de *Nepeta* d'origine marocaines à savoir, *Nepeta atlantica*, *Nepeta tuberosa*, *Nepeta cataria* et *Nepeta granatensis*, sont riches en 4 α - α , 7- α , 7 α - β -nepetalactone.

Les polyphénols constituent le deuxième groupe des métabolites secondaires mis en évidence chez *Népéta*. Bermejo Benito et Serranillos (1984) identifient 3 flavonoïdes, 6-hydroxyluteoline, dimatin et 7-4'-O-dimethylscutellareine. Durant la même année, Pervykh et al. (1984) isolent pour la première fois de l'apigénénine, lutéoline, et la cosmosiine de *N. velutina*. En faisant une étude comparative des phénoliques entre les feuilles/fleurs d'une part et les tiges/racines d'autre part de *Nepeta nepetella cordifolia*, Saez et al. (1985, 1986) ont trouvé que la quantité en phénols est beaucoup plus importante dans les feuilles/fleurs que les tiges et les racines ; en plus ils montrent par CCM la présence dans les feuilles/fleurs de l'acide férulique, p-coumarique, p-hydroxybenzoïque, vanilique sous forme libre et glycosylés, alors que dans les tiges et racines, tous les phénols existent sous forme de glycosides d'acide férulique, syringique, p-hydroxybenzoïque, vanilique et cis-trans-p-coumarique.

Tomas-Barberan et al. (1992) ont réussi d'isoler des aglycones flavones chez deux cultivars de *N. transcaucasica* : cirsimaritin, xanthomicrol, salvigénine, B-gradenine, apigénine, genkwanine, lutéoline, 7-apigénine-glucosides. D'autres dérivés phénoliques sont mis en évidence comme l'acide cafféoyl-tartronique chez *N. cataria* (Snook et al., 1993) et le 7-O-méthylapigénine chez *N. septemcrenata* (Khalil et al., 1997).

Des travaux effectués sur *N. prattii* ont permis d'isoler 3 nouveaux phénols : 2-(glycer-2-yl)-5-(2-hydroxyethyl) phenyl-O- β -D-glucopyranoside, 2-(glycer-2-yl)-5-(2-hydroxyethyl) phenyl-O- β -D-galactopyranoside 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactate (Hou et al., 2002).

L'extraction par MeOH de *N. sibthorpii* a permis d'isoler des polyphénols dont l'analyse par HPLC montre de l'acide chlorogénique (0,315 mg) et des flavonoïdes : rutine (0,091 mg/g), lutéoline-7-O-glucoside (0,387 mg/g) et des dérivés de lutéoline (Miceli et al., 2005).

Seladji et al. (2014) ont rapporté chez *N. nepetellala* présence des flavonoïdes, des sucres, des saponines, de l'huile essentielle et des tanins dans la partie aérienne de cette plante.

Une recherche bibliographique exhaustive a montré que l'espèce *N. amethystina* n'a pratiquement pas été étudiée de point de vue chimique et activité biologique. Le seul travail recensé est celui de Velasco-Negueruela et al. (1989) (tableau 1) qui ont montré que l'huile essentielle de *Nepeta amethystina* contient comme produits majoritaires : 4 α -7 α -7 α -nepetalactone (41,88%) et 4 α -7 α -7 β -nepetalactone (39,42%).

Tableau 2: Composition chimique des principaux composés d'huile essentielle de *N. amethystina* d'Espagne (Velasco-Negueruela et al., 1989).

Composé identifiés	Teneur (%)
Myrcène	0.26
p-Cymmène	0.28
1.8 Cinéol + Limoène	1.11
Cis β -Ocimène	0.82
Trans β -Ocimène	0.73
Cis oxyde de linalyl	0.13
Linalol	0.78
Néo-allocimène	0.20
p-Cymène-8-ol	0.41
Aldehyde NI	5.30
t-carvéol	0.1
Géraniol	0.15
4 β -7 α -7 α -nepetalactone	Tr
4α-7α-7α-nepetalactone	41.88
4α-7α-7β-nepetalactone	39.42
4 β -7 α -7 β -nepetalactone	1.01
β -Boubonène	0.72
β -Elemène	0.52
β -Caryophyllène	0.63
α -Humulène	0.82
δ -Cadinène + acide népétalique	0.2
Oxyde de caryophyllène	1.82
Oxyde de humulène	0.34
α -Cadinol	0.19

I.6. Propriétés bio-pharmacologiques

Les huiles essentielles des espèces de *Nepeta* possèdent un pouvoir antimicrobien *vis-a-vis* des bactéries, des moisissures (**Sharma et Goutam, 1977; Sonboli et al., 2004**), de *Helicobacter pylori* (**Kalpoutzakis et al., 2001**). *P. aeruginosa*, l'espèce la plus résistante s'est montré sensible à l'huile de *N. persica* (**Javidnia et al., 2002**). **Abad et al., (2000)**, ont montré une nette activité d'un extrait aqueux contre les virus HSV-1 et VSV.

Sur les insectes et particulièrement sur les moustiques, les HE de *Nepeta* ont un effet significatif de répulsion (**Gkinis et al., 2003**) alors que les félidés sont attirés (**Bicchi, 1984**).

Des tests d'évaluation toxicologiques réalisés par **Harney et al.(1978)** de l'HE brute, de népétalactones et d'acide népétalique sur des souris ont révélé une DL₅₀ de 1300, 1050 et 1550 mg/kg respectivement, alors que l'huile à 500 mg/kg et la népétalactone à 62,5 mg/kg ont provoqué un endormissement plus rapide chez la souris que l'hexobarbitale.

L'HE de *N. caesarea* riche en 4 α ,7 α ,7 α -nepetalactone, possède un effet analgésique significatif en agissant sur les récepteurs opoïdes (**Aydin et al., 1998**). **Grayer et al. (2003)** ont montré que la népétoldine B est plus antioxydante que l'acide gallique, rosmarinique et caféique par rapport à la népétoldine A. quant à l'acide ursolique, il a un effet scavenging des radicaux libres (**Miceli et al., 2005**).

Chapitre II : Données biochimiques et pharmacologique des métabolites secondaires

II.1. Définition

On désigne par « métabolite secondaire » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante. (**Kossel, 1891**) qu'il introduisit par opposition à celui de métabolites primaires. Ces derniers étant directement impliqués dans les grandes voies du métabolisme basal de la cellule. Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimiques tel que les polyphénols, les terpènes et stéroïdes, les alcaloïdes, les polycétides, etc. Outre la très grande diversité chimique qu'ils représentent, ces métabolites secondaires se caractérisent généralement par de faibles concentrations dans les tissus végétaux (généralement quelques pourcents du carbone total, si on exclue la lignine de cette catégorie) ainsi que par leur stockage souvent réalisé dans des cellules ou organes dédiés (**Bourgaud et al., 2001**).

II.2. Synthèse, distribution et rôles :

Les métabolites secondaires ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais sont synthétisés à partir des métabolites primaires et résultent de réactions chimiques ultérieures. (Croteau *et al.*, 2000 ; Raven *et al.*, 2000).

Les métabolites secondaires sont souvent synthétisés dans une partie de la plante et stockés dans une autre (Raven *et al.*, 2000). Avec une structure chimique parfois complexe, ils sont très différents selon les espèces et s'accablent le plus souvent en faible quantité. Ces molécules bioactives sont produites à différents endroits de la cellule dans des parties spécifiques de la plante en fonction du stade de développement (par exemple durant le développement de la plantule, de la fleur, du fruit, de la graine, ou de la racine). De façon générale, le rôle du métabolite secondaire est en lien avec sa localisation au sein de la plante (Pathak *et al.*, 1962)

II.3. Les huiles essentielles

II.3.1. Définition

Ce sont des substances volatiles et odorantes obtenues des végétaux par entraînement à la vapeur d'eau. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire (Sanon *et al.*, 2002). Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétale (Padrini et Lucheroni, 1996).

II.3.2. Composition chimique

Les huiles essentielles ont une composition assez complexe. On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C₅) et comprennent les monoterpènes en (C₁₀), les sesquiterpènes (C₁₅), les diterpènes (C₂₀) et les triterpènes en (C₃₀). Ils ont la même origine métabolique. Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. En général, une HE est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Parmi ces composés oxygénés, on peut noter la présence d'alcools, d'esters, d'aldéhydes, de cétones, d'éther-oxydes et de carbures.

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques (exemple

: Thymus à thymol, géraniol, carvacrol et à linalol) (**Cosentino et al., 1999**), et parmi les nombreux constituants d'une HE, l'un domine généralement ; On l'appelle composé majoritaire.

La composition chimique des HE varie encore de façon appréciable avec le milieu et la période de la végétation. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation (**Jou et al., 1997 ; De Buochberg et al., 1976**).

II.3.3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HEs de cannelle, de girofle et de sassafras. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (**Jacques et al., 1997**).

II.3.4. Activités biologiques et pharmacologiques

En générale, les HEs sont connues pour leurs propriétés :

- Antimicrobiennes :

Les vertus antimicrobiens des H.E. sont connues et utilisés depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. On note l'étude faite par Chamberland en 1887 de l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle (**Beylier-Maurel, 1976**), et en 1919 Gatte Fosse a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'huile de pin. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des HE. des plantes aromatiques (**Dorman et Deans, 2000 ; Flamini, 1999**).

In-vitro, l'effet microbicide de certaines H.E. a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques (**Valnet, 1978**). De plus, elles ont un champ d'action très large. Plusieurs travaux montrent que les H.E. et leurs composés majoritaires (**Carson et Riley, 1995**) ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries Gram négatif et Gram positif (**Karaman et al., 2001 ; Lis-Balchin et al., 2001**). L'activité antifongique et antibactérienne des HE et de leurs constituants est décrite par plusieurs études (**Conner, 1993 ; Dorman et Deans, 2000 ; Inyoue et al., 2001**).

- anti-inflammatoires (dues aux aldéhydes, au chamazulène, etc.)
- anticatarrhales : expectorantes (dues au 1,8-cinéol), mucolytiques (dues aux molécules cétoniques et aux lactones)
- anti-histaminiques
- antispasmodiques (dues aux éthers et aux esters)
- antalgiques, analgésiques et anesthésiques
- calmantes, hypnotiques et anxiolytiques
- endocrinorégulatrices : comme les œstrogènes, comme la cortisone, etc.
- vasculotropes et hémotropes : hyperémiantes, phlébotoniques, lymphotoniques, anticoagulantes (dues aux coumarines) et fibrinolytiques, antihématomes (HE d'hélichryse italienne), hémostatiques, hypotensives
 - digestives : eupeptiques, carminatives, cholagogues et cholérétiques (dues à la menthone, la carvone et la verbénone)
 - antitoxiques
 - antivenimeuses
 - antirhumatismales
 - stimulantes ou apaisantes
 - aphrodisiaques (Jollois et *al.*, 2001)

II.3.5. Domaines d'utilisation

Les HEs sont largement utilisées en parfumerie et cosmétologie (dans les crèmes et les gels) comme antimicrobiens et antioxydants, tout en leur assurant leur odeur agréable (Maruzzella et *al.*, 1962 ; Vargas et *al.*, 1999). Aussi, en industrie alimentaire, comme conservateur (contre la prolifération des micro-organismes) et exhausteur d'arôme naturel (Lis-Balchin et *al.*, 1998 ; Lachowicz et *al.*, 1998). Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des HEs, le carvacrol, qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire (Hammer, 1999). Il est rajouté pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires (Bilgrami et *al.*, 1992; Hitokoto et *al.*, 1980) . Plusieurs travaux ont montré que les HEs de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (Beuchat,1976 ; Madhyastha et *al.*, 1984).

II.4. Les hydrolats

II.4.1. Définition

Lors du processus d'obtention des huiles essentielles, un sous produit se forme à partir de l'eau ayant servi à l'extraction des molécules odorantes. Ce produit est l'hydrolat ou hydrosol en anglais. Au cours de la distillation, la vapeur d'eau traverse la matière végétale puis se condense au contact des parois froides d'un réfrigérant (**Price et al, 2004**)

II.4.2. Composition

Les hydrolats contiennent en petite quantité des composés volatils semblables à ceux présents dans l'huile essentielle ainsi que des composés solubles dans l'eau non retrouvés dans l'huile. La composition des hydrolats s'éloigne donc de celle des huiles : les molécules oxygénées hydrophiles s'y trouvent en grandes quantités alors que les composés lipophiles comme les hydrocarbures terpéniques sont la plupart du temps quasi absents. (**Price et al., 2004**).

II.4.3. Activités biologiques et pharmacologiques

Malgré la faible proportion en principes actifs, les hydrolats présentent certaines activités pharmacologiques et biologiques intéressantes. Leur popularité auprès des consommateurs est principalement due à leur non toxicité par rapport aux huiles essentielles (**Piochon, 2008**).

Plusieurs hydrolats de plantes de la Turquie (*Rosmarius officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L.) ont été testés sur plusieurs bactéries pathogènes (*Escherchia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 2392, etc.). Les hydrolats d'origan et de sarriette ont montré une activité bacteriostatique très intéressante.

Les hydrolats de thym « noir » (*Thymbra spicata* L.), de cumin (*Cuminum cyminum* L.) et d'anis (*Pimpinella anisum* L.) ont également montré une activité intéressante contre certaines bactéries. La forte activité bacteriostatique des hydrolats de sarriette et d'origan est due à la présence de carvacrol et de thymol qui sont deux phénols monoterpéniques connus pour leur activité antibactérienne (**Deans et al.,1990 ; Farag et al., 1989**).

Les activités antifongiques des hydrolats de cinq épices (romarin, cumin, sarriette, échinophore et basilic) ont été évalués *in vitro* sur des espèces de champignons phytopathogènes (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria citri*) par des chercheurs de l'Université de Selcuk en Turquie (**Boyras et al.,2005**). L'hydrolat de sarriette (*Satureja hortensis*) a montré l'activité antifongique la plus intéressante sur l'ensemble des champignons testés suivi de l'hydrolat d'échinophore (*Echinophora tenuifolia*) puis de cumin (*Cuminum cyminum*) (**Piochon, 2008**).

Ces résultats ouvrent une perspective intéressante dans le domaine de l'alimentaire, de la cosmétique et de la pharmacie dans la mesure où les agents de conservation chimiques pourraient être remplacés par des hydrolats tant que l'impact organoleptique de ceux-ci demeure acceptable. (Farag *et al.*, 1989).

De point de vue pharmacologique, l'hydrolat était très employé depuis l'antiquité pour soigner divers maux tels que les problèmes reliés au système gastro-intestinal. En effet, l'hydrolat d'*Origanum onites* a montré une activité spasmolytique sur le duodénum et l'iléum de rat, stimulés par l'acétylcholine. Cette inhibition des contractions par l'hydrolat est dose dépendante (Piochon, 2008).

II.5. Les polyphénols

II.5.1. Définition :

Les polyphénols constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (Haslam, 1989).

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux. Ils résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales: la voie shikimate et acétate (Lugasi *et al.*, 2003).

Les composés phénoliques sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique au quel directement est lié au moins un groupe hydroxyl libre engagé dans une fonction (Bruneton, 1999).

Selon Harborne (1989), les polyphénols peuvent s'étendre de molécules simples, telles que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que des tannins.

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué. La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement (Bruneton, 2009).

II.5.2. Classification des composés phénoliques

➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, 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 une chaîne en C₃ (**Bruneton, 1999**) (**fig. 3**).

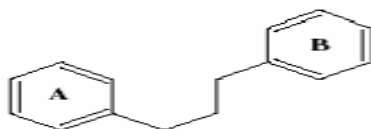
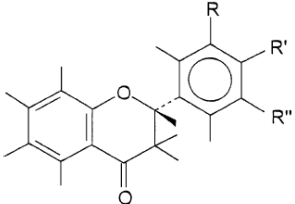
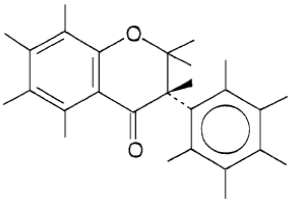
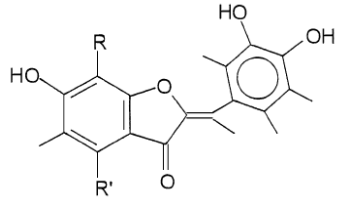
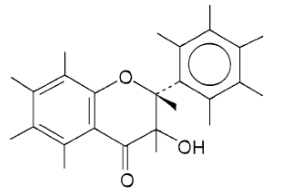
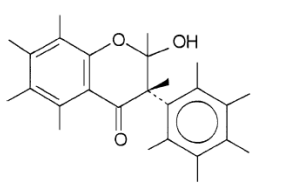
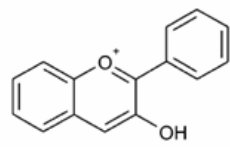


Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes (**Bruneton, 1999**)

En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes (**Fig.4**) : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes (**Havsteen et al., 2002; Edenharder et Grünhage , 2003**).

Flavonoles	Isoflavonoles	Isoflavanes
Flavones	Isoflavones	Flavanes

		
Flavanones	Isoflavanones	Aurones
		
Flavanols	Isoflavanols	Anthocyanidines
Figure 4 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen et al., 2002)		

➤ **Les tannins**

Les tannins sont des polyphénols polaires d'origines végétales (Berthod et al., 1999), qui existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines. Leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3 000 Da (Cowan, 1999). Il est difficile de les séparer dans un extrait végétal, parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (Berthod et al., 1999).

Ils sont divisés en deux groupes, tannins hydrolysables et tannins condensés. Alternativement, des tannins peuvent être constitués par polymérisation des unités de quinone (Cowan, 1999).

• **Tanins hydrolysables :**

Se sont des oligo ester ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable de molécule d'acides phénols, le sucre est très généralement le glucose, l'acide phénol est soit de l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide éllagique dans le cas des tannins ellagiques (Bruneton, 1999) (fig. 5).

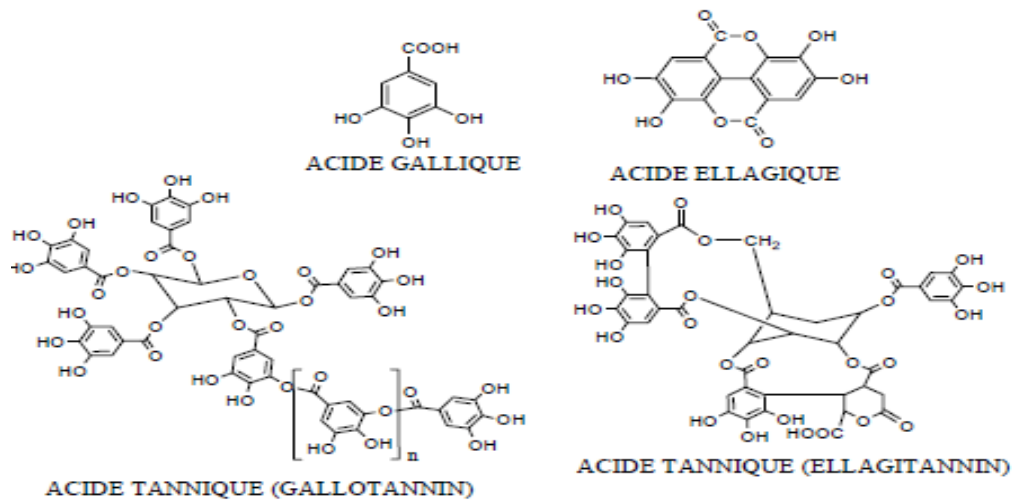


Figure 5 : Structures des tannins hydrolysables et des acides associés (Peronny, 2005)

- **Tanins condensés ou pro-antocyanidines :**

Ils se diffèrent fondamentalement des tannins galliques et ellagiques car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécules et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes (Bruneton, 2009) (Fig. 6)

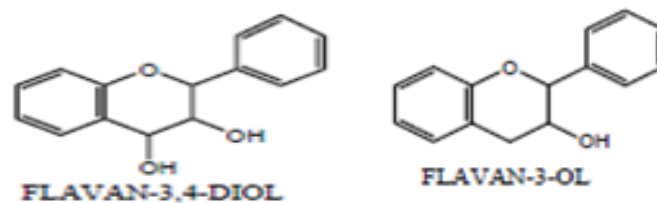


Figure 6 : Structures de tannins condensés (Peronny, 2005)

➤ **Les Coumarines**

Se sont des substances odorantes présentent dans de nombreuses plantes aux actions variables. Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones qu'on peut considérer en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamique (Bruneton, 1999)

➤ **Les antocyanosides**

Les anthocyanes sont des pigments responsables de la couleur de la plus part des fleurs et des fruits (**Harborne, 1967; Brouillard,2003**). Ces pigments représentent des signaux qui attirent les animaux pollinisateurs insectes, oiseaux (**Brouillard et al.,2003**).

➤ **Les lignanes**

Les lignanes sont issu de la condensation des deux unités phenylpropaniques (C6-C3). Ces composés sont très répandus dans le règne végétal. Elles forment une classe chimique très importante. Chez l'ortie on a les lignanes diaryl-butaniques comme le sécoisolaricirésinol (**Bruneton, 1999**) qui est présent au niveau des racines en plus du néo-olivil (**Hryb, 1995**).

➤ **Les anthraquinones – Anthracénosides – Emodols**

Les anthraquinones sont des composés colorés en orange, rouge, appartenant à la famille des anthracénosides. Ces derniers regroupent tous les composés phénoliques et hétérosidiques. Les emodols sont des dérivés hydroxyanthracéniques(**Tsutomu et Hisachi, 1971**).

II.5.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités anti-allergique, anti-athérogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (**Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2008**). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (**Nijveldt et al., 2001**).

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (**Leong et Shui, 2002**).

D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou comme des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur

application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (**Hennebelle et al., 2004**).

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions: soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes (**Hodek et al., 2002**); soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (**Van Acker et al., 1998 ; Benavente-García et al., 1997**). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxigénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et virales (anti-HIV) (**Yao et al., 2004 ; Cowan et al., 1999**). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-oestrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion.

D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers Citrus) et la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (**Hennebelle et al., 2004**).

Les anthocyanes sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire (*vigne rouge, Vitis vinifera* L.), mais aussi comme diurétiques, voire même antiseptiques urinaires. Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (*Vaccinium myrtillus* L.; *Ribes nigrum* L.) (**Hennebelle et al., 2004**). Les anthocyanidines sont responsables de la couleur brillante des fruits et des légumes. Aussi, ont un effet inhibiteur de la croissance des lignées cellulaires humaines (**Zhang et al., 2005**).

Les tanins sont considérés comme des anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie (**Chung et al., 1998**). Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (chêne, *Quercus*). Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus spp.*) seraient de

bons sédatifs cardiaques(Hennebelle et al., 2004). Concernant le pouvoir antioxydant des tannins, cette propriété est très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tannins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres (Rahman, 2002), ils inhibent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages in vitro (Yoshida, 1999).

Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives (Hennebelle et al., 2004). Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (Andersson et al., 1996).

Les acides phénols et ces dérivés sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés(Hennebelle et al., 2004). Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique. Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (Cowan, 1999). Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuses du poumon chez les souris in vitro et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer (Rangkadilok et al., 2007). Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux(Zhang et al., 2005).

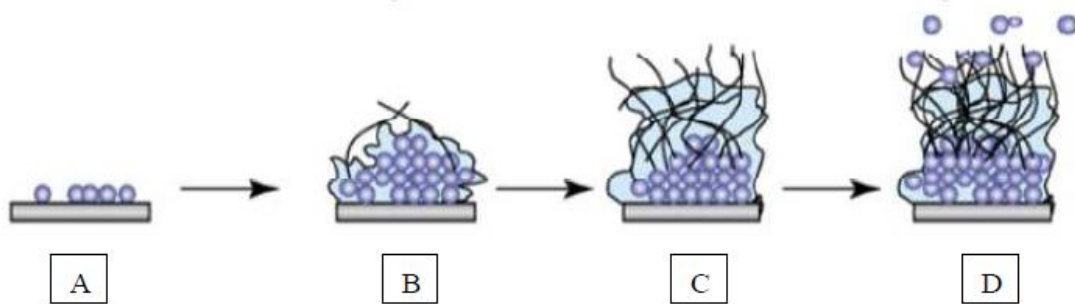
Certaines quinones, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula* L.), les sénés (*Cassia spp.*) et les aloès (*Aloès spp.*). D'autres activités antidépressives, anti-protozoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites et plusieurs molécules du groupe ont une toxicité non négligeable. (Bruneton, 2009).

Chapitre III : Activité antibiofilms des métabolites secondaires

III.1. Généralités sur le biofilm

Le consensus actuel définit un biofilm comme une communauté de microorganismes attachés de manière irréversible à un substrat (microorganismes sessiles), qui sont ancrés dans une matrice de substances polymériques extracellulaires qu'ils ont secrétées et qui présentent un phénotype modifié (i.e.taux de croissance, transcription des gènes) (Donlan et Costerton, 2002).

La formation des biofilms est un processus complexe qui peut se résumer en quatre étapes (Figure 7)(Seneviratne *et al.*, 2008): la phase initiale précoce dite d'adhérence, suivie de la phase intermédiaire de croissance du biofilm, puis d'une phase de maturation du biofilm néoformé et enfin d'une phase de dispersion de microorganismes à partir du biofilm (Pemànet *et al.*, 2008) .



A : Phase précoce : adhérence initiale de blastospores

B : Phase intermédiaire de croissance du biofilm

C : Phase de maturation

D : Phase finale de dispersion

Figure 7 : Principales étapes de la formation d'un biofilm de *C .albicans* (Blankenship et Mitchell, 2006).

III.2. Résistance des biofilms aux antifongiques

Les biofilms posent un problème majeur puisque la dose requise pour les éradiquer peut être supérieure aux concentrations thérapeutiques les plus élevées administrables (Ramage *et al.*, 2009). Plusieurs mécanismes de résistance ont été identifiés chez *C. albicans* (Ramage *et al.*, 2006) :

1)- La présence de la matrice augmente la résistance des biofilms (Al-Fattani et Douglas, 2006) en constituant une barrière diffusive (Hawser et Douglas, 1994). La matrice diluerait

les agents actifs dont la concentration ne serait plus létale (**Hall-Stoodley et al., 2004**). L'action de ces molécules sur les cellules serait ainsi retardée (**Douglas, 2003**).

2)- Lorsque les levures sont résistantes, les gènes codant pour les « pompes à efflux » (i.e *CDR1*, *CDR2* et *MDR1*) (**Mukherjee et al., 2003**) localisées dans la membrane des cellules seraient surexprimés (**Mukherjee et Chandra, 2004**).

3)- L'existence d'une sous population de cellules particulières dites persistantes pourrait également favoriser ce processus de résistance (**La Fleur et al., 2006**). Ce sont des variants phénotypiques du type sauvage plutôt que des mutants (**LaFleur et al., 2006**) qui seraient quiescents (**Lewis, 2010**). Ces cellules survivent à des concentrations élevées en agent antifongique (**Lewis, 2010**). Une fois la disparition de l'agent antifongique, ces cellules peuvent reformer un biofilm (**Lewis, 2010**).

4)- La réduction de la teneur en stérols de la membrane contribuerait aussi à la résistance durant les phases de croissance intermédiaire et de maturation du biofilm (**Mukherjee et Chandra, 2004**). Or, l'ergostérol est essentiel pour la fluidité et la perméabilité membranaires et engendrer une rechute de l'infection (**Mukherjee et al., 2003**).

III.3. Effets connus des métabolites secondaires sur le biofilm

Les propriétés antimicrobiennes, antiseptiques, antifongiques et même anti-*Candida* des huiles essentielles sont souvent attribuées à leurs principaux composants aromatiques comme l'eugénol, le thymol ou le carvacrol (**Braga et al., 2008, Pavel et al., 2010, Williams et al., 2011**). Les propriétés antifongiques et anti-biofilm de *Candida* du thymol et du carvacrol ont été mises en évidence dans le cadre d'une étude au laboratoire (**Dalleau et al., 2008**).

Plusieurs polyphénols ont démontré un pouvoir fongicide envers *C. albicans*, tel que le resveratrol, par accumulation de tréhalose intracellulaire (**Jung et al., 2007**), Le gallate d'épigallocatechine (EGCG), par inhibition de la synthèse d'ergostérol en agissant sur le métabolisme du folate (**Navarro-Martinez et al., 2006**) et l'acide benzoïque isolée du jus de canneberge qui inhibe totalement la croissance de *C. albicans* (**Swartz et Merek, 1968**). Une synergie entre le EGCG et les antifongiques azolés a été démontrée (**Navarro-Martinez et al., 2006**). Une étude réalisée par **Hirasawa et al** en **2004** a conclu que l'EGCG augmente l'activité antifongique de l'amphotéricine B et du fluconazole sur les souches résistantes et non résistantes de *C. albicans*. Il est permis de penser que ce polyphénol pourrait diminuer la quantité d'antifongiques nécessaires pour le traitement de mycoses, limitant ainsi les effets secondaires des antimycotiques. L'étude de **Han (2007)** a démontré que l'utilisation en

combinaison d'un extrait de pépin de raisin et d'amphotéricine B permettait de réduire la dose requise d'amphotéricine B de plus de 75 %, à cause de l'effet synergique avec l'extrait de pépin de raisin. Certains facteurs de virulence de *C. albicans* peuvent être influencés par les polyphénols, tel que l'extrait de feuille de *Streblus asper* qui réduit la formation d'hyphes et l'adhérence de *C. albicans* aux cellules épithéliales (**Taweechaisupapong et al., 2005**). De plus, **Taweechaisupapong et al.,(2006)** ont démontré que ce même polyphénol réduit l'adhérence de *C. albicans* à l'acrylique de 20 %. Cette réduction d'adhérence serait due à un changement dans la paroi cellulaire de *Candida*. La formation du biofilm a également été inhibée jusqu'à 70 % par le baicalein provenant de l'herbe chinoise *Scutellaria baicalensis*(**Cao et al., 2008**).

Le salvipisone et l'aethiopione ont inhibé le biofilm des staphylocoques en réduisant le nombre de ses cellules et sa morphologie (**Walencka et al., 2007**).

Chapitre IV: Pouvoir anti-radicalaire

IV.1. Origine du stress oxydatif

Les Radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, Gerschman puis Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En **1969**, les Américains **McCord et Fridovich** isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant superoxyde dismutase « SOD », démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit des espèces réactives d'oxygène « ERO » dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

➤ Définition d'un radical libre

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques, nommés radicaux libres organiques (**Meziti, 2007**). Selon la définition proposée par **Halliwell et Gutteridge (1997)**, les radicaux libres sont des espèces chimiques contenant un ou plusieurs électrons non appariés dits électrons célibataires. Ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente: Après une rupture homolytique, chacun des deux électrons

intervenant dans la liaison entre les atomes A et B gagne l'orbitale externe de ces atomes, qui deviennent alors des radicaux libres (**Bonnefont-rousselot *et al.*, 2003**).

➤ **Définition du stress oxydant**

Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant (**Favier, 2003**). Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon ses habitudes alimentaires, son mode de vie, ses caractéristiques génétiques ou l'environnement dans lequel il vit (**Diallo, 2008**). L'importance des dommages du stress oxydant dépend de la cible moléculaire, de la sévérité de l'effort et du mécanisme par lequel l'effort oxydant est imposé (**Aruoma, 1999**).

IV.2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques :

➤ **Rôles biologique des radicaux libres**

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes (**Favier, 2003**), à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire (**Ardestani et Yazdanparast, 2007 ; Touafek, 2010 ; Marfak, 2003**).

➤ **Les conséquences du stress oxydant**

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires, induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). La toxicité des EOR s'exerce également sur les protéines. Les EOR sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant

également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine. Les EOR sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques. L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des EOR. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN, mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques (**Koehlin-Ramonatxo, 2006**). Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppressions (**Favier, 2003**).

➤ **Les maladies liées au stress oxydant**

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

IV.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres qui sont responsables de nombreuses maladies. Les antioxydants sont des composés qui inhibent ou retardent le processus d'oxydation en bloquant l'initiation ou la propagation des chaînes de réactions oxydatives (**Behera et al., 2006**).

Les antioxydants naturels ou synthétiques sont utilisés pour prévenir de nombreuses maladies (cardiovasculaires et neurodégénératives, inflammation, diabète...) et le vieillissement, dus à la formation exagérée des radicaux libres. Les antioxydants sont également utilisés dans les aliments pour retarder la détérioration, le rancissement ou la

décoloration qui est souvent due à l'oxydation causée par la lumière, la chaleur et certains métaux (Méda *et al.*, 2005).

IV.3.1. Classification des antioxydants

➤ Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (groupe 1) ou en épurant les radicaux libres oxygénés formés (groupe 2). En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (Gardès-Albert, 2003).

▪ Groupe I : (les antioxydants primaires)

Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives. Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques (AH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire. Les antioxydants de ce groupe réagissent de façon prédominante avec les radicaux peroxyés, pour deux raisons : la concentration élevée de ces radicaux et la faible énergie du groupement (ROO·). Un piègeur du radical libre, même à des concentrations faibles, entre en compétition avec les lipides pour rendre le radical libre inactif par l'intermédiaire d'une réaction de libération d'un électron, suivie d'une déprotonation (Frankel *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2005).

▪ Groupe II (les antioxydants secondaires)

Les antioxydants secondaires englobent une large gamme de différentes substances chimiques chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singlet, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes antioxydants et destructeurs des hydroperoxydes.

Parfois, quelques antioxydants peuvent exercer plusieurs fonctions anti-oxydatives, par exemple, l'acide ascorbique peut être un piègeur du radical libre, désactivateur des oxygènes singlets dans une solution aqueuse et effectivement régénérer du tocophérol. Plusieurs flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres et chélateurs de métaux (Miller *et al.*, 1996).

➤ Classification des antioxydants suivant la nature chimique

▪ Les antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo*. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E. (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres. (**Svoboda et Hampson, 1999**).

▪ **Les antioxydants enzymatiques**

Les antioxydants enzymatiques s'agit principalement de trois enzymes, la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel et al., 2001**).

▪ **Les antioxydants non enzymatiques**

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols. Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (**Lisu et al., 2003**). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (**Yu et al., 2000**). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques (**Barlow, 1990**). Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat (**Ito et al., 1985**).

IV.3.2. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Favier, 2006**). D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire. Les

antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur (**Yaacoub et al., 2009**).

2^{eme} partie :

Matériel et méthodes

Les objectifs de ce travail sont l'examen phytochimique, l'analyse des extraits (huile essentielle et polyphénols) et l'évaluation du pouvoir antimicrobien et antiradicalaire de *Nepeta. amethystina*.

Chapitre I : Matériel végétal

I.1. Origine du matériel végétal

Nepeta amethystina Poir a été récoltée à **Aïn-Sefra** (Djebel Mekhter) au Sud-Ouest Algérien, en période de préfloraison (tiges, feuilles et racines), à la fin de mai et début de juin durant l'année 2011 (**fig. 8**).

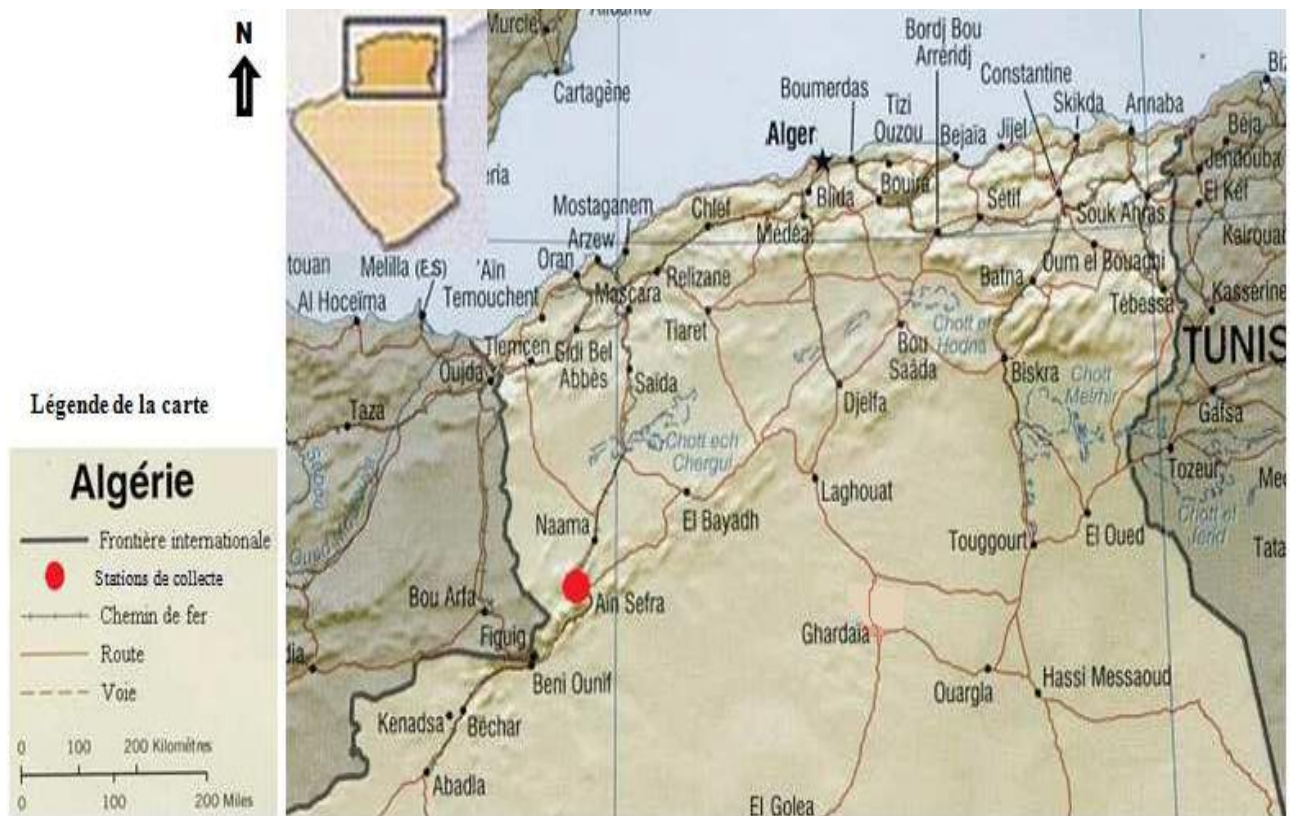


Figure 8 : Situation géographique de station de collecte

Le lieu de prélèvement de la plante « Djebel Mekhter-Aïn-Sefra », dépend administrativement de la wilaya de Naâma ; celle-ci se trouve limitée au Nord par la wilaya de Naâma, au Sud par la wilaya de Bechar, à l'ouest par le Maroc, et à l'est par la wilaya d'El Bayadh).

La ville de Aïn Sefra se trouve au sud-ouest algérien, et entre 35° 05' et 35° 25' de latitude Nord, et entre 0° 15' et 2° 15' de Longitude, d'un climat aride froid. (O.N.M, 2011). Les données géographiques et bioclimatiques sont résumées dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Situations géographiques et étage bioclimatique de la station de récolte (O.N.M.,2011).

Station de récolte	Etage bioclimatique	Altitude (m)	Latitude (Nord)	Longitude (Ouest)	Pluviométrie (mm)
Aïn-Sefra (Djebel Mekhter)	Aride froid	1075	0° 36'	32° 45'	120

L'identification botanique de l'espèce a été déterminé selon les clés de **Quézel et Santa (1962)**, **Ubera et Valdés (1983)** et confirmé par les botanistes du laboratoire d'Ecologie et de la biodiversité végétale, Université de Tlemcen où des spécimens de la plante sont déposés (**fig. 9**).



Figure 9 : *N. amethystina* (tiges, feuilles) (Photos prises à Djebel Mekhter en juin 2011).

I.2. Traitement du matériel végétal

Après la récolte, le matériel végétal est nettoyé (débarassé des débris) et les deux parties de la plante récolté (tiges + feuilles et racines) sont séparément étalées et laissées sécher à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant trois jours. Une fois sécher, nous avons conservé chaque partie de la plante dans des sachets en papier de Kraft.

I.3. Enquête ethnopharmacologique

L'enquête préliminaire sur la plante *N. amethystina* a été réalisée auprès de la population d'Aïn-Sefra selon un questionnaire (voir **annexe 1**). L'enquête a porté essentiellement sur le nom vernaculaire, la partie de la plante utilisée, le mode de préparation et d'administration et les usages thérapeutiques.

I.4. Criblage phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles chimiques existantes dans la plante étudiée par des réactions de précipitation ou de coloration en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés selon les méthodes décrites par **Dohou et al. (2003)**.

I.4.1. Extraction :

Les parties aériennes de la plante (tiges, feuilles et racines) ont été soumises à des extractions sous reflux (**fig. 10**) successivement par trois solvants de polarité décroissante : eau, éthanol et éther diéthylique (PROLABO), afin d'extraire les différentes familles de composés chimiques.

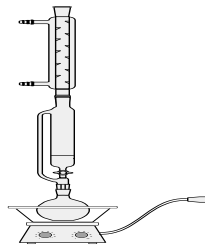


Figure 10 : Appareil de Soxhlet

I.4.2. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud :

50g de matériel végétal sont mis en contact avec 300 ml d'eau dans un ballon mono-col surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux différents tests.

a. Amidon:

Le test effectué consiste à :

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

L'apparition d'une coloration bleue violacée indique la présence de l'amidon (**Rahman, 2002**).

b. Les saponosides:

Les saponosides sont caractérisés par un l'indice de mousse (**Yochida et al.,1999**). Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, après l'agitation, le mélange est abandonné pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée:

Pas de mousse = test négatif

Mousse moins de 1cm = test faiblement positif

Mousse de 1-2cm = test positif

Mousse plus de 2cm = test très positif

c. Les tanins:

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait aqueux, 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃ diluée 10 fois. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins.

d. Les anthraquinones:

La détection des anthraquinones consiste à :

- Traiter 1g du matériel végétal avec 10 ml de KOH (0,5N) et 1 ml H₂O₂ dilué à 5% ;
- Bouillir et refroidir le mélange
- Filtrer, puis acidifier le filtrat avec de l'acide acétique ;
- Extraire la solution acide obtenue avec 10 ml de toluène ;
- Agiter l'extrait de toluène en présence de 5 ml de NH₄OH

Une réaction positive est révélée par formation d'une couleur rouge au niveau de la couche alcaline.

I.4.3. Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol :

50g de matériel végétal sont mis en contact avec 300 ml d'éthanol dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux différents tests.

a. Les flavonoïdes:

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1ml d'HCl concentré et 0,5g de tournure de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (**Yochida et al., 2002**).

b. Les alcaloïdes sels:

Leur détection consiste à :

- ❖ Evaporer à sec 20 ml de l'extrait éthanolique ;
- ❖ Ajouter 5 ml d'HCl (10%) au résidu obtenu, puis chauffer dans un bain marie ;
- ❖ Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de NH₄OH (10%) jusqu'au pH 9 ; Extraire la solution avec l'éther diéthylique, ensuite concentrer à sec ;
- ❖ Dissoudre le résidu dans du HCl (2%) ;
- ❖ Tester la présence des alcaloïdes par quelques gouttes de réactif de Mayer et Wagner afin d'obtenir un précipité blanc et un précipité brun indiquant la présence des alcaloïdes (**Rangakadilok et al., 2007**).

c. Les tanins:

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait éthanolique 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (tanins galliques), vert ou bleu-verte (tanins catéchiques).

d. Les anthracénosides, les coumarines et les anthocyanosides :

Pour mettre en évidence ces composés, il faudra suivre les étapes suivantes :

- Ajouter 15 ml d'HCl (10%) à 25 ml de l'extrait éthanolique ;
- Porter l'ensemble à reflux pendant 30 minutes ;
- Refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 15 ml d'éther ;

Ensuite, chacune des ces familles est détectée séparément :

e. Les anthracénosides :

La détection des anthracénosides est réalisée par le réactif de Bornträger, en traitant 8ml de la solution extractive éthérique par ce dernier. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangée-rouge au violet- pourpre.

f. Les coumarines :

Leur détection consiste à :

- Evaporer à sec 5 ml d'eau chaude, puis diviser le volume en deux parties;
- Prendre le demi volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 ml de NH_4OH (10%) ;
- Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV

La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence intense (**Hitokoto et al., 1980**).

g. Les anthocyanosides:

Le test effectué consiste à doser la solution aqueuse acide avec une solution NaOH. Les anthocyanosides ont des colorations variant en fonction du pH. La solution prend une couleur rouge stable au $\text{pH} < 3$, et varie au bleu en milieu alcalin.

h. Les stérols et stéroïdes:

Deux essais ont été effectués :

Essai 1 : il consiste à :

- Evaporer à sec 10 ml d'extrait éthanolique ;
- Traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre puis filtrer ;
- Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydride acétique ;
- Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ;
- Agiter, puis laisser la solution reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C).

Essai 2 : Il consiste à :

- Evaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme, puis filtrer ;
- Traiter le filtrat par la réaction de Liebermann-Burchardt.

Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique respectivement la présence des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques.

i. Les composés réducteurs:

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'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.

I.4.4. Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique

50g de matériel végétal sont mis en contact avec 300 ml d'éther diéthylique dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant 1 heure. Le mélange est filtré et l'extrait étherique est soumis aux différents tests.

a. Les huiles volatiles:

La détection des huiles volatiles consiste à :

- Evaporer à sec 20 ml de l'extrait éthérique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool ;
- Concentrer à sec la solution alcoolique obtenue.

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme.

b. Les acides gras:

L'essai effectué consiste à :

- Concentrer à sec 20 ml de la solution éthérique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool ;
- Traiter la solution alcoolique avec une solution base de soude ou de potasse ;
- Ajouter un peu d'eau et extraire la solution avec l'éther diéthylique ;
- Concentrer à sec la solution éthérée.

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

c. Les alcaloïdes bases:

La détection des alcaloïdes consiste à :

- Evaporer à sec 10 ml de l'extrait éthérique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 ml d'HCl (2%) ;
- Ajouter 1 à 2 gouttes de réactif de Mayer.

La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

I.5. Extractions sélectives

I.5.1. Procédé d'obtention de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) a été effectuée par hydrodistillation au Clevenger. Cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal dans l'eau qui est portée à l'ébullition. Le dispositif utilisé est constitué d'un ballon en verre, placé au dessus d'un chauffe ballon, contenant de l'eau et le matériel à traiter, et surmonté d'une colonne à distiller en verre. Cette colonne est elle même reliée à un réfrigérant qui condense les vapeurs d'eau que l'on recueille sous forme de distillat dans une burette. La durée de l'extraction est 4 à 5 h (**fig. 11**)



Figure 11 : Photo d'un montage d'hydrodistillation type Clevenger

I.5.2. Procédé d'extraction de l'hydrolat

La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'eau aromatique par décantation. Cette dernière contient une quantité non négligeable d'essence aromatique sous forme solubilisée. La récupération de cette huile est réalisée par extraction liquide liquide avec un solvant organique (éther diéthylique). L'utilisation d'un évaporateur rotatif sous vide permet d'éliminer l'éther et d'obtenir ainsi l'huile essentielle dissoute dans l'hydrolat.

I.5.3. Obtention des flavonoïdes totaux

Pour l'extraction des flavonoïdes de la partie aérienne tiges et feuilles, nous avons utilisé la méthode décrite par **Upson et al. (2000)** (**Fig. 12**).

- 100g de plante sèche broyée est placé dans un ballon en présence d'une solution hydroalcoolique MeOH/eau (7:3 V/V) porté à ébullition.
- L'échantillon est laissé macérer durant une nuit (24 heures). l'opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant.
- Après filtration sur papier filtre, l'extrait brut hydrométhanolique (EB) est évaporé sous vide à sec en utilisant un évaporateur rotatif (BÜCHI) à la température de 45-50°C.
- Après dégraissage du résidu obtenu par l'hexane, le résidu délipidé est récupéré dans l'eau chaude (50°C) puis soumis successivement a une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (extraction des flavonoïdes aglycones, flavonoïdes mono-O-glycosides et parfois des di-O-glycosides) et le 1-butanol (extraction des flavonoïdes di-O-glycosides, tri-O-glycosides et C-glycosides) (Tereschuk et al, 2004). Ensuite, les deux extraits, l'extrait acétate d'éthyl (EAcOEt) et l'extrait butanolique (E1-BuOH) sont évaporés à sec en utilisant un évaporateur rotatif.

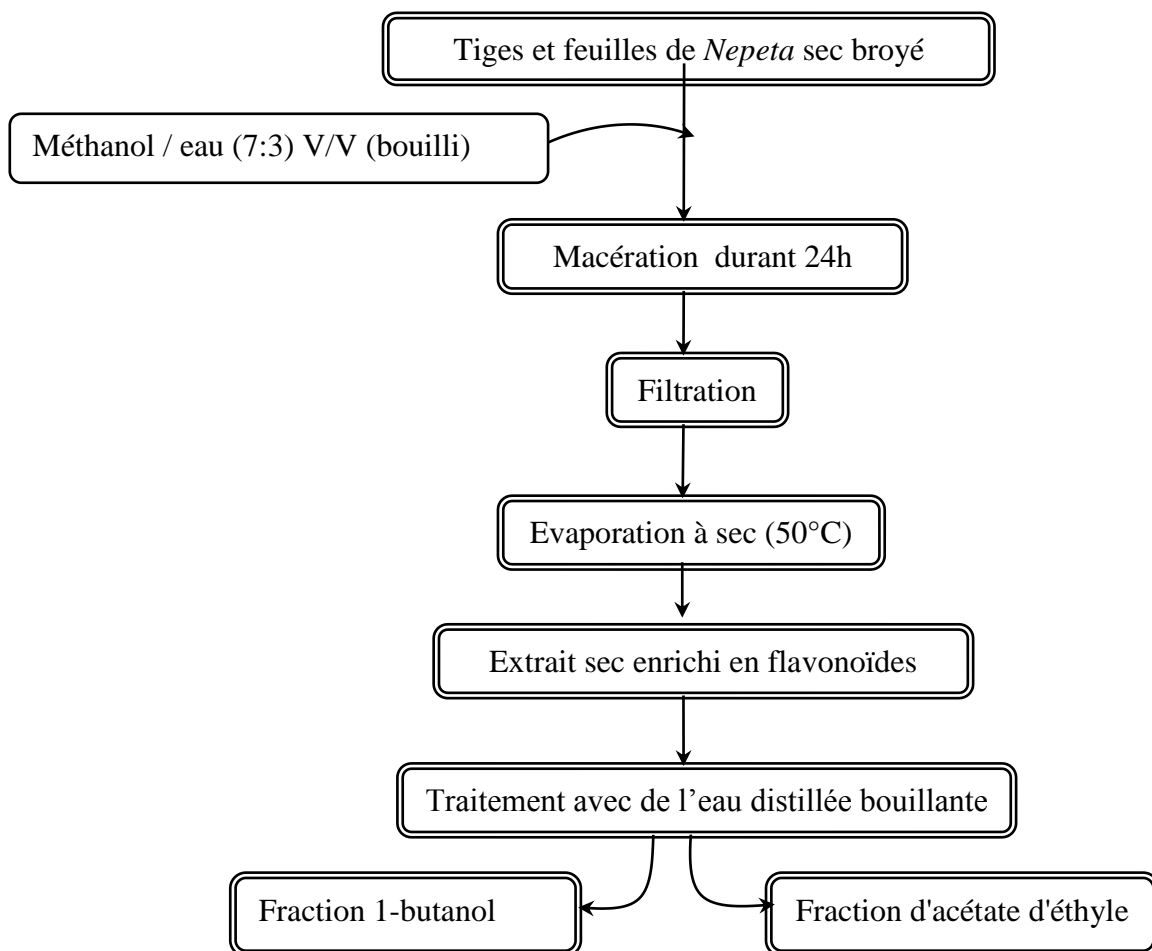


Figure 12 : Protocol d'extraction des flavonoïdes (Upson et al., 2000)

I.5.4. Extraction liquide-liquide et fractionnement sur colonne

I.5.4.1. Extraction liquide-liquide

Afin d'identifier quelques produits, nous avons pratiqué des extractions liquide-liquide de sextraits bruts, aqueux et éthanolique à l'aide de solvants de polarité croissante.

I.5.4.2. Fractionnement par colonne ouverte

Cette technique est analogue à la CCM (basée sur une interaction électrostatique/ liaison hydrogène) sauf que c'est par gravité que l'élution se fait, et non par diffusion. On utilise une colonne en verre équipée d'un verre fritté et d'un robinet. La colonne est remplie d'une poudre, généralement de l'alumine ou de la silice. Selon la nature de l'éluant et du support, certaines molécules sont plus facilement éluées que d'autre (**Horowitz, 2000**). L'élution se fait selon un gradient de solvant polaire en faisant varier les proportions de solvant composant l'éluant ou même en changeant le solvant lui-même.

Mode opératoire : Lors de l'opération de remplissage, le plus délicat est d'avoir une répartition la plus homogène possible de l'adsorbant. Il faut éviter un remplissage de biais, éviter la formation de trous et de bulles d'air. L'étape la plus intéressante pour avoir un bon fractionnement est le choix des éluants. Ce choix dépendait de la polarité. Pour cela on a essayé plusieurs systèmes de polarité variable, pour la mise en évidence et la séparation de différents constituants.

Pour cela, nous avons fractionnés uniquement l'extrait éthanolique de la partie aérienne (tiges, feuilles) de *N. amethystina* sur colonne (CC) ouverte de silice de forte granulométrie (SiO_2 , ICN 200-500 μm , 60 \AA et SiO_2 G fine 10-40 μm). Par élution sous vide aux solvants de polarité croissante (cyclohexane, DCM, éther, acétone, MeOH), on obtient des fractions qui sont évaporées à sec sous pression réduite.

I.5. Dosages et analyses chromatographiques

1.5.1. Rendements en huile essentielle et en extrait d'hydrolat

Le rendement en huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat sont calculés par le rapport entre le poids de l'huile essentielle ou de l'extrait d'hydrolat et le poids de la plante. Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{R \% = (P_B / P_A) \times 100}$$

R % : Le rendement en %

P_A : Masse de la plante en g

P_B : Masse de l'extrait en g

1.5.2. Dosage des composés phénoliques

1.5.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits (H₂O étherique et méthanolique) de *N. amethystina* a été déterminée par la méthode de **Singleton et al. (1999)**.

Une quantité de 200 µl des extraits de la plante est mélangé avec 1ml du réactif de Folin–Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0,8ml de carbonate de sodium à 7,5% Na₂CO₃. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/VIS OPTIZEN) à 765 nm. Une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) a été réalisée en parallèle par l'acide gallique à différentes concentrations (0,25-1mg/ml) dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme du poids sec de la plante en appliquant la formule suivante :

$$C = (c \times V) / m$$

C : La teneur en phénols totaux (mg d'acide gallique / g de matière végétale sèche).

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

V: Volume de l'extrait méthanolique ou aqueux

m: Le poids de la matière végétale sèche (g).

1.5.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes a été déterminée spectrophotométriquement selon la méthode décrite par **Upson et al. (2001)**. Une quantité de 100ml de chaque extrait (MeoH/H₂O, AcoEt, 1-Butanol) a été mélangée avec 0,4ml d'eau distillée et par la suite avec 0,03ml d'une solution de nitrite de sodium NaNO₂ à 5%.

Après 5 minutes, 0,02ml d'une solution d'AlCl₃ à 10% a été ajouté. Après 5 minutes on additionne au mélange 0,2ml de solution de Na₂CO₃ 1M et 0,25ml d'eau distillée. L'ensemble est agité à l'aide d'un vortex et l'absorbance a été mesurée à 510 nm.

La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) réalisée par la catéchine à différentes concentrations (0,005-0,035mg/ml) dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de catéchine par gramme du poids sec de la plante

I.5.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM permet d'avoir une idée sur les différentes classes de composés contenus dans les extraits.

Principe : Elle consiste à placer sur une feuille (papier, silice ou autre) une tache et la laisser éluer en la trempant dans un solvant ou un mélange de solvant (appelé éluant) qui diffuse le long du support. La tache migre sur la plaque plus ou moins vite selon la nature des interactions qu'elle subit de la part du support (phase stationnaire) et de l'éluant (phase mobile). Elle est basée sur une interaction de type électrostatique/liaison hydrogène. Le principe du « qui se rassemble s'assemble », souvent rencontré en chimie permet encore d'expliquer ici la nature des phénomènes impliqués. Il n'existe pas de théorie pour la CCM permettant de choisir le bon éluant (c'est lui le plus dur à trouver) (**Bounias, 1983**). La CCM se déroule en trois étapes, préparation de la cuve, préparation de la plaque et l'élution. Une cuve de chromatographie se compose de la cuve et d'un couvercle. Le couvercle sert d'une part à éviter l'évaporation du solvant mais surtout à réaliser la CCM en atmosphère saturée.

Mode opératoire : Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur plaques analytiques commerciales 20 x 20 cm (Silicagel 60 F254, de 0,25 mm d'épaisseur). A l'aide d'un crayon, on trace légèrement une ligne de dépôt à 2 cm du bord inférieur de la plaque et une ligne de front à 1 cm du bord supérieur. En utilisant une micropipette, on effectue un dépôt du produit sur la ligne de départ sous forme d'une petite tache. Pour opérer en atmosphère saturée, il faut tapisser les parois de la cuve de papier filtre. Après 30 min de l'introduction de l'éluant choisi, on place la plaque à l'intérieur de la cuve de sorte que sa partie inférieure soit trempée dans le solvant. Une fois le solvant arrive à la ligne de front, on retire la plaque et on la pose dans un dessiccateur pour sécher.

La détection des taches a été réalisée par plusieurs révélateurs. En premier lieu, avec la lampe (UV) de type Vilberlourmate N° 7674 (à 254 et à 365 nm) mais puisque de nombreux composés ne possèdent pas de couleurs propres, ni de fluorescence ou n'absorbent pas la lumière UV, dans ces conditions, on est obligés de rendre visibles certaines tâches en pulvérisant notre plaque avec une solution de vanilline sulfurique à 1% et par la solution $AlCl_3$ à 1%. Ainsi, le R_f (facteur de rétention) a été déterminé pour chaque tache observée en calculant le quotient de la distance de migration de chaque composé depuis la ligne du départ (dépôt), jusqu'aux centres des spots, sur la distance de migration du solvant du développement.

I.5.4. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat par CPG /Ir et CPG/SM

L'analyse par CPG a été réalisée à l'aide d'un chromatographe de type Perkin Elmer Autosystem GC, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composés, d'un injecteur diviseur et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i ; épaisseur du film : 0,25 µm) respectivement polaire (Rtx-Wax, polyéthylèneglycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane). Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/min) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/min, puis un palier de 45 min à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'huile injectée est de 0,2µL. La quantification a été faite par intégration électronique directe des aires des pics.

L'analyse par couplage CPG/SM a été réalisée à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer, autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i ; épaisseur du film : 0,25 µm) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Le gaz vecteur est l'hélium (1 mL/min) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/min, puis en un palier de 35 min à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité d' H.E injectée est de 0,2µL. La détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source est de 150°C. L'appareil fonctionne en impact électronique et la fragmentation est réalisée dans un champ électrique de 70eV. Les spectres de masse obtenus ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

❖ Méthodes d'identifications

La méthode d'identification par indice de **Kovats (1965)**: les indices de rétention polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une série d'alcane de C₉ à C₂₅.

Les banques de données des spectres de masses : les spectres de masse obtenus sont comparés à ceux des bibliothèques informatisées : (**Köning et al., 2004** ; **Mc Lafferty et Stauffer, 1994** ; **Adams, 2001**), la bibliothèque du laboratoire de Corse et les spectres de masse publiés dans la littérature (**Adams , 1989**).

I.5.5. Analyse des flavonoïdes par HPLC.

L'analyse qualitative des flavonoïdes a été effectuée par HPLC (Type HPLC 1100 HP Hewlett Packard). La phase stationnaire est une colonne en silice (C18 phase inverse) de 125mm sur 4,6 mm de dimension. La phase mobile est un mélange d'eau/méthanol/acide acétique aux proportions (50 :47:2,5) (V/V/V) en système isocratique avec un débit de 1ml /min. Les extraits et les standards sont préparés à des concentrations de 0,5 mg/ml. Un volume d'extrait et de standards de 20µl est injecté. La détection des composés est faite avec un détecteur UV à la longueur d'onde de 280-320 nm et les flavonoïdes contenus dans chaque extrait analysé ont été identifiés par la comparaison des temps de rétention obtenus par ceux des témoins.

I.5.6. Analyse par RMN

Les spectres RMN des échantillons ont été enregistrés sur un appareil Bruker DPX 300 dans le chloroforme deutéré et les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au TMS pris comme référence interne. Les conditions opératoires sont données en **annexe 2**.

Chapitre II : Matériel microbien

II.1. Les souches testées

L'activité antimicrobienne des extraits de *Nepeta amethystina* a été évaluée sur quatorze souches pathogènes (**Tableau 3**). Les souches bactériennes et fongiques testées sont toutes de références. Le choix des souches citées ci-dessous, a été fait sur la base de leurs implications dans les infections, l'altération des aliments et sur leurs disponibilités au laboratoire.

Tableau 3 : les différentes souches microbiennes testées

		Source	
Bactéries	Gram-	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LAMAABE
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	
		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	
	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	
		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	
		<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	

		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	LAMAABE
Levures		<i>Candida albicans</i> IPP 444	
		<i>Candida albicans</i> IPP10231	
		<i>Candidaalbicans</i> ATCC 26790	
Moisissures		<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294	
		<i>Cladosporium herbarum</i> MNHN 3369	

II.2. Conservation des souches

Les souches utilisées ont été conservé dans le glycérol-BHIB (50%) à -4°C. ces dernières subissent une purification. Au début, un repiquage sur un bouillon BHIB et incubation pendant 24 heures à 37°C pour la revivication des souches. Ensuite, un ensemencement a été réalisé sur des milieux gélosés spécifiques PDA acidifié pour les moisissures, gélose nutritive pour les bactéries et levures).

Les souches ont été conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10ml de milieu de culture incliné (PDA acidifié pour les moisissures, gélose nutritive pour les bactéries et levures).

II.3. Préparation des précultures

Pour la fixation de l'inoculum de départ, on a employé une méthode photométrique (Atwal, 2003). Pour chaque microorganisme, 10 ml de milieu de culture fraîchement préparé et stérilisé (MH pour les bactéries, Bouillon nutritif pour les levures) à été inoculé avec une colonie prélevé d'une culture de 24 heures. La turbidité est ensuite ajustée à 0.5 McFarland en utilisant un spectrophotomètre réglé à 620 nm, ce qui correspond à environ $1-2 \times 10^8$ UFC/ml en mesurant la DO entre 0,08 et 0,1 (CLSI, 2006).

Pour les moisissures, sur une boîte de Pétri, contenant le PDA solide, on dépose un disque provenant d'une culture pure préparé au préalable puis on incube pendant 7 jours.

II.4. Etude de l'activité antimicrobienne

II.4.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

La méthode de Vincent (Aromatogramme) consiste a placé un disque imprégné du composé à tester sur le milieu Muller-Hinton préalablement inoculée avec la souche. Le produit diffuse radialement du disque dans la gélose en formant ainsi un gradient de concentration. Après incubation, il se forme une zone ou un halo autour du disque. Plus grande est cette zone,

plus l'espèce est sensible. Cette zone claire ou halo montre l'inhibition voire même la destruction du germe et évalue l'efficacité du produit testé (**Broadasky et al., 1976**). La lecture des résultats se fait par la mesure du \emptyset de la zone d'inhibition.

II.4.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide

La méthode de micro-dilution a été utilisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) (**Wiegand, 2008**).

Le but de cette technique est de déterminer la CMI des extraits. Cette technique consiste à inoculer par inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en extraits. Après incubation, la valeur de la CMI correspond à la plus faible concentration en extrait capable d'inhiber la croissance des microorganismes (**Lang et Buchbauer, 2012**).

II.4.3. Essai antifongique

Des quantités d'extraits variables (50-100 et 200 μ l) sont additionnées à 20 ml de milieu PDA. Les mélanges sont coulés sur des boites de Pétri. Après, on inocule avec des disques de mycélium de la souche (de 6 mm de diamètre) prélevés d'une culture de 7 jours qu'on dépose au centre des boites puis incubation à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ pendant 7 jours.

Les résultats sont exprimés par la mesure des diamètres des zones de croissance de l'hyphe par rapport au contrôle selon l'application de la formule suivante (**Soliman et Badeaa, 2002**).

$$T = \frac{Db - Da}{Db} \times 100$$

Avec :

T : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en %.

Da : Le diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience (mm).

Db : Le diamètre de témoin (mm).

La lecture est suivie jusqu'au huitième jour pour les huiles essentielles.

II.4.4. Activité antibiofilm

II.4.4.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de biofilm

❖ Obtention de biofilm

Les concentrations minimales inhibitrices de biofilm (CMIB) des extraits vis-à-vis de *Candida albicans* ont été déterminées comme décrit par **Nostro et al. (2007)**. Premièrement, la microplaque à 96 puits a été remplie en distribuant 100 µL d'inoculum à $1-2 \cdot 10^8$ UFC/ml dans chaque puits. Après 24 h d'incubation à 30°C, l'inoculum flottant a été doucement enlevé et tous les puits ont été lavés trois fois avec de l'eau physiologique stérile. Dix concentrations de chaque extrait déjà solubilisé dans le DMSO ont été préparées par la série de dilution 1/2 dans le bouillon Mueller-Hinton stérile. Ensuite tous les puits ont été remplis par 70 µL de bouillon Mueller-Hinton stérile avec 30 µL de chaque concentration pour obtenir des concentrations finales de 0,23 mg/ml à 120 mg/ml pour l'huile essentielle et l'extrait de l'hydrolat et de 0,019 mg/ml à 10 mg/ml pour les fractions acétate d'éthyle et 1-butanol.

❖ Lecture des résultats

La CMIB de biofilm (CIB) a été déterminée après 24 h d'incubation à 30°C comme la concentration la plus basse sans culture dans le puits visuellement déterminée.

II.4.4.2. Détermination des concentrations minimales éradicatrices de biofilm

(CMEB) :

Les concentrations bactéricides de biofilm ont été déterminées comme décrit par **Nostro et al., (2007)**. Premièrement, la microplaque à 96 puits a été remplie par 70 µL de bouillon Mueller-Hinton stérile et 30 µL de chaque concentration dans chaque puits. Après 24 h d'incubation à 37°C, l'inoculum a été doucement enlevé et tous les puits ont été lavés trois fois avec de l'eau physiologique stérile. Ensuite tous les puits ont été remplis par 100 µL de bouillon Mueller-Hinton stérile.

❖ **Lecture des résultats** : La concentration bactéricide de biofilm a été déterminée après 24 h d'incubation à 37°C comme la concentration la plus basse sans culture dans le puits visuellement déterminée.

Chapitre III : Pouvoir anti-radicalaire

III.1. Méthode de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Pour évaluer l'activité antioxydante, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par **Sanchez-Moreno et al., (1998)**. Dans ce test, les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

Pour cela, cinquante microlitres de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations ou de standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025g/l). En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH.

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs \text{ c} - Abs \text{ e}) / Abs \text{ c}] \times 100$$

Abs c: Absorbance du contrôle

Abs e: Absorbance de l'échantillon testé

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC₅₀ qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (**Samarth et al., 2008**) .

III.2. Détermination du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)** basée sur la réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺.

- Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%.
- L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes,
- 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction;
- Les tubes sont centrifugés à 3000 tr/mn pendant 10 minutes ;

- 2,5ml du surnageant sont mélangés à 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV/VIS OPTIZEN).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (l'acide ascorbique ; BHT) dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

IV. Etude statistique

Les tests de Student ont été réalisés à l'aide de Microsoft Excel®. Tandis que les analyses statistiques ANOVA à deux facteurs avec répétitions ainsi que le test postérieur de Bonferroni ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad PRISM version 5.

3^{eme} partie :

Résultats et discussion

3.1. Résultats de l'enquête ethnopharmacologique

Le dépouillement des fiches de l'enquête effectuée auprès de la population d'Aïn-Sefra, a montré que *N. amethystina* est partiellement connu. Certains lui attribuent le nom de Merioua qui est en fait l'espèce *Marrubium vulgare*. L'espèce *N. amethystina* est connue, par les herboristes d'Aïn-Sefra, sous le nom vulgaire de *Gouzia*. Celle-ci est traditionnellement utilisée en usage externe pour traiter les piqûres d'insectes et en infusion comme diurétique, fébrifuge, spasmolytique, fortifiante et stimulante (voir annexe 3).

3.2. Criblage phytochimique

Les résultats des tests chimiques préliminaires effectués sur la plante *Nepeta amethystina* sont présentés dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Résultats des tests chimiques des extraits de *Nepeta amethystina*

Familles chimiques	(Tiges, feuilles)			Racines		
	H ₂ O	EtOH	Et ₂ O	H ₂ O	EtOH	Et ₂ O
Flavonoïdes	+	+	-	-	+	-
Tanins	+	+	/	+	+	+
Stérols et stéroïdes	/	+	/	-	+	+
Alcaloïdes sels	/	-	/	-	+	+
Amidon	-	/	/	-	-	-
Composés réducteurs	/	-	/	+	+	-
Saponosides	+	/	/	/	-	-
Anthraquinones	-	/	/	-	-	-
Coumarines	/	-	/	-	+	+
Anthracénosides	/	-	/	-	-	-
Anthocyanosides	/	-	/	-	-	-
Huiles volatiles	/	/	+	-	-	-
Acide gras	/	/	-	-	+	+
Alcaloïdes bases	/	/	-	-	-	-

- : Test négatif ; + : Test positif ; / : Non testé ;

H₂O : extrait aqueux ; EtOH : extrait éthanolique ; Et₂O : Extrait éthérique

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que l'amidon, les anthraquinones, les alcaloïdes bases, les anthocyanosides, et les anthracénosides sont absents. Cependant, les flavonoïdes, les terpènes, et les tanins sont présents. Selon les parties de la plante, les racines sont riches en alcaloïdes sels, composés réducteurs, coumarines et en acides gras.

Seladji et al. (2014), ont rapporté que les feuilles et les tiges de *Nepeta nepetella* contiennent des tanins, des flavonoïdes, des stérols et stéroïdes et des huiles volatiles. Cependant, les deux parties de la plante ne contiennent pas des coumarines.

On peut conclure que, *Nepeta amethystina* est une plante riche en **flavonoïdes**, **huile essentielle** et **tanins**.

N.B : Vu la difficulté d'étudier les tanins (complexité structurale), nous nous sommes intéressés uniquement à l'étude des flavonoïdes et des huiles essentielles.

3.2. Rendements des extraits bruts

La couleur des extraits végétaux obtenus sont notés dans le **tableau 5** et les rendements sont illustrés par la **fig.13**.

Tableau 5 : Rendements et caractéristiques des extraits bruts de *N. amethystina*

Partie de la plante	Solvant	Couleur	Rendement (%)
Tiges et feuilles	Eau	Poudre verte claire	11,67±0,04
	Éthanol	Solide gras noir	21,94±0,02
	Ether	Solide gras marron	07,02±0,03
Racines	Eau	Jaune claire	05,51±0,02
	Éthanol	Jaune claire/poudre	08,38±0,01
	Ether	Jaune claire/poudre	04,12±0,02

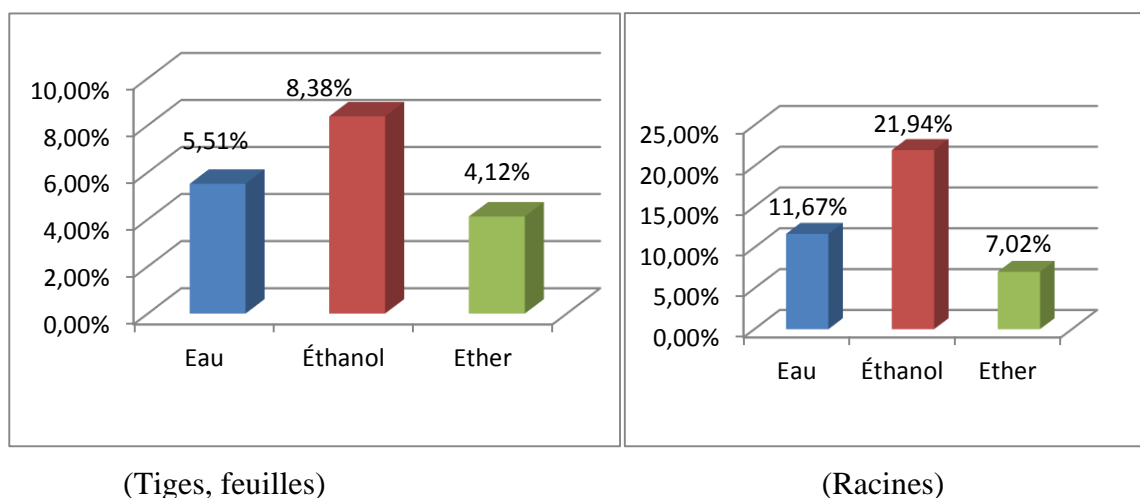


Figure 13: Rendements (%) des extraits bruts de *N. amethystina*

Nous remarquons que les rendements des extractions de la partie aérienne (feuilles et tiges) effectué par différents solvants (eau, éthanol, éther) sont plus importants que les rendements des différents extraits de racine en utilisant les mêmes solvants et que l'extrait éthanolique de la partie aérienne enregistre le rendement le plus élevé de l'ordre de 21,94%.

Les extractions réalisées par **Seladji (2015)** ont montré que le rendement de l'extrait brut aqueux des feuilles de *Nepeta nepetella* est plus élevé de celui des tiges (29,34 % et 13,04%).

N.B : Pour la suite de nos travaux, nous nous sommes intéressés uniquement aux extraits de la partie aérienne (tiges, feuilles) obtenus par reflux car c'est la partie qui a donné de bons rendements en extractibles ($\approx 40\%$) et c'est la seule partie qu'on a pu traiter et analyser au laboratoire Phyvalbio (Bordeaux 1- France).

3.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques

3.3.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Les quantités de polyphénols correspondantes de chaque extrait sont exprimées en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g Ms) (**fig.14**).

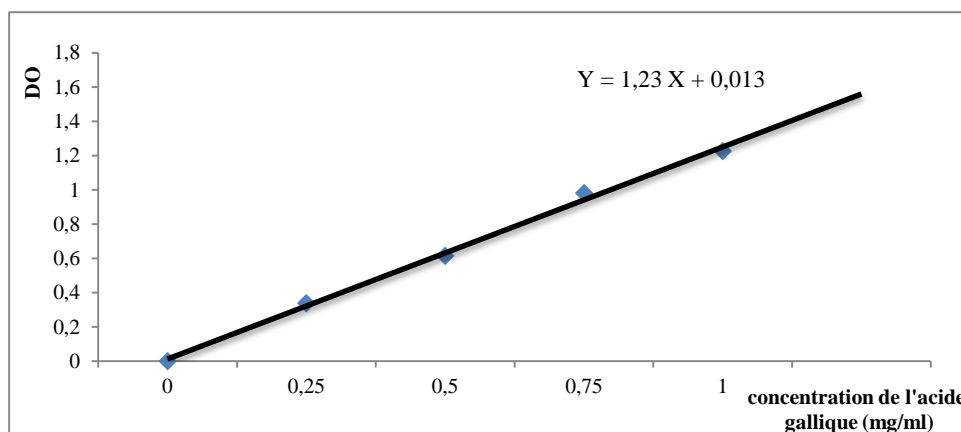


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Les résultats des analyses quantitatives des extraits par spectrophotomètre UV- visible sont représentés par la (**fig.15**). Nous constatons, que l'extrait aqueux est plus riche en extractibles phénoliques (11,84 mg EAG /gMs), puis l'extrait étherique (7,93 mg EAG /gMs) et en fin l'extrait éthanolique (5,62 mg EAG /gMs).

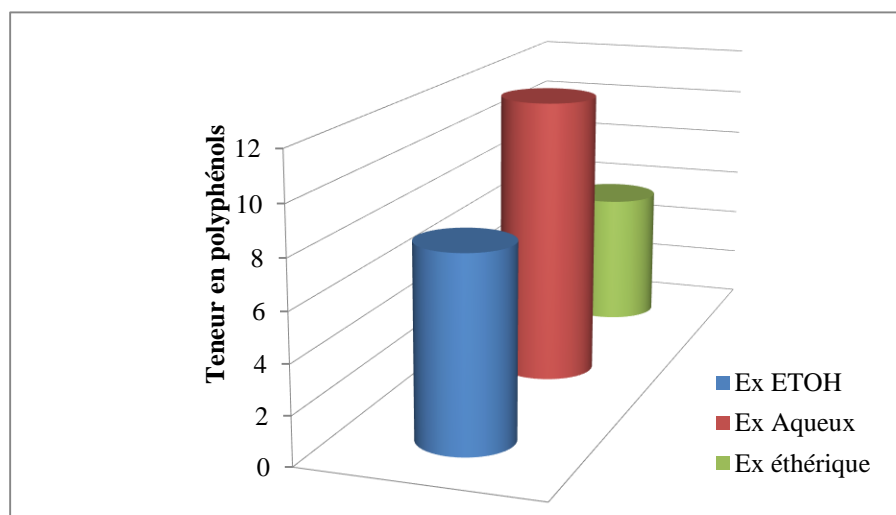


Figure 15 : Teneur en polyphénols totaux (exprimée en mg EAG/g Ms)

Il paraît clairement que l'eau chaude est le solvant qui a permis d'avoir une teneur de polyphénols totaux plus élevée par rapport aux solvants éthanol et l'éther. Ceci, peut être expliqué par (i) la lyse des cellules dans l'eau chaude et la libération d'un maximum de molécules polyphénoliques, (ii) la solubilité différentielle de ces dernières dans des solvants polaires, alors que les produits apolaires sont solubles dans les solvants apolaires.

La teneur de l'extrait aqueux de *Nepeta amethystina* en polyphénols est supérieure à celle trouvée par **Doliorman et al. (2012)** (4,81mg EAG /gMs) qui ont travaillé sur *Nepeta italica*.

Seladji et al. (2015) ont montrés que les extraits méthanoliques des feuilles, tiges et racines de *N. nepetella* sont quantitativement plus riche en composés phénolique que les extraits aqueux.

3.3.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et en utilisant la catéchine comme un étalon. Les taux des teneurs en flavonoïdes des extraits ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 24,66x - 0,057$ (fig.16). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (mg ECt /g Ms).

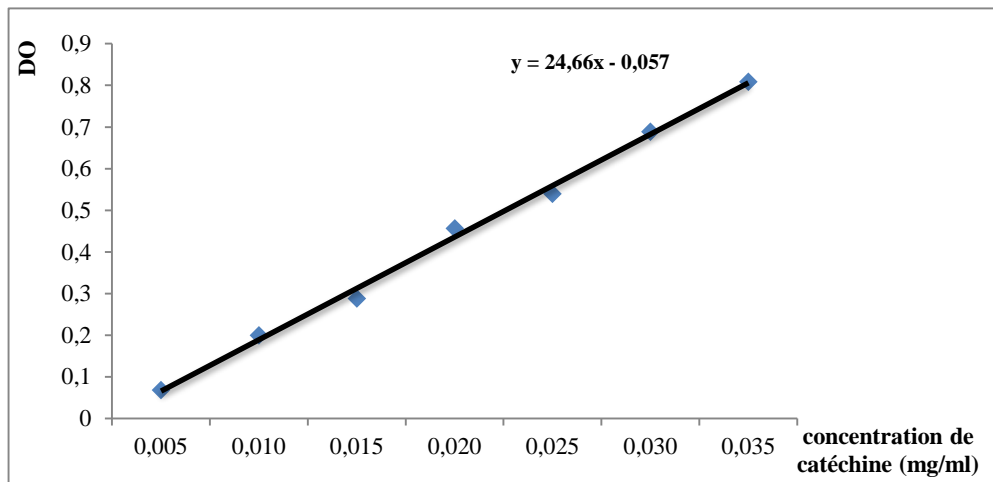


Figure 16: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux

Les résultats des analyses sont présentés par la (**fig.17**). On remarque, que la fraction 1-ButOH enrichi en flavonoïdes est la plus élevée (7,68 mg EC/g Ms) suivi par la fraction acétate d'éthyle (0,53 mg EQ/g Ms) et l'extrait méhanolique (0,23 mg EC/g Ms).

D'après **Seladji (2015)**, l'extrait méthanolique des feuilles de *N. nepetella* sont quantitativement plus riches en flavonoïdes que l'extrait aqueux de la même partie.

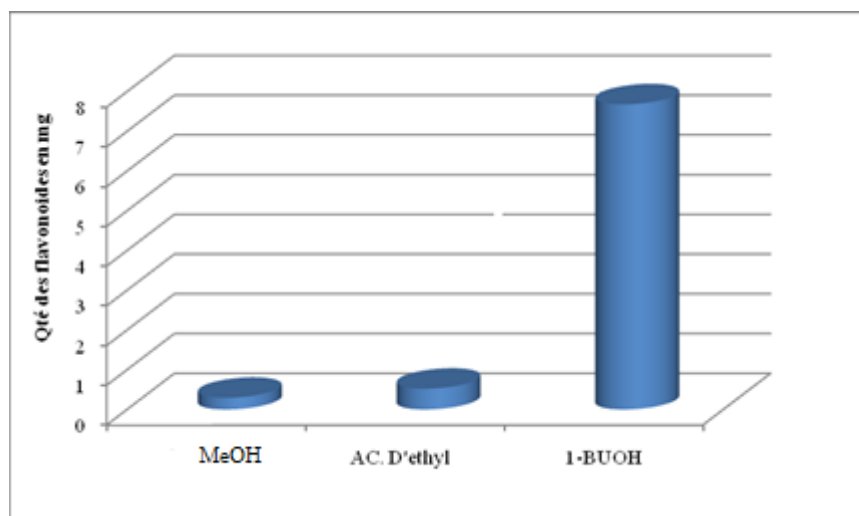


Figure 17 : Teneur en flavonoïdes (mg EC/g Ms)

Ces résultats variables peuvent être expliqués par (i) la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu car il interagit avec les groupes d'hydroxyles non seulement des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines. (**Vuorela, 2005**), (ii) la distribution des métabolites secondaires pendant le développement de la plante en relation avec les conditions

climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité) du milieu saharien (Falleh *et al.*, 2008).

Dans cette première partie d'étude des extraits, on peut dire que :

- L'extraction des composés est en fonction de leur degré de solubilité, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé.
- L'espèce *N. amethystina* est plus riche en polyphénols (flavonoides), huiles essentielles et tanins
- La partie aérienne est plus riche en extractibles que la partie souterraine
- Les polyphénols sont plus abondants que les flavonoides à cause de la présence des tanins
- Les flavonoides glycosilés sont plus abondants (fraction 1-ButOH) que les flavonoides aglycones (fraction acétate d'éthyle).

3.4. Résultats du fractionnement par colonne et analyse par CCM

Dans le but d'identifier quelques produits, l'extrait éthanolique de la partie aérienne (tiges, feuilles) a été soumis à un fractionnement par colonne sous vide couplée à une CCM, selon le schéma de la (fig.18). Les résultats de développement des CCM sont présentés en annexe 4 et exprimés par la (fig.19).

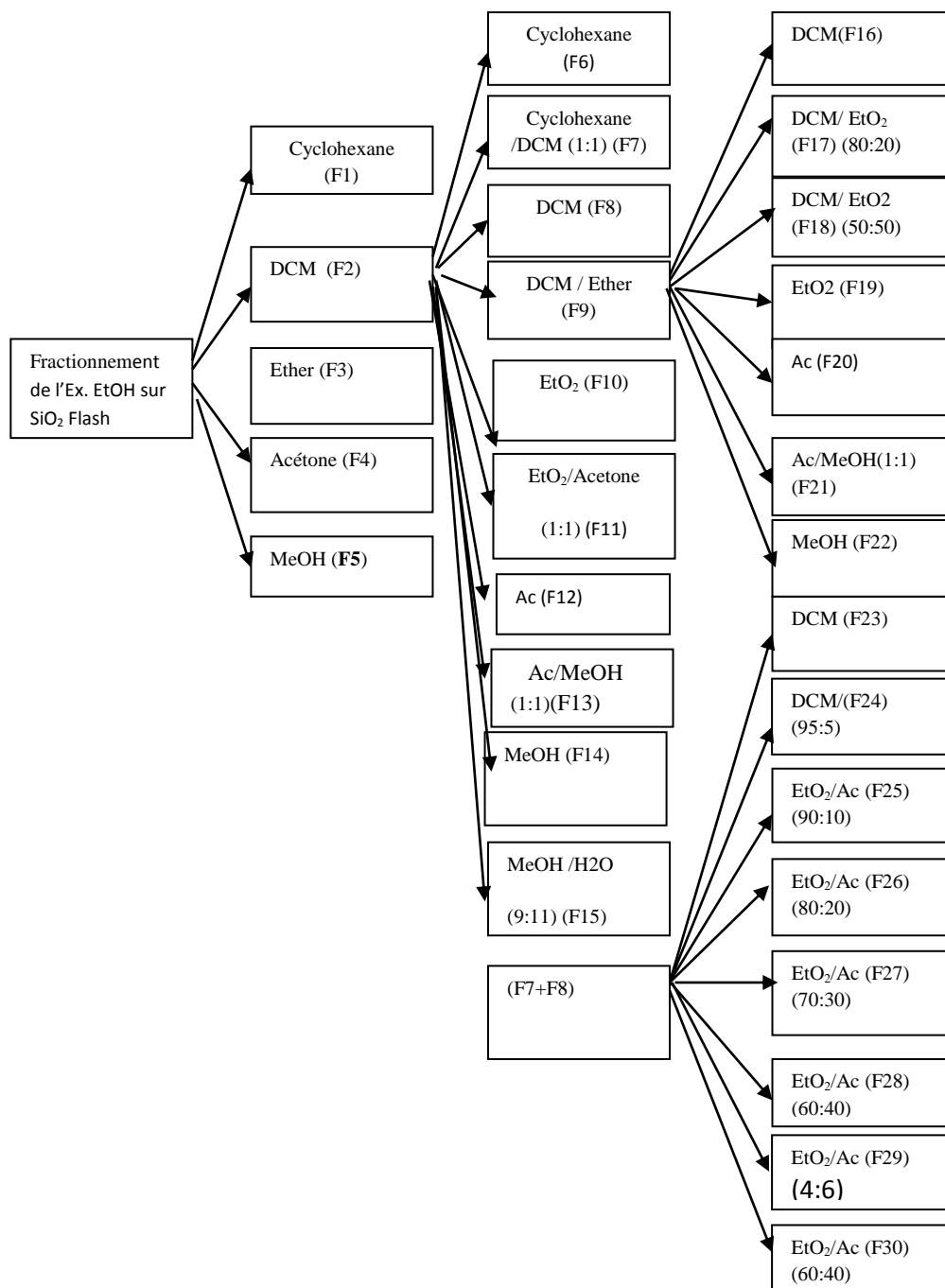
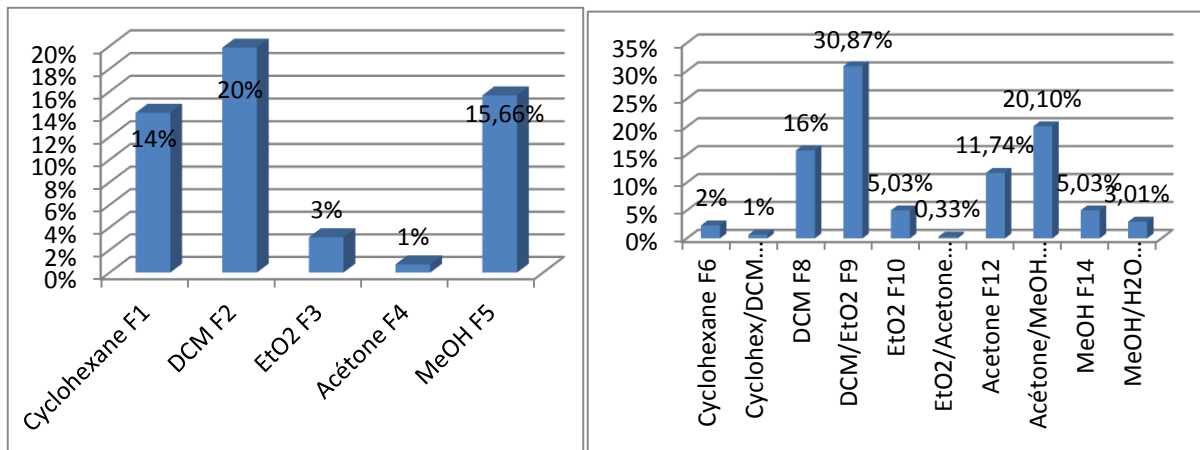
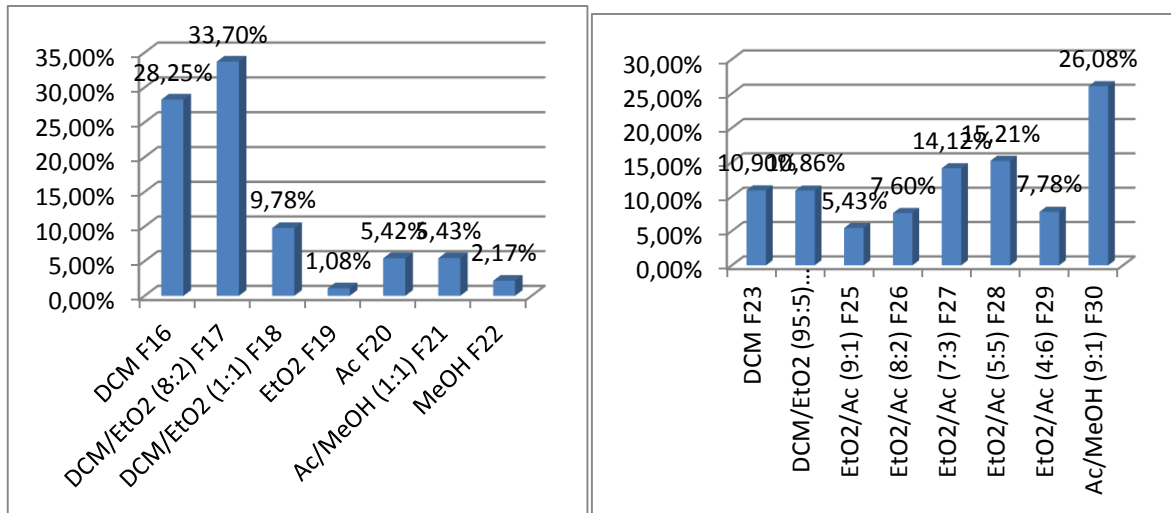


Figure 18 : Protocole de fractionnement de l'extrait éthanolique par colonne SiO₂ Flash



a) Fractionnement de l'Ex. EtOH sur SiO₂

b) Fractionnement de F2 (DCM) sur SiO₂



c) Fractionnement de F2.4 (DCM/ether) sur SiO₂

d) Fractionnement de (F2.7 + F2.8) (DCM) sur SiO₂

Figure 19 : Rendements (%) du fractionnement sur colonne SiO₂ Flash de l'extrait éthanolique de la partie aérienne (tiges, feuilles) de *N. amethystina*.

D'après les figures ci-dessus, on remarque que le MeOH contient moins d'extractibles, alors que la grande quantité est tirée par les solvants apolaires.

Les fractions recueillies ont été regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couches minces. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Chromatographie sur couche mince des extraits bruts et des fractions de *N. amethystina*

Les dépôts	Système éluant	Nbre de spots	Type de détection			
			U.V (254-365 nm)		vanilline sulfurique (1%) après chauffage à 120°C	AlCl ₃ (1%)
			Rf	couleur	couleur	couleur
HE brute	AcoEt /Tol (5/95)	1	0,42	violet	rose	-
		2	0,45	violet	rose	-
		3	0,47	violet	rose	-
		4	0,65	violet	-	-
		5	0,83	violet	-	-
HY	AcoEt /Tol (5/95)	1	0,47	violet	rose	-
		2	0,42	violet	rose	-
		3	0,51	violet	-	-
		4	0,83	violet	-	-
Ex. H ₂ O	AcoEt/MeOH/H ₂ O (78/13/1)	0	-	-	-	-
Ex.EOH	AcoEt/MeOH/H ₂ O (78/13/1)	1	0,53	violet	rose	Dépôts jaune
		2	0,72	violet	bleu violacé	
		3	0,85	violet	bleu violacé	
Ex.Et ₂ O	DCM/acétate d'éthyl (95/5)	1	0,50	violet	rose claire	Dépôts jaune
		2	0,70	violet	-	
		3	0,83	violet	-	
F1-F4	AcoEt/MeOH/H ₂ O (78/13/1)	1	0,75	violet	marron	-
		2	0,45	violet	rose	-

F5			0,46	violet	rose	-
F6-F8	AcoEt /Tol (5/95)	1	0,87	violet	vert	-
F9-F10	CHCl ₃ / AcoEt (50/50)	1	0,52	violet	rose	-
		2	0,43	bleu	-	-
F11-F15	CHCl ₃ / AcoEt (50/50)	1	0,46	violet	bleu	+
		2	0,32	-	-	-
		3	0,12	-	-	-
		4	0,08	-	-	-
F16-F17	AcoEt /Tol (5/95)	1	0,93	jaune	bleu clair	-
F18-F22	AcoEt /Tol (5/95)	1	0,86	rouge	-	-
		2	0,73	jaune	-	+
		3	0,63	jaune	-	+
		4	0,46	bleu	bleu clair	-
F23-F28	AcoEt/MeOH/H ₂ O (78/13/1)	1	0,69	violet	bleu clair	+
		2	0,79	violet	bleu clair	+
		3	0,96	violet	bleu clair	+
F29-F30	AcoEt/MeOH/H ₂ O (78/13/1)	1	0,86	jaune	bleu clair	+
		2	0,9	jaune	bleu clair	+

Au vu des résultats ci-dessus et selon la bibliographie, on remarque que la couleur et les R_f des spots sont révélateurs de la présence des iridoïdes de type lactones dans l'HE brute et l'HY (spot rose avec AlCl₃) (**Formisano et al., 2011**). Par contre, les autres couleurs (jaune, vert, bleu, marron) indiquent la présence des polyphénols entre autres des acides phénols et des flavonoïdes (**Bandyukova et Shinkarenko, 1973**). Cependant, le chlorure d'aluminium n'est pas spécifique aux flavonoïdes mais il réagit avec d'autres composés. Pour cela, d'autres techniques sont nécessaires (UV-V, CPG, HPLC et RMN) pour confirmer nos hypothèses.

3.5. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait de l'hydrolat par CPG et CPG/SM

Après l'extraction de l'huile essentielle des parties aériennes par hydrodistillation, la composition de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat ont été analysés par CPG et CPG/SM. Les résultats de l'analyse sont regroupés dans le **tableau 7** (voir profils chromatographiques en **annexe 5**).

Tableau 7: Composition chimique de l'huile essentielle (HE) et de l'extrait d'hydrolat (HY) de *Nepeta amethystina* récoltée à Aïn Sefra.

N°	Les constituants	RI ^a	RI ^b	HE	HY	Identification
1	(z)-Hex-2-en-1-ol	826	1405	Tr	-	RI, MS
2	α -Pinène	931	1022	0.20	-	RI, MS
3	Camphène	945	1066	Tr	-	RI, MS
4	Octan-3-one	959	1337	0.10	-	RI, MS
5	Sabinène	966	1120	Tr	-	RI, MS
6	β -Pinène	971	1110	0.41	-	RI, MS
7	p-Cymène	1014	1268	0.23	-	RI, MS
8	1,8-Cineole	1022	1209	0.45	2.25	RI, MS
9	(Z)- β -Ocimène	1024	1230	0.10	-	RI, MS
10	γ -Terpinène	1050	1243	Tr	-	RI, MS
11	Linalol	1086	1544	0.12	1.70	RI, MS
12	trans-p-Menth-2-en-1-ol	1123	1625	0.10	1.40	RI, MS
13	Camphre	1124	1517	0.21	1.31	RI, MS
14	Terpinène 4-ol	1166	1600	0.32	6.11	RI, MS
15	α -Terpinéol	1181	1700	0.41	2.80	RI, MS
16	Myrtenal	1182	1498	0.21	0.11	RI, MS
17	trans-Pipéritol	1189	1738	0.40	1.50	RI, MS
18	Acétate de linalyl	1247	1565	Tr	-	RI, MS
19	Thymol	1277	2189	2.30	1.51	RI, MS
20	Acétate de bornyl	1280	1575	0.50	-	RI, MS
21	Carvacrol	1283	2219	0.35	0.23	RI, MS

22	4α, 7α, 7α-népétalactone	1333	1953	16.25	4.71	RI, MS, ¹ H et ¹³ C NMR
23	4α, 7α, 7β-népétalactone	1373	2019	72.40	49.21	RI, MS, ¹ H et ¹³ C NMR
24	(E)- β -Caryophyllène	1420	1591	0,60	0.31	RI, MS
25	α -Humulène	1453	1665	0.10	-	RI, MS
26	(E)- β -Farnésène	1452	1665	0.21	-	RI, MS
27	β -Ionone	1462	1923	Tr	-	RI, MS
28	α -Murolène	1494	1716	0.10	-	RI, MS
29	γ -Cadinène	1509	1752	0.20	-	RI, MS
30	Elemol	1536	2076	Tr	2.21	RI, MS
31	Spathuléol	1560	2119	Tr	1.20	RI, MS
32	Oxyde de Caryophyllène	1572	1980	0.40	1.31	RI, MS
33	τ -Cadinol	1631	2163	0.10	1.50	RI, MS
34	α -Cadinol	1643	2227	Tr	0.70	RI, MS
	Total			96.77	80.07	
	Teneurs (%)			0.60	0.39	
	Monoterpènes hydrocarbures			0,84	-	
	Monoterpènes oxygénés			94.72	73.15	
	sesquiterpenes hydrocarbures			0.61	-	
	Sesquiterpenes oxygénés			0.50	6.92	

Ir : Indices de rétention calculés sur colonne apolaire (a) et sur colonne polaire (p). Les abondances sont données sur colonne apolaire ; tr : trace < 0,05%.

D'après le **tableau 7**, les composés majoritaires identifiés dans l'HE et l'HY sont les népétalactones avec respectivement 88,62% et 51,83%). La nature des népétalactones a été élucidée par les indices de rétention et surtout par la RMN ¹³C. Cette dernière (voir analyse des fractions par RMN) nous a permis de mettre en évidence la présence de 4 α , 7 α , 7 β -népétalactone (72,4% et 49,21%) et de 4 α , 7 α , 7 α -népétalactone (16,25% et 2,66 %) respectivement. Bien que les monoterpènes oxygénés soient dominant dans les deux extraits, on remarque que l'hydrolat contient les mêmes composés que l'HE, excepté les hydrocarbures. Les autres classes,

sesquiterpènes hydrocarbonés et sesquiterpènes oxygénés sont faiblement présents dans l'HE mais dans l'HY les sesquiterpènes oxygénés sont présents en quantité appréciable (**fig.20**).

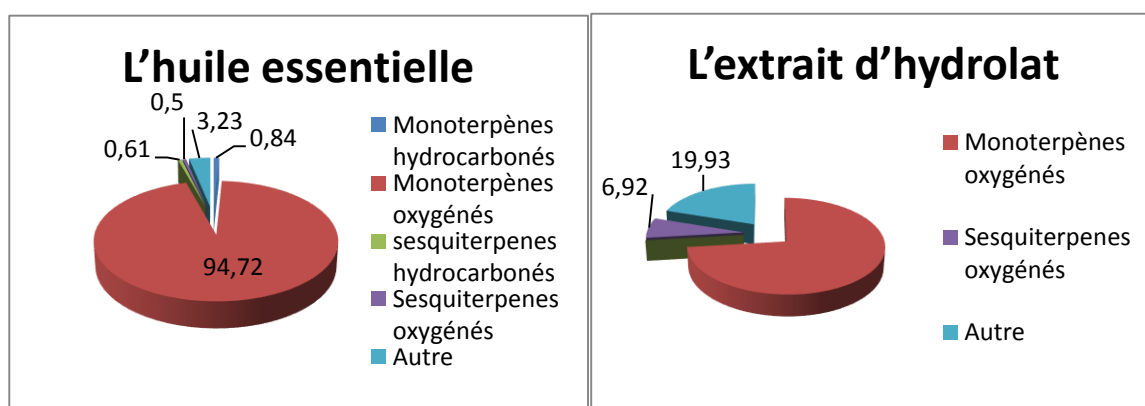


Figure 20: Composés volatiles de la partie aérienne de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *Nepeta amethystina*

En comparant nos résultats de la composition chimique de l'huile essentielle de *Nepeta amethystina* à d'autres travaux (**tableau 8**), on remarque que notre espèce est plus riche en isomère trans-cis népétalactone suivi de l'isomère cis-trans népétalactone, alors que la même espèce d'origine espagnole (**Velasco-Negueruela et al., 1989**) contient l'isomère trans-cis (39,4%) suivi de l'isomère cis-trans (41,9%) comme composés majoritaires. Par contre, les mêmes isomères de népétalactones sont retrouvés dans l'HE de *N. nepetella* d'Aïn Sefra (Algérie) (**Seladji, 2015**) mais avec des quantités variables. Aussi, l'aldéhyde myrténal, thymol et carvacrol sont rapportés pour la première fois dans ce travail.

Tableau 8 : Teneurs relatives des népétalactones d'huiles essentielles des travaux antérieurs

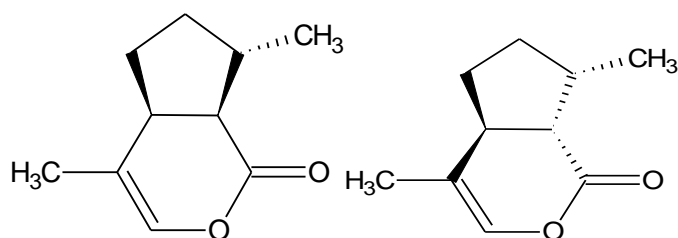
Espèces	Constituant (%)		Références
	4 α , 7 α , 7 α β népétalactone	4 α , 7 α , 7 α α népétalactone	
<i>N. amethystina</i>	39,42	41,88	Velasco-Negueruela et al. (1989)
<i>N. argolica</i> subsp. <i>argolica</i>	3,2-10,5	64,5-91,3	Tzakou et al. (2000)
<i>N. nepetella</i> subsp. <i>aragonensis</i>	2,8	5,05	Velasco-Negueruela et al., (1990)

<i>N. nuda</i>	37,6	37,5	Kokdil et al., (1999)
<i>N. nepetella</i>	64,3	0,7	Seladji (2015)
<i>N. amethystina</i>	72,40	16,25	Nos résultats

Selon la littérature, l'origine géographique, l'origine génétique, la période de récolte du matériel végétale et la saison sont les facteurs qui peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles (Sivropoulou et al., 1997).

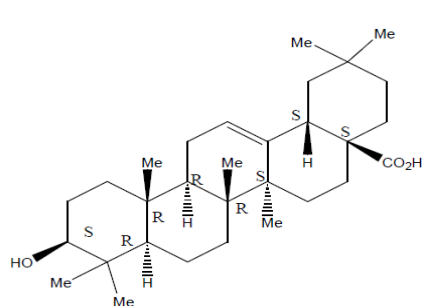
3.6. Analyse des fractions par RMN

Dans le but d'isoler et d'identifier de nouveaux produits, les fractions F16-F17 et F29-30 ont été soumises à un deuxième fractionnement par colonne fine. Les produits obtenus F31, F32 et la fraction F5 ont été analysés par la RMN ¹H et ¹³C en utilisant un appareil de type Bruker. Selon les signaux attribués (annexe 6), et en comparaison avec la banque spectral (Bradesei et al., 1996) et la bibliographie, la fraction 5 correspond aux **népétalactones**, la fraction **F31** a donné un produit correspondant à l'**acide oléanolique**, alors que la fraction **F32** correspond à l'**acide 7-déoxyloganique** (fig.21).

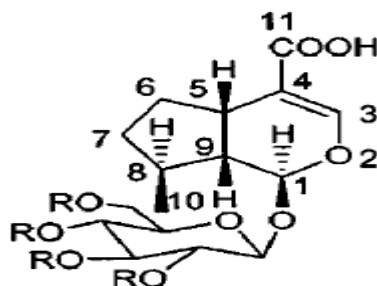


4α,7α,7αα-Nepetalactone (F5a)

4α,7α,7β-Nepetalactone (F5b)



Acide oléanolique (F31)



Acide 7-déoxyloganique (F32)

Figure21 : Principaux produits identifiés par la RMN¹H et ¹³C

Les trois produits présumés par la RMN ^{13}C sont rapportés dans la littérature, mais sont cités pour la première fois dans *N. amethystina*. Selon la bibliographie, les népétalactones sont douées de pouvoirs antibactérien et antifongique (Stojanović *et al.*, (2005) ; Ljaljević Grbić *et al.*, (2008). L'acide oléanolique possède plusieurs activités, antifongique, antitumeur, antiinflammation, antihyperglycémique et inhibe la peroxydation lipidique (Liu, 1995). Par contre le produit acide 7-déoxyloganique inhibe la P450 des bactéries et en particulier des champignons en présence du kétokénazole (Nobuyuki *et al.*, 2001).

3.7. Analyse par HPLC

Dans le but de caractériser les polyphénols de *N. amethystina*, la fraction 1-ButOH a subi une hydrolyse acide selon la méthode de Robles *et al.*, (1998). Les chromatogrammes d'HPLC des extraits au MeOH, à l'AcoEt et au 1-ButOH (après hydrolyse acide) sont représentés ci-dessous.

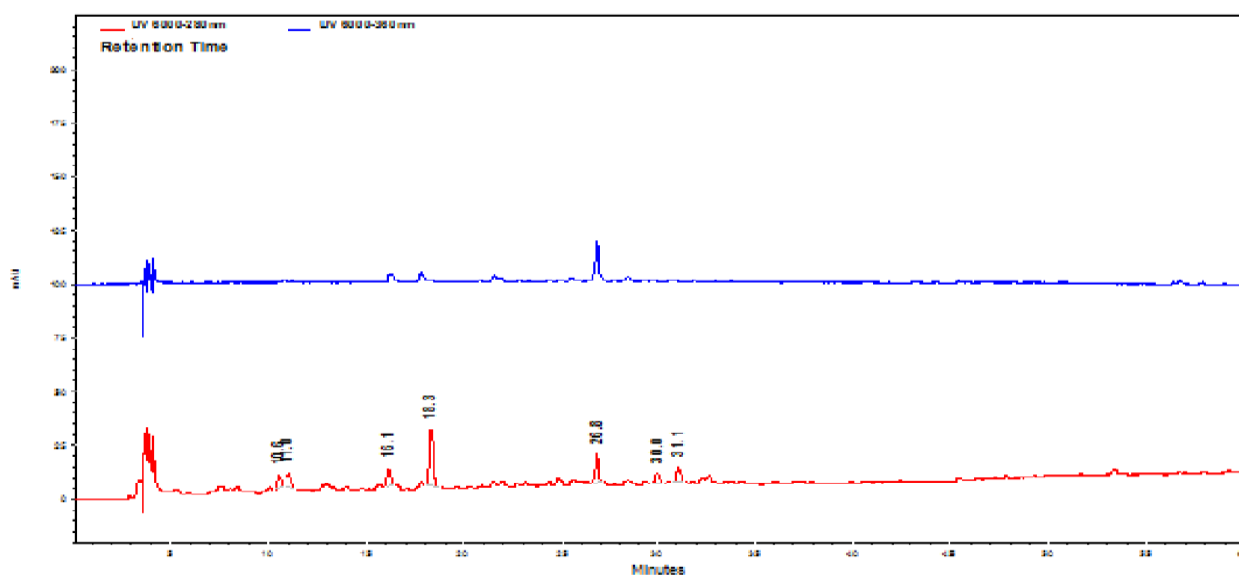


Figure 22 : Chromatogramme HPLC de l'extrait au méthanol de la partie aérienne (feuilles, tiges) de *Nepeta amethystina*

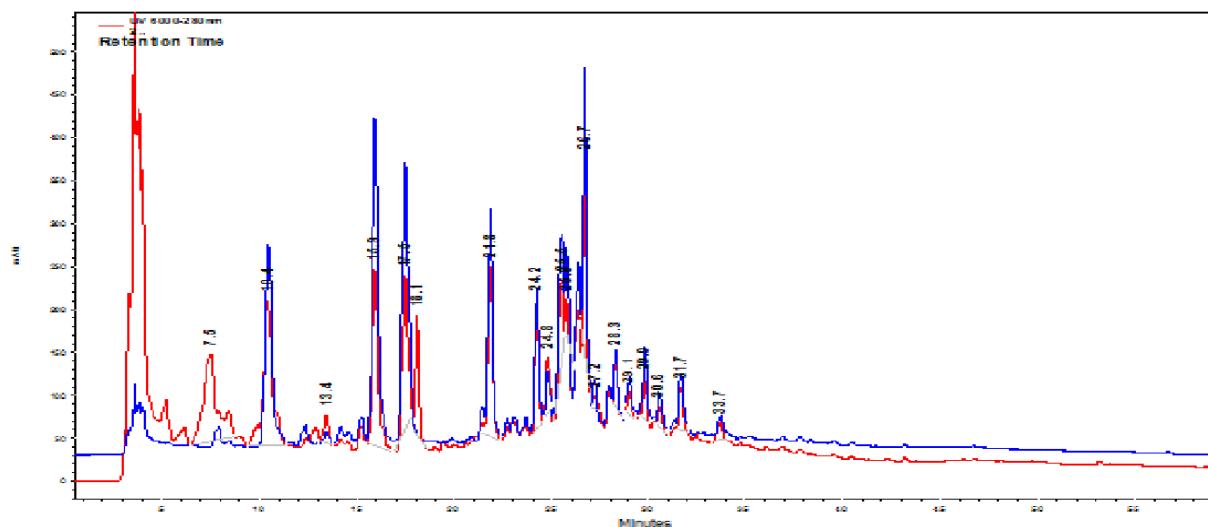


Figure 23: Chromatogramme HPLC de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la partie aérienne (feuilles, tiges) de *Nepeta amethystina*

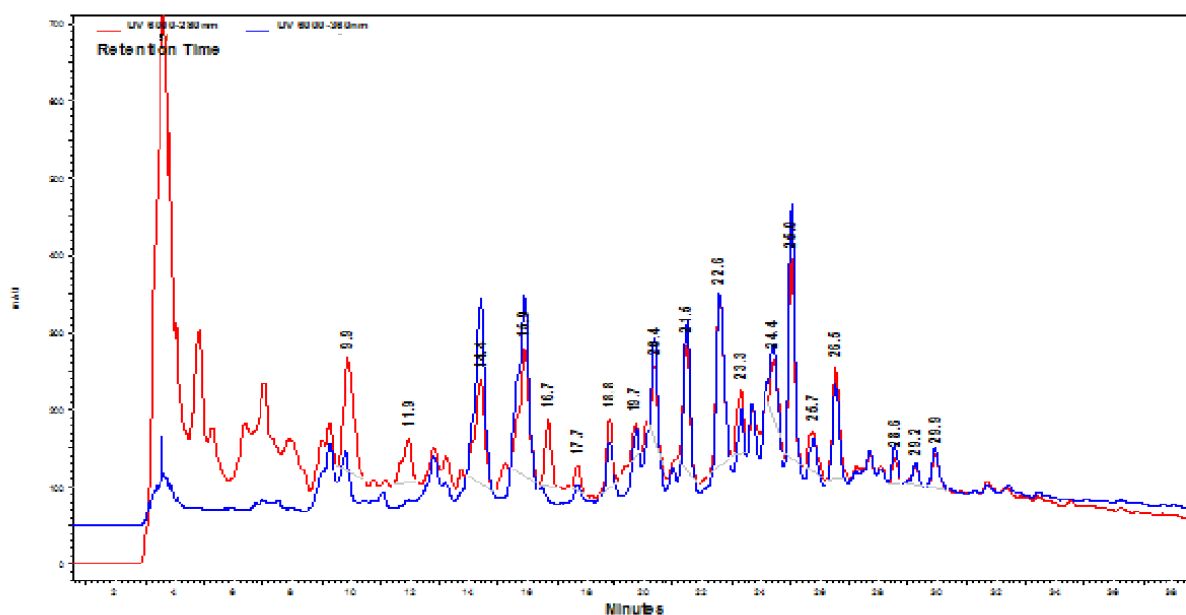


Figure 24 : Chromatogramme HPLC de l'extrait au 1-ButOH de la partie aérienne (feuilles, tiges) de *Nepeta amethystina*

D'après les l'analyse des spectres UV en vol (**annexe 7**) et les temps de rétention des témoins (**tableau 9**) comparés à ceux enregistrés dans les différents chromatogrammes des trois extraits (**tableau 10**), on a pu attribué les pics à certains polyphénols.

Tableau 9 : Temps de rétention des flavonoïdes standards.

Temps de rétention (min)	flavonoïde Standard
Acide gallique	3,79
catéchine	9,85
Acide 3,4-diOH benzoïque	11,90
Acide 2-OH benzoïque	13,41
Acide chlorogénique	14,39
Acid caféique	15,94
Acide syringique	17,68
Acide sinapique	18,22
Acide p-coumarique	18,38
Acide férulique	19,30
Acide cinnamique	25,53
Acide rosmarinique	26,40
naringénine	27,90
rutine	28,51
Acide élagique	29,10
myricétine	29,83
quercétine	29,99
apigénine	30,59
kampferol	31,77

Tableau 10 : Temps de rétention des flavonoïdes présents dans les extraits de *N. amethystina*

Temps de rétention (min)			Polyphénol identifié
MeOH	AcOEt	1-ButOH	
-	7.54	-	nd
-	-	9.85	Cathéchine
10.57	10.44	-	nd
11.90	-	11.91	Acide 3,4-diOH benzoïque
-	13.42	-	Acide 2-OH benzoïque
-	-	14.40	Acide chlorogénique
-	15.94	15.95	Acid caféique
16.12	-	16.67	nd
-	17.68	17.68	Acid syringique
18.38	18.37	18.38	Acide p-coumarique
-	-	19.72	nd
-	-	20.35	nd
-	21.830	21.47	nd
-	-	22.57	nd
-	-	23.31	nd
-	24.22	24.43	nd

-	24.80	-	nd
-	25.52	25.53	Acide cinnamique
-	25.77	25.70	nd
-	26.67	26.52	nd
-	27.17	-	nd
-	28.26	28.55	nd
-	29.05	29.24	nd
29.99	29.99	-	Quercétine
-	30.61	-	nd
31.77	31.76	-	Kampférol

nd : non déterminé

Les résultats montrent l'abondance des acides de type hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (7). Les extraits à l'AcoEt et au 1-ButOH sont plus riches en composés phénoliques identifiés que l'extrait au MeOH. Ceci, montre la sélectivité des solvants dans l'extraction de ces composés. On note la présence d'autres composés non identifiés par manque de substances standards.

Les travaux de **Bermejo Benito et Serranillos (1984)** ont mis en évidence chez *N. nepetella* par CCM et par UV-V les flavonoïdes 6-hydroxylutéoline, dimatin et 7,4'-O-diméthylescutelareine. **Saez et al., (1985)**, qui ont utilisé le même système de gradient ont révélé chez *N. nepetella* et *N. tuberosa* la présence des acides phénoliques comme les acides caféique, férulique, siringique, 4-hydroxybenzoïque, vanilique et p-coumarique.

Pour cette partie analytique de *N. amethystina* :

- Le fractionnement et la CCM ont permis de mettre en évidence l'empreinte du pool phénolique et terpénique.
- L'analyse de l'huile brute et de l'extrait d'hydrolat par CPG/SM a montré l'abondance des népétalactones de type trans-cis.
- L'analyse de 3 fractions majoritaires par ¹H et ¹³C RMN a permis de faire une approche moléculaire en identifiant les népétalactones, l'acide oléanolique et l'acide 7-déoxyloganique.
- L'analyse par HPLC des extraits (MeOH, AcoEt, 1-ButOH) a montré la présence des acides phénoliques et de quelques flavonoïdes.

4. Evaluation *in vitro* des activités biologiques

4.1. Etude de l'activité antimicrobienne

4.1.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

Les résultats du pouvoir antibactérien et anti-candida des différents extraits de *N. amethystina* sont présentés dans le **tableau 11**.

D'après les résultats du tableau ci-dessus, on remarque que l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat possèdent une bonne activité antimicrobienne avec des zones d'inhibitions de 12-45 mm. Par contre, les autres extraits n'ont pas montré d'activité.

Selon la sensibilité des souches, les levures se sont révélées plus sensibles que les bactéries avec des diamètres d'inhibitions de 32-45 mm et de 12-24 mm respectivement. Aussi, les bactéries Gram positif se sont montrées plus sensibles que les bactéries à gram négatif. Ces dernières possèdent une membrane qui présente une perméabilité sélective; la surface des lipopolysaccharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et des porines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire (**Garrett et Grisham, 2000**).

Tableau 11 : Résultats de l'activité antimicrobienne de *Nepeta amethystina* par la méthode de contact directe exprimés par le diamètre de zones d'inhibition (mm).

Les extraits Les Souches	HE	HY	F5		F31	F32	H ₂ O		Et ₂ O	EtOH	1-ButOH	AcoEt	ATB		
	Les volumes ajoutées (µL)													GEN ^a	AmB ^b
	4	4	4	10	4	10	4	10	30	30	30	30	30	15µg	100 µg
<i>Escherichia coli</i>	11±1	9±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	22±0	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8±0	7±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	10±1	nd
<i>Enterococcus faecalis</i>	14±0	12±1	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	20±0	nd
<i>Klebsiella pneumonia</i>	8±0	8±0	6±0	6±0	6±	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	20±1	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	22±1	18±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	21±0	nd
<i>Bacillus cereus</i>	24±1	18±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	20±1	nd
<i>Listeria monocytogenes</i>	12±1	10±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	20±1	nd
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	19±0	15±0	10±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	18±1	nd
<i>Bacillus subtilis</i>	20±1	20±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	19±0	nd
<i>Candida albicans</i> ATTC 10231	45±1	37±1	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	nd	18±0

<i>Candida albicans</i> IPP 444	37±1	32±1	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	nd	25±1
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	40±1	35±1	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	nd	20±1

Tous les résultats présentés dans ce tableau sont \pm écart type de trois répétitions

nd : Non déterminé; **ATB**: antibiotiques ; **GEN^a**: Gentamicine ; **AmB^b**: Amphotéricine

Les mécanismes probables du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles (**fig.25**), sont basés sur le contact direct de leurs composés hydrophobes avec la membrane cellulaire, et leur pouvoir de répartir les phospholipides en les rendant plus perméables ce qui pourrait causer des dommages structuraux ou une rupture complète des membranes cellulaires, et des pertes de nutriments. (**Pierozan et al., 2009**).

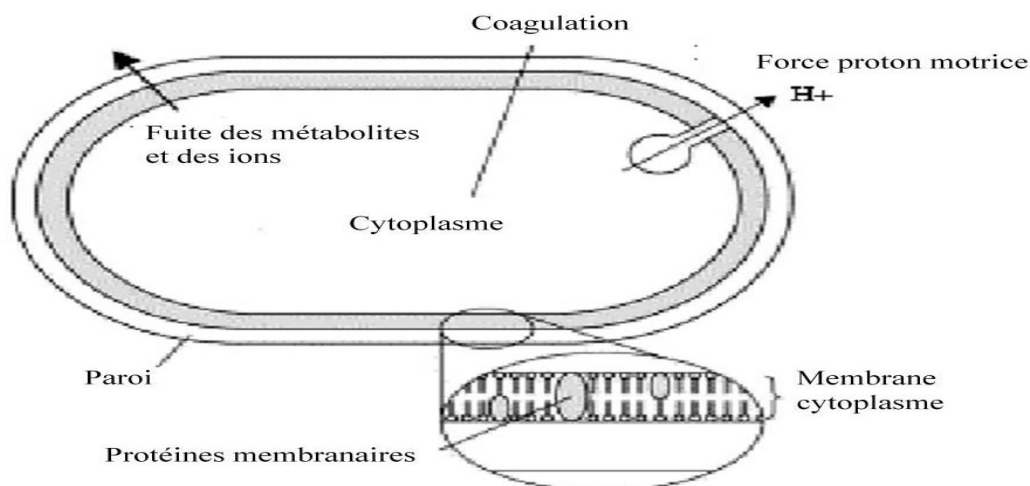


Figure 25: Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérés comme sites d'action pour les composés naturels (**Silva et al., 2010**).

Nos résultats obtenus sont différents de ceux obtenus par **Edewor et Usman (2011)** qui ont obtenu des zones d'inhibitions inférieures à 21mm avec *Nepeta cataria*. **Bandh et al., (2011)** ont enregistré une zone d'inhibition de 16mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec l'extrait aqueux de *Nepeta cataria*.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et l'hydrolat de la partie aérienne de *Nepeta amethystina* pourrait, en grande partie, être associés à ses majeurs constituants les népétalactones qui sont connus par leur pouvoir antimicrobien (**Farag et al., 1989**). De plus, divers composants mineurs peuvent également contribuer à l'activité antimicrobienne des huiles essentielles impliquant une synergie avec les autres composés actifs (**Mazari et al., 2010**).

4.1.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide

Les résultats des CMI des différents extraits vis-à-vis des bactéries et des levures sont consignés dans le **tableau 12**. Les Concentration minimales inhibitrice de l'HE et d'HY sont dans la fourchette de 0,42- 40 mg/ml.

Tableau 12 : Résultats de l'activité antibactérienne et anti-levure des extraits de *N. amethystina* exprimés par CMI (mg/mL).

Microorganismes \ Extraits												
	HE	HY	F5	F31	F32	H ₂ O	Et ₂ O	EtOH	1-ButOH	AcoEt	GEN ^a	AmB ^b
<i>Escherichia coli</i>	20±0,000	40±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4±0,000	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40±0,000	40±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4±0,000	nd
<i>Enterococcus faecalis</i>	10±0,000	20±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4±0,000	nd
<i>Klebsiella pneumonia</i>	40±0,000	40±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4±0,000	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.25±0,000	1.25±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2±0,000	nd
<i>Bacillus cereus</i>	1.25±0,000	2.5±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	20,000	nd
<i>Listeria monocytogenes</i>	10±0,000	20±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2±0,000	nd
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	1.25±0,000	2.5±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2±0,000	nd
<i>Bacillus subtilis</i>	1.25±0,000	2.5±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2±0,000	nd
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.42±0,000	0.52±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1±0,000
<i>Candida albicans</i> IPP 444	0.52±0,000	1.25±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1±0,000
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	0.62±0,000	1.25±0,000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1±0,000

Tous les résultats présentés dans ce tableau sont \pm écart type de trois répétitions. **nd** : Non déterminé

D'après les résultats du tableau 13, on remarque que l'HE a enregistré la plus faible CMI envers *C. albicans* ATCC10231 (0,42 mg/ml) suivi par l'HY (0,52mg/ml). Par contre pour les autres extraits on n'a pas déterminé de CMI. Ces résultats confirment bien ceux obtenus par la méthode de contacte directe.

En comparant nos résultats avec ceux des travaux antérieurs, **Nestorović et al., (2010)** ont trouvé des CMI d'extraits méthanolique des espèces *N. rtanjensis*, *N. sibirica* et *N. nervosa* entre 50 à 200 µg/ml.

4.1.3. Essai anti-moisissure

Pour le test anti-moisissure, nous avons évalué l'action des extraits (HE, HY, H₂O, MeOH) sur la croissance d'*A. flavus* et *C. herbarum*. Les résultats obtenus sont montrés dans le **tableau 13**.

Tableau13: Effets des extraits (HE, HY, H₂O, MeOH) de *N. amethystina* sur la croissance des hyphes *Aspergillus flavus* et *Cladosporium herbarum*.

Moisissures	Volume (µl)	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (I%) des extraits			
		HE	HY	MeOH	H ₂ O
<i>Aspergillus flavus</i>	10	4,75	12,5	3,5	5
	50	40,47	37,5	12,5	16,7
	100	100	66,66	37,5	31,6
<i>Cladosporium herbarum</i>	10	27,71	2,4	2	3,8
	50	68,67	45,78	13,7	11,5
	100	79,51	61,44	29,5	28,5

Selon les extraits, on remarque des différences d'activités sur la croissance des hyphes des deux moisissures et que le pouvoir antifongique est proportionnel à la concentration des extraits. Avec un volume de 100 µl d'HE, il y a une inhibition totale d'*A. flavus* et une

inhibition de 79,51% de *C. herbarum*. Quand à l'hydrolat de *Nepeta amethystina*, il y a une inhibition d'*A. flavus* et *C. herbarum* avec un taux de 66,66 et 61,44% respectivement. Par contre, les extraits aqueux et méthanolique ont enregistrés de faibles taux d'inhibitions.

4.1.4. Activité antibiofilm

Pour l'activité antibiofilm, nous n'avons testés que les extraits (HE, HY, AcoEt, 1-ButOH) vis-à-vis de *C. albicans*. Les résultats de CMIB et CMEB des extraits envers *Candida albicans* en état biofilm sont présentés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Effet des extraits (HE, HY, AcoEt, 1-ButOH) de *N. amethystina* vis-à-vis *Candida albicans* en état du biofilm, exprimée par les concentrations minimales inhibitrices (CMIB) et éradicatrices (CMEB) du biofilm (mg/ml).

Les souches	HE		HY		AcoEt		1-ButOH	
	CMIB	CMEB	CMIB	CMEB	CMIB	CMEB	CMIB	CMEB
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	60	60	3,75	7.5	2,5	2,5	1	1
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	30	30	1,875	3.75	2,5	2,5	1	1
<i>C. albicans</i> IPP 444	30	60	1,875	3.75	5	5	1	1

D'après les résultats ci-dessous, on remarque bien que les CMEBs sont plus ou moins grandes par rapport à celles des CMIBs. Les fractions acétate d'éthyle et 1-butanol sont plus actif sur *C. albicans* (CMIB : 2,5 mg/ml et 1mg/ml respectivement). Par contre, l'extrait d'hydrolat s'est révélé plus actif que l'HE vis à avis de *C. albicans* à l'état biofilm. La souche 10231 à le pouvoir de formé le biofilm plus que les autres souches.

La littérature n'apporte pas d'étude sur l'effet d'extrait de *Nepeta* sur la formation de biofilm de *C. albicans*. Par contre, d'autres travaux ont montré que l'huile essentielle de *Thymus capitata* réduit le métabolisme du biofilm formé par *C. albicans* à un taux de 62,71 % et sur la réduction de sa biomasse à un taux de 71,96 % (**Palmeira-de-Oliveira et al., 2012**).

4.2. Etude du pouvoir anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire des extraits a été évaluée in vitro par deux méthodes : le piégeage du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).

4.2.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Le test au DPPH est le plus souvent utilisé pour sa rapidité de criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et al., 2008).

Le radical libre DPPH est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté par les composants des extraits testés (fig.26). L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de l'extrait et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cet extrait.

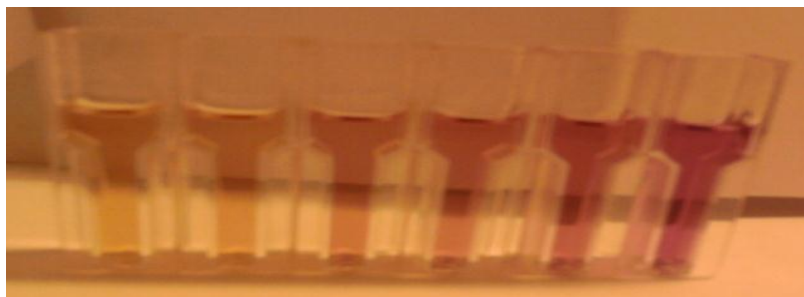


Figure 26 : Photo de l'Influence de la concentration d'HE sur l'intensité de la couleur du DPPH

Ce virage de couleur est accompagné d'une diminution de l'absorbance (DO) qui peut s'exprimer par le pourcentage de réduction de DPPH. Conventionnellement, une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres, est considérée comme une forte activité antioxydante.

Afin de comparer cette activité antioxydante avec celle de l'acide ascorbique et le BHT, des courbes d'étalonnage sont réalisées et tracer (annexe 8).

Les résultats du taux d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations d'HE, d'HY et des différents extraits (H₂O, EtOH, Et₂O, MeOH, AcoEt, ButOH) sont présentés ci-dessous (fig. 27, 28 et 29).

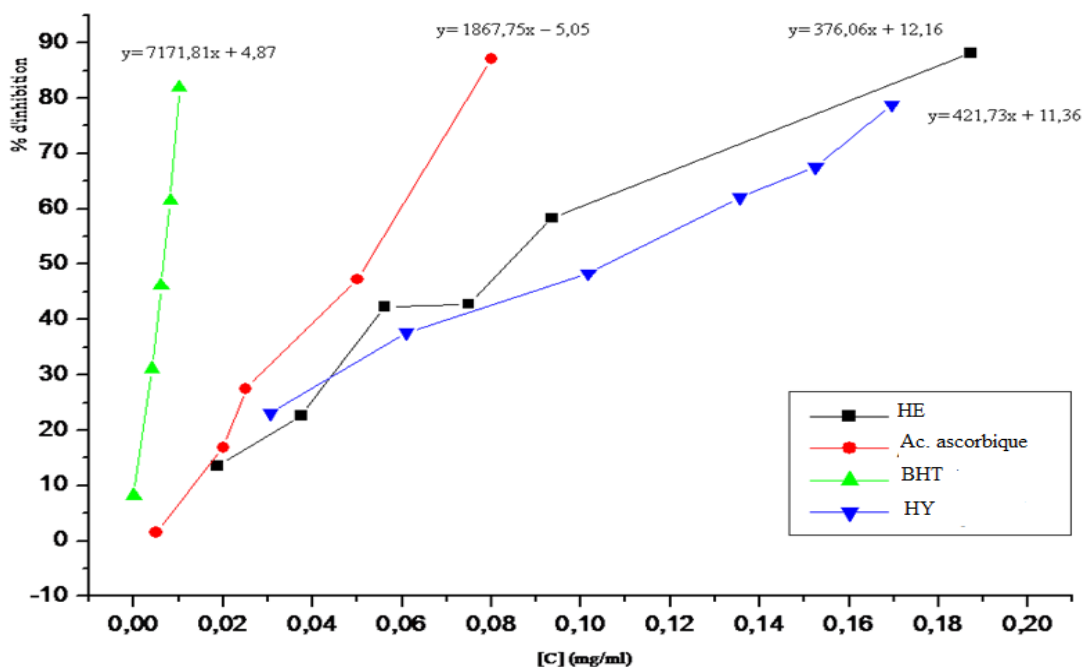


Figure 27 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations d'HE et de l'HY par rapport à l'acide ascorbique et BHT

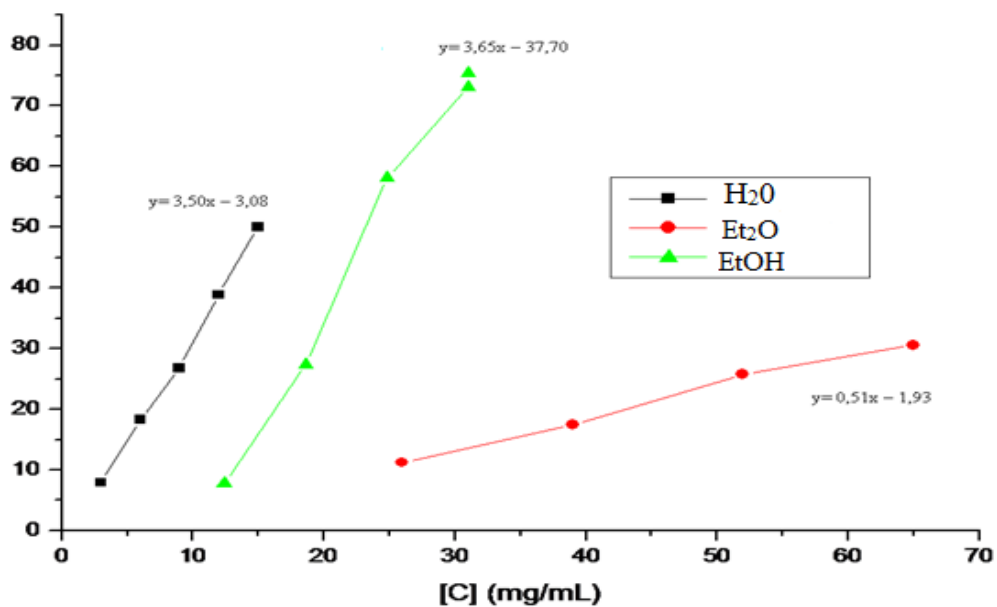


Figure 28 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits (H₂O, EtOH, Et₂O)

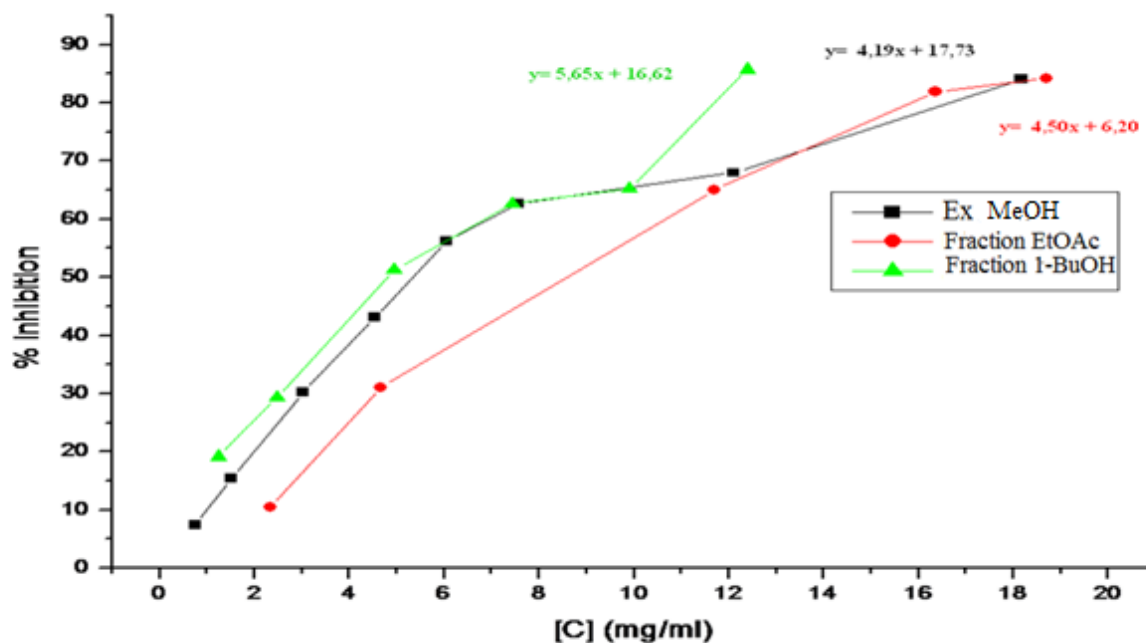


Figure 29: Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations des fractions flavonoïdiques (methanolique; EtOAc; 1-ButOH)

On remarque que tous les extraits testés ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 517nm selon leurs concentrations, sauf pour l'extrait éthérique qui s'est montré moins actif que les autres extraits.

On peut exprimer l'activité antioxydante des extraits par l'indice IC₅₀. C'est un paramètre qui définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH (Abdulmajed *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2012 ; Ranga *et al.*, 2009). Ces IC₅₀ sont déterminées à partir des graphes dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage (**tableau15**). Plus la valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Tableau 15: Valeurs des IC₅₀ des extraits de *N. amethystina*

Les extraits	IC ₅₀ (mg/ ml)
H ₂ O	56,9319
EtOH	24,0301
MeOH	7,7013
AcoEt	9,7419
1-ButOH	6,0009
HY	0,1006
HE	0,0916
Acide ascorbique	0,0295
BHT	0,0063

D'après le tableau 6, on constate que les IC₅₀ varient de 0,0063 à 56,9319 mg/mL. Le BHT et l'acide ascorbique ont montré une forte activité antioxydante avec une IC₅₀ de l'ordre de 0,0063mg/ml et 0,0295 mg/ml respectivement. Tous les extraits ont enregistré un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH. Suivant ce paramètre, les capacités de balayage du radical sont classées dans l'ordre décroissant :



Nos résultats corroborent ceux de **Seladji et al. (2014)** qui ont obtenu le même pouvoir de piégeage de DPPH par les extraits éthanolique et aqueux de *N. nepetella*.

4.2.2. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

La méthode est basée sur la réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺. C'est une technique simple, rapide et reproductible (**Benzie et Strain, 1995**). La présence des réductants dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe³⁺/complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (**Chung et al ., 2002**).

En d'autre terme, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi-quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox (Amarowicz et al., 2004).

Les résultats obtenus par la méthode de FRAP sont illustrés par les fig.30a et 30b.

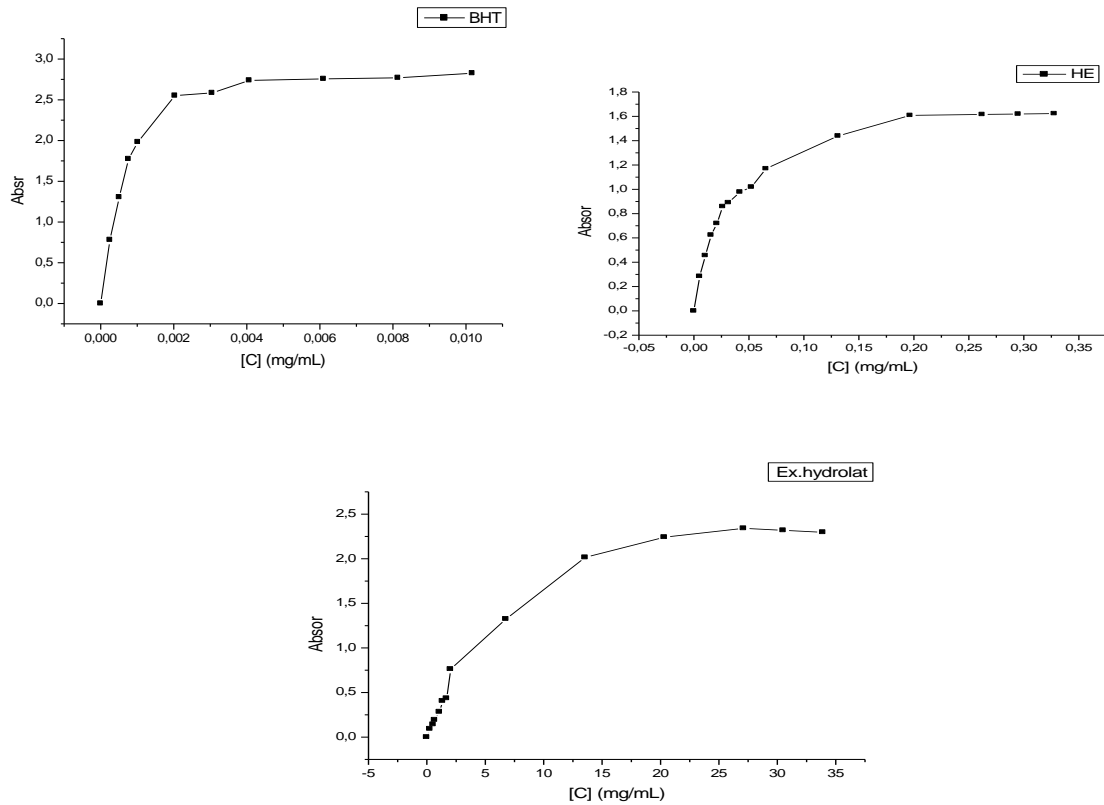
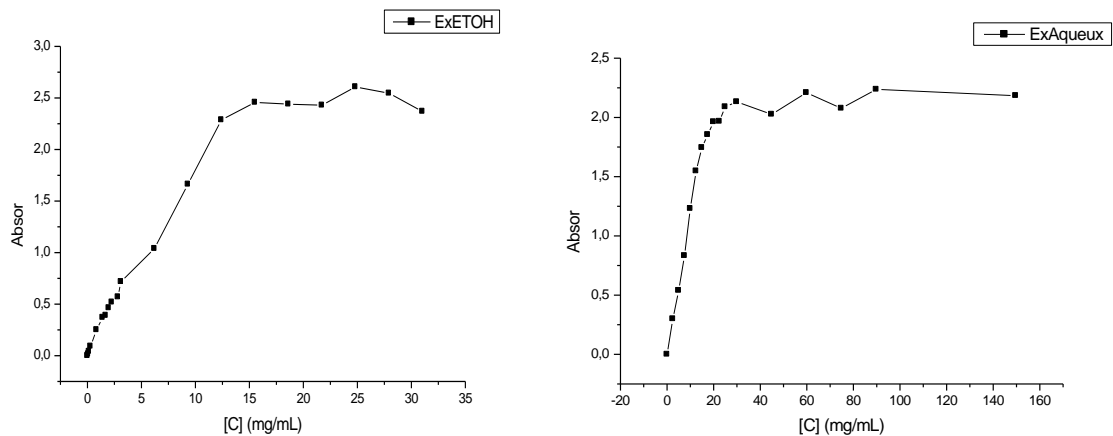


Figure 30a : Résultats du pouvoir réducteur de l'ion ferrique par le BHT, l'HE et l'HY de *N. amethystia*



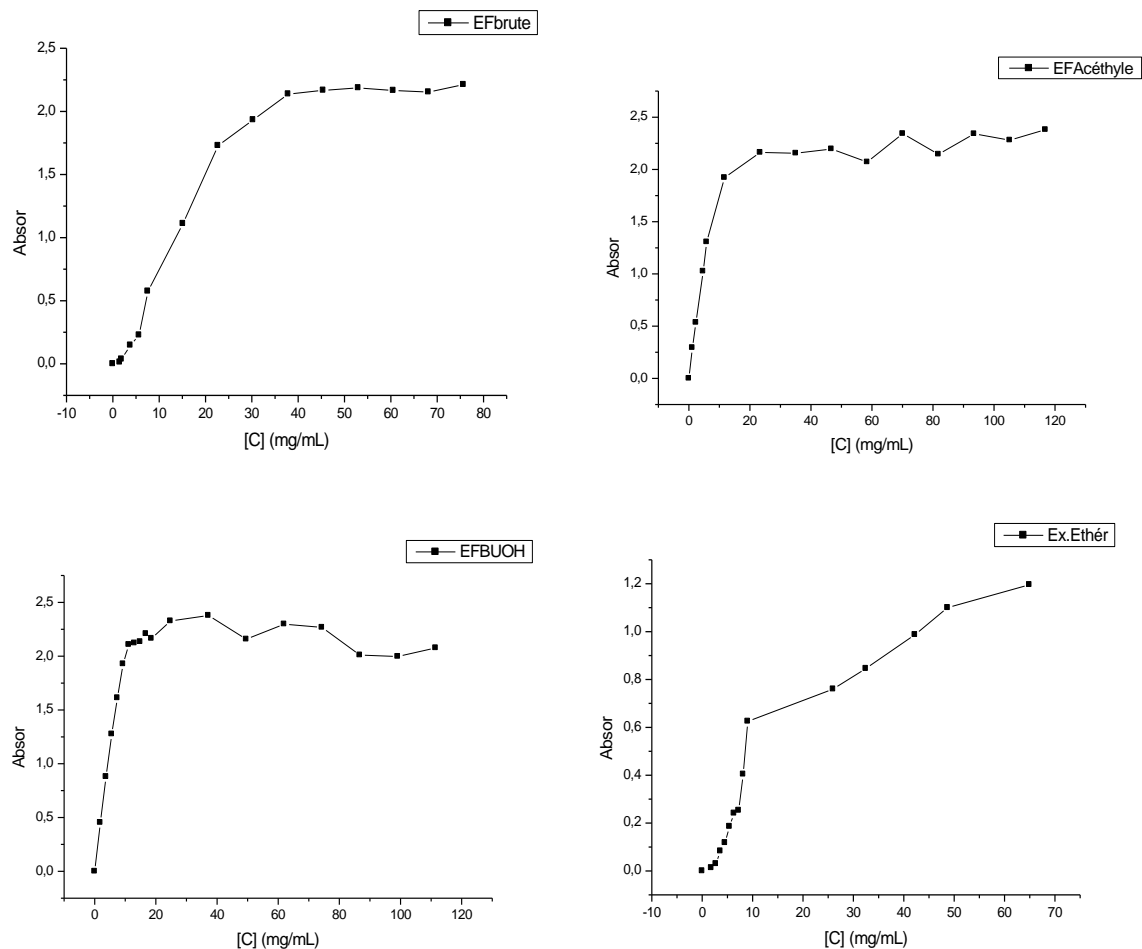


Figure 30b: Résultats du pouvoir réducteur de l'ion ferrique par les extraits (H₂O, EtOH, Et₂O, MeOH, AcoEt, 1-ButOH) de *Nepeta amethystina*

Les résultats obtenus confirment le potentiel antioxydant de l'HE, de l'HY et des extraits H₂O, EtOH, Et₂O, MeOH, AcoEt, 1-ButOH de *Nepeta amethystina*. En effet, les tests montrent que nos extraits possèdent une bonne affinité pour les ions Fe³⁺. Cette capacité de réduction des radicaux libres de *Nepeta amethystina* est due, principalement, à leur profil chimique riche en composés phénoliques. Ces composés, grâce à leurs propriétés d'oxydo-réduction, agissent en tant qu'agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et d'oxygène singulier (Tepe et al., 2007; Rice-Evans et al., 1995).

En général, la synergie des différents constituants d'une huile essentielle ou extrait est à l'origine du pouvoir antioxydant (Vardar-Unlü et al., 2003).

Dans cette partie d'activités, on peut dire que :

- l'HE et l'extrait d'hydrolat ont montré une grande activité antifongique à l'état planctonique. Par contre en état biofilm, l'extrait d'hydrolat s'est montré plus actif que l'HE.
- Bien que la littérature rapporte l'activité des polyphénols, nos extraits (acides phénols, flavonoides, acide oléanolique et acide 7-déoxyloganique), n'ont pas enregistrés d'activité. Ceci, peut s'expliquer par (i) un manque de purification des produits isolés, (ii) un manque de standardisation des méthodes et (iii) faible diffusion des extraits.....etc.
- Pour l'activité de l'HE et de l'extrait d'hydrolat, les népétalactones, constituants majeurs des deux extraits sont responsable de cette activité. Ce résultat est confirmé par d'autres chercheurs qui rapportent que les népétalactones sont douées d'un grand pouvoir antimicrobien et que l'isomère trans-cis-népétalactone est plus actif que l'isomère cis-trans-népétalactone (**Gkinis et al., 2003**).
- Aussi, l'HE et l'extrait d'hydrolat ont montré une grande activité antiradicalaire.

Conclusion Générale

Le présent travail avait pour but d'évaluer les activités antimicrobienne et antiradicalaire des extraits de *Nepeta amethystina* récoltée à Ain-Sefra. Il s'inscrit dans la thématique des travaux de recherche de l'équipe «Substances Naturelles Antimicrobiennes (SNA)-laboratoire LAMAABE».

Les objectifs assignés étaient de déterminer (i) la composition chimique de l'huile essentielle, de l'hydrolat et des flavonoïdes de *Nepeta amethystina*, inexplorés jusqu'à ce jour (ii) les pouvoirs antimicrobien et antiradicalaire des différents extraits.

Le criblage phytochimique des parties aérienne et souterraine par extraction aux solvants de polarité différents a révélé la présence des différentes familles chimiques en particulier les flavonoides, les terpènes et les tanins. La partie aérienne était plus riche en extractibles (40%) que la partie souterraine (18%). L'extrait aqueux de la partie aérienne (tiges, feuilles) est plus riche en extractibles phénoliques (11,84 mg EAG /gMs) que les autres extraits étherique (7,93mg EAG /gMs) et éthanolique (5,62 mg EAG /gMs). Par contre, les flavonoides glycosilés sont plus abondants dans l'extrait 1-ButOH (7,68 mg EQ/g Ms) que l'extrait acétate d'éthyle (0,53 mg EQ/g Ms) et l'extrait MeOH (0,23 mg EQ/g Ms).

L'analyse par CPG/SM de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat a montré la richesse de ces deux extraits en népétalactones de type trans-cis (72,40% et 49,21% respectivement) en plus de l'aldéhyde myrténal, thymol et carvacrol rapporté pour la première fois. La RMN (¹³C, ¹H) a permis l'identification par approche moléculaire de népétalactones, acide oléanolique et acide 7-déoxyloganique. L'analyse par HPLC des extraits (MeOH, AcoEt, 1-ButOH) a montré la présence des acides phénoliques (acides caféique, siringique, hydroxybenzoïque, p-coumarique, chlorogénique, cinnamique) et des flavonoides (cathéchines, quercétine, kampférol).

L'évaluation in vitro des activités antiradicalaire (DPPH et FRAP) et antimicrobienne a montré que l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat ont exprimé une bonne activité antioxydante (IC₅₀= 0,0916 mg/ml et 0,1006 mg/ml respectivement) et antifongique avec une zone d'inhibition de 32- 45 mm et une CMI <0,52mg/ml pour *Candida*. Pour les moisissures, les deux extraits (huile et hydrolat) ont enregistré plus de 60% d'inhibition de la croissance. Par contre, *C. albicans* à l'état biofilm, c'est montré plus sensible aux fractions acétate d'éthyle et 1-butanol que les autres extraits (CMIB : 2,5 mg/ml et 1mg/ml respectivement) et que l'extrait d'hydrolat s'est révélé plus actif que l'huile essentielle.

Au vu des résultats obtenus, on peut dire que l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat peuvent jouer un rôle important dans le traitement des infections. Ainsi, les eaux florales constituent un bon solvant pour les préparations pharmaceutiques, cosmétiques et culinaires.

Cependant, ce travail ne constitue qu'une ébauche dans le domaine de recherche des antiradicalaires et des antimicrobiens naturels, il serait intéressant de :

- tester les extrait de *Nepeta amethystina* in vivo afin de confirmer l'usage traditionnelle de cette plante,
- purifier et de déterminer d'autres métabolites, et d'étudier la toxicité de la plante et des extraits.

- Abad, M. J., Guerra, J. A., Bermejo, P., Irurzun, A., & Carrasco, L. (2000).** Search for antiviral activity in higher plant extracts. *Phytotherapy research*, 14(8), 604-607.
- Abdulmajed, K., McGuigan, C., & Heard, C. M. (2005).** Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. *Free radical research*, 39(5), 491-498.
- Adams, R. P. (1989).** Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Press,
- Adams, R. P. (2001).** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Pub. Corporation .
- Ahmad, V. U., Bano, S., Voelter, W., & Fuchs, W. (1982).** The Structure of Nepetidin a New Triterpenoid from *Nepeta handistana*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 37(12), 1675-1676.
- Ahmed, A. S., Elgorashi, E. E., Moodley, N., McGaw, L. J., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2012).** The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. *Journal of ethnopharmacology*, 143(3), 826-839.
- Al-Fattani, M. A., et Douglas, L. J. (2006).** Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of medical microbiology*, 55(8), 999-1008.
- Amarowicz R., Pegg R. B, P., Rahimi-Moghaddam P. , Barl, B. et. Weil, J. A (2004).** « Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies », *Food Chem.*, vol. 84, n° 4, p. 551-562.
- Andersson, C. M, Hallberg, A. et Hogberg, T. (1996)** « Advances in the development of pharmaceutical antioxidants », *Adv. Drug Res.*, vol. 28, p. 65.
- Ardestani, A., et Yazdanparast, R. (2007).** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, 104(1), 21-29.
- Aruoma, O. I. (1999).** Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radical Research*, 30 (6), 419-427.

- Atwal, R. (2003).** In vitro Antimicrobial Activity Assessment of Zymox Otic Solution against a Broad Range of Microbial Organisms. *Journal of applied research in veterinary medicine*, 1(3), 240-252.
- Aydin, S., Beis, R., Öztürk, Y., Hüsnü, K., & Baser, C. (1998).** Nepetalactone: a new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 50(7), 813-817.
- Bandh. S, Kamili. A, Ganai. B, Lone. B, Saleem. S, (2011).** *Journal of Pharmacy Research*,4(9),3141-3142
- Bandyukova V. A. et Shinkareako A. L. (1973).** The thin layer chromatography of flavonoids. *Chemistry of natural compounds*. 9 (1) : 17-21.
- Barlow S M. (1990).** Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson . B.J.F. *Food Antioxidants*. pp 253-307.
- Baser, K. H. C., Özek, T., & Tümen, G. (1995).** Composition of the essential oil of *Nepeta viscida* Boiss. from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 7(5), 569-570
- Baser, K. H. C., Demircakmak, B., Altintas, A., & Duman, H. (1998).** Composition of the Essential Oils of *Nepeta cadmea* Boiss. *Journal of Essential Oil Research*, 10(3), 327-328.
- Baser, K. H. C., Demircakmak, B., Altintas, A., & Duman, H. (1998).** Essential Oil of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. *Journal of Essential Oil Research*, 10(3), 299-300.
- Baser, K. H. C., Oözek, T., Bemirci, B., & Tümen, G. (2001).** Composition of the essential oil of *Nepeta betonicifolia* CA Meyer from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 13(1), 35-36.
- Bates, R.B et Sigel, C.W. (1963).** Terpenoids. Cis-trans-andtrans-cis nepetalactones. *Experientia*, 19(11), 564-565.
- Beaupin, C., Granger, R., Rossi, J. C., Passet, J., & Peyron, L. (1977).** L'huile essentielle de *Teucrium marum* Linnaeus de Corse. *Rivista Ital. Essenze, Profumi, Piante Off., Aromi, Saponi, Cosmet., Aerosol*59, 369-373.
- Beaupin, C. (1978).** Iridoïdes de l'essence de *teucrium marum* L. de Corse: déterminations structurales et synthèses (Doctoral dissertation) .

- Behera, B. C., Verma, N., Sonone, A., & Makhija, U. (2006).** Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *LWT-Food Science and Technology*, 39(1), 80-85.
- Bellesia, F., Grandi, R., Pagnoni, U. M., Pinetti, A., & Trave, R. (1984).** Biosynthesis of nepetalactone in *Nepeta cataria*. *Phytochemistry*, 23(1), 83-87.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., & Del Río, J. A. (1997).** Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4505-4515.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1995).** The effect of ascorbic acid on the measurement of total cholesterol and triglycerides: possible artefactual lowering in individuals with high plasma concentration of ascorbic acid. *Clinica chimica acta*, 239(2), 185-190.
- Bermejo Benito P. et Serranillos G.M., (1984) .** Contribucion al estudio de los compuestos flavonicos de la *Nepeta nepetella* (L.) (Labiatae). *An. Real. Acad. Farm.* 50: 459-464.
- Berthod, A., Carda-Broch, S., et Garcia-Alvarez-Coque, M. C. (1999).** Hydrophobicity of ionizable compounds. A theoretical study and measurements of diuretic octanol-water partition coefficients by countercurrent chromatography. *Analytical Chemistry*, 71(4), 879-888.
- Beuchat, L. R. (1976).** Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *Journal of Food Science*, 41(4), 899-902.
- Beylier-Maurel, M. F. (1976).** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana. EPPOS*, 58, 283-286
- Bicchi, C., Mashaly, M., & Sandra, P. (1984).** Constituents of essential oil of *Nepeta nepetella*. *Planta medica*, 50(01), 96-98.
- Bilgrami, K. S., Sinha, K. K., & Sinha, A. K. (1992).** Inhibition of aflatoxin production & growth of *Aspergillus flavus* by eugenol & onion & garlic extracts. *The Indian journal of medical research*, 96, 171.
- Bisht, M., & MATHELA, C. (1997).** Essential Oil of *Nepeta spicata* Benth. *Asian Journal of Chemistry*, 9(4), 612-615.

- Blankenship, J. R., & Mitchell, A. P. (2006).** How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current opinion in microbiology*, 9(6), 588-594.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., ... & Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086-1089.
- Bonnefont-Rousselot, D., Raji, B., Walrand, S., Gardes-Albert, M., Jore, D., Legrand, A., et Vasson, M. P. (2003).** An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*, 52(5), 586-589.
- Bottini, A. T., Dev, V., Shah, G. C., Mathela, C. S., Melkani, A. B., Nerio, A. T., et Sturm, N. S. (1992).** Cyclopentanomonoterpene enol acetates from *Nepeta leucophylla*. *Phytochemistry*, 31(5), 1653-1657.
- Boucher, M. E., Chaala, A., et Roy, C. (2000).** Bio-oils obtained by vacuum pyrolysis of softwood bark as a liquid fuel for gas turbines. Part I: Properties of bio-oil and its blends with methanol and a pyrolytic aqueous phase. *Biomass and Bioenergy*, 19(5), 337-350.
- Bounias, M. (1983).** L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince: choix de techniques utilisant les plaques pr Wefabriqu Wees sur supports souples. Paris etc.: Masson.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., et Gontier, E. (2001).** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
- Boyraz, N., et Özcan, M. (2005).** Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia*, 76(7), 661-665.
- Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J. (1996).** L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13. *Canadian J. Appi. Spectrosc.*, Partie 1, 4:15 —24, Partie 2, 4 :41-50.
- Braga, P. C., Culici, M., Alfieri, M., et Dal Sasso, M. (2008).** Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 31(5), 472-477

- 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.
- Brouillard, R., Chassaing, S., et Fougèrouse, A. (2003).** Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long. *Phytochemistry*, 64(7), 1179-1186.
- Bruneton J. (1999).** *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. 3^e Ed : Lavoisier ; Paris. p.1120.
- Bruneton J. (2009)** . *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris; Cachan: Éd. Tec & doc ; Éd. médicales internationales, 2009.
- Cantino, P., Harley, R. M., et Wagstaff, S. J. (1992).** Genera of Labiatae status and classification. Royal Botanic Gardens Kew.
- Cao YY, Dai BD, Wang Y, Huang S, Xu YG.(2008)** .In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrobial Agents*; 32: 73-77.
- Carson, C. F., et Riley, T. V. (1995).**Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of applied bacteriology*, 78(3), 264-269.
- Chalchat, J. C., & Lamy, J. (1997).** Chemical composition of the essential oil isolated from wild catnip *Nepeta cataria* L. cv. *Citriodora* from the Drôme region of France. *Journal of Essential Oil Research*, 9(5), 527-532.
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., et Lin, Y. (1998).** Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(6), 421-464.
- Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., et Chou S-T. (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 2454–2458 .
- CLSI ,(2006)** .Methods for Dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *Clinical and Laboratory Standards Institute* 26(2) .
- Conner, D. E. (1993).** Naturally occurring compounds. *Food Science and Technology-NEW York-Marcel Dekker-*, 441-441.

- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., et Palmas, F. (1999).** Invitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 130-135.
- Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, n° 4, p. 564-582.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000).** Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Dalleau, S., Cateau, E., Bergès, T., Berjeaud, J. M., & Imbert, C. (2008).** In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 31(6), 572-576.
- Davis, J. A. (1982).** Adsorption of natural dissolved organic matter at the oxide/water interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 46(11), 2381-2393.
- De Buochberg, M. S., Allegrini, S., Bessiere, C., Attisso, M., Passet, J., & Granger, R. (1976).** Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris* linnaeus, 527-536.
- Deans, S. G., et Svoboda, K. P. (1990).** The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 5(3), 187-190.
- Deliorman Orhan D., Özçelik B., Hoşbaş S., Vural M. (2012).** Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turkish Journal of Biology*, 36(6), 672-686.
- Diallo, A. S., Sarr, M., Mostefai, H. A., Carusio, N., Pricci, M., et Andriantsitohaina, R. (2008).** Cognac polyphenolic compounds increase bradykinin-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Physiological Research*, 57(6), 885.
- Dohou, R., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L. I., Badoc, A., et Gmira, N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroïdes*. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(1/4), 61-78.
- Donlan, R. M., et Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.

- Dorman, H. J. D., et Deans, S. G. (2000).**Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Douglas, L. J. (2003).** Candida biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology*, 11(1), 30-36.
- Edenharder, R., et Grünhage, D. (2003).**Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(1), 1-18..
- Edewor, T. I., et Usman, L. A. (2011).** Phytochemical and antibacterial activities of leaf extracts of *Nepeta cataria*. *Afr. J. Pure Appl. Chem*, 5(16), 503-506.
- Eisenbraun, E. J., Browne, C. E., Irvin-Willis, R. L., McGurk, D. J., Eliel, E. L., et Harris, D. L. (1980).** Structure and stereochemistry 4a. beta., 7. alpha., 7a. beta.-nepetalactone from *Nepeta mussini* and its relationship to the 4a. alpha., 7. alpha., 7a. alpha.-and 4a. alpha., 7. alpha., 7a. beta.-nepetalactones from *N. cataria*. *The Journal of Organic Chemistry*, 45(19), 3811-3814.
- Eisenbraun, E. J., Browne, C. E., Eliel, E. L., Harris, D. L., Rahman, A., et Van der Helm, D. (1981).** Structure of nepetalic acid in the solid state and in solution by x-ray diffraction and nuclear magnetic resonance analysis. *The Journal of Organic Chemistry*, 46(16), 3302-3305.
- El Kouri, A., Bultel-Poncé, V., Assobhei, O., et Etahiri, S. (2004).** Étude de la variation saisonnière de l'activité antimicrobienne et anti-inflammatoire chez quelques espèces d'algues marines de la côte atlantique marocaine. *Rev Biol Biotechnol*, 3(1), 29-36.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., et Abdelly, C. (2008).**Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M., et El-Baroty, G. S. A. (1989).**Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection®*, 52(9), 665-667.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, p.108

- Favier A., 2006.** Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr. Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. p 64: 390-396.
- Flamini, G., Cioni, P. L., Puleio, R., Morelli, I., et Panizzi, L. (1999).**Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytotherapy Research*, 13(4), 349-351.
- Formisano C, Rigano D, Senatore F.(2011).**Chemical Constituents and Biological Activities of *Nepeta* Species. *Chemistry & Biodiversity*. . 8: 1783-1818.
- Frankel, E. N., et Meyer, A. S. (2000).**The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., et Jore, D. (2003).**Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91.
- Garrett, R. H., et Grisham, C. M. (2000).** *Biochimie*. 2 édition. Édité par De Boeck et Larcier. ISBN 2-7445-0020-8. ième.
- Gkinis, G., Tzakou, O., Iliopoulou, D., et Roussis, V. (2003).**Chemical composition and biological activity of *Nepeta parnassica* oils and isolated nepetalactones. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(9-10), 681-686.
- Grayer, R. J., Eckert, M. R., Veitch, N. C., Kite, G. C., Marin, P. D., Kokubun, T., et Paton, A. J. (2003).** The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry*,64(2), 519-528.
- Hadian, J., Sonboli, A., Ebrahimi, S. N., et Mirjalili, M. H. (2006).**Essential oil composition of *Nepeta satureioides* from Iran. *Chemistry of natural compounds*, 42(2), 175-177.
- Hallahan, D. L., Lau, S. M. C., Harder, P. A., Smiley, D. W., Dawson, G. W., Pickett, J. A., ...et O'Keefe, D. P. (1994).** Cytochrome P-450-catalysed monoterpenoid oxidation in catmint (*Nepeta racemosa*) and avocado (*Persea americana*); evidence for related enzymes with different activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1201(1), 94-100.
- Halliwell, B., et Gutteridge, J. (1997).** Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *Journal of neurochemistry*, 69(3), 1330-1330.

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., et Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95-108.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., et Riley, T. V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.
- Han, Y. (2007).** Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 14(11), 733-738.
- Harborne, J. B. (1967).** Comparative biochemistry of the flavonoids.
- Harborne, J. B. (1989).** Flavonoids. In *Natural products of woody plants* (pp. 533-570). Springer Berlin Heidelberg.
- Harney, J.W., Barofsky, I.M., and Leary, J.D. (1978).** Behavioral and toxicological studies of cyclopentanoid monoterpenes from *Nepeta cataria*. *Lloydia*. 41(4): 367-74.
- Haslam, E. (1989).** Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. CUP Archive.
- Havsteen, B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2), 67-202 .
- Hawser, S. P., et Douglas, L. J. (1994).** Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infection and immunity*, 62(3), 915-921.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., et Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- Hirasawa, M., et Takada, K. (2004).** Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 225-229.
- Hitokoto H., Morozumi S., Wauke T., Sakai, S. et Kurata, H.(1980) .** « Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 39, n° 4, p. 818-822.
- Hodek, P., Trefil, P., et Stiborová, M. (2002).** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions*, 139(1), 1-21.

- Holubek, J., et Kroulik, B. (1957).** Distribution of ethereal oils and citral in *Nepeta cataria* L. var. *citriodora* Balbis, and the influence of various drying methods on their content in the drug. *Die Pharmazie*, 12(1), 52-54.
- Horowitz, G., Hajlaoui, M. E., & Hajlaoui, R. (2000).** Temperature and gate voltage dependence of hole mobility in polycrystalline oligothiophene thin film transistors. *Journal of Applied Physics*, 87(9), 4456-4463.
- Hou, Z. F., Tu, Y. Q., et Li, Y. (2002).** Three new phenolic compounds from *Nepeta prattii*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 49(2), 255-258.
- Miceli, N., Taviano, M. F., Giuffrida, D., Trovato, A., Tzakou, O., & Galati, E. M. (2005).** Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. *Journal of ethnopharmacology*, 97(2), 261-266.
- Hryb, D. J., Khan, M. S., Romas, N. A., & Rosner, W. (1995).** The effect of extracts of the roots of the stinging nettle (*Urtica dioica*) on the interaction of SHBG with its receptor on human prostatic membranes. *Planta medica*, 61(01), 31-32.
- Huang, S., et Ingber, D. E. (2005).** Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer cell*, 8(3), 175-176.
- Inouye, S., Takizawa, T., et Yamaguchi, H. (2001).** Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 47(5), 565-573.
- Ito N., Fukushima S., Tsuda H. (1985).** "Carcinogenicity and modification of the carcinogenic responses by BHA, BHT and other antioxidants". *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 15: 109-150.
- Jacques ,G. et Paltz, S. (1997).** Le fascinant pouvoir des huiles essentielles. Fascicule du laboratoire "Jacque Paltz" ».
- Javidnia, K., Miri, R., Safavi, F., Azarpira, A., et Shafiee, A. (2002).** Composition of the essential oil of *Nepeta persica* Boiss from Iran. *Flavour and fragrance journal*, 17(1), 20-22.

- Javidnia, K., Miri, R., Mehregan, I., et Sadeghpour, H. (2005).** Volatile constituents of the essential oil of *Nepeta ucrainica* L. ssp. *kopetdaghensis* from Iran. *Flavour and fragrance journal*, 20(2), 219-221.
- Jollois, R., Péroël, D., Franchomme, P., et Mars, J. (2001).** L'aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles: fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. 1ère ed; Springer Verlag France
- Jou N. T., Yoshimori R. B., Mason G. R., Louie J. S., et Liebling, M. R (1997).** « Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, n° 5, p. 1161-1165 .
- Jung HJ, Seu YB, Lee DG. (2007).** Candidicidal action of resveratrol isolated from grapes on human pathogenic yeast *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol.* 17 : 1324-1329.
- Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mentis, A., Mitaku, S., et Charvala, C. (2001).** Composition of the essential oil of two *Nepeta* species and in vitro evaluation of their activity against *Helicobacter pylori*. *Planta medica*, 67(09), 880-883.
- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U., et Ilcim, A. (2001).** Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(2), 183-186.
- Kashyap, T. K., Melkani, A. B., Mathela, C. S., Dev, V., Olmstead, M. M., Hope, H., et Bottini, A. T. (2003).** Essential oil from *Nepeta govaniensis* Benth. study of its major terpenes. *Journal of Essential Oil Research*, 15(1), 28-30.
- Khalil, A. T., Gedara, S. R., Lahloub, M. F., Halim, A. F., et Voehler, M. (1997).** A diterpene from *Nepeta septemcrenata*. *Phytochemistry*, 44(3), 475-478.
- Klimek, B., et Modnicki, D. (2004).** Terpenoids and sterols from *Nepeta cataria* L. var. *citriodora* (Lamiaceae). *Methods* .
- Koehlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.

- Kokdil, G., Tanker, M., Kurucu, S., Topcu, G.(1997)**, Essential Oil Analysis of *Nepeta Cilicia* Boiss., *Flavour and Fragrance Journal* , 12, 99-101 .
- Kokdil, G., Kurucu, S., Topcu, G., .(1997)** . Chemical Constituents of the Essential Oils of *Nepeta italica* L. and *N.sulfuriflora*.P.H.Davis, *Flavour and Fragrance Journal* 12, 33-35.
- Kokdil, G., Kurucu, S., Yıldız, A.(1998)**, Essential Oil Composition of *Nepeta nuda* L. ssp.nuda, *Flavour and Fragrance Journal* 13, 233-234, 1998.
- Kökdil, G., Yalcin, S. M., et Topçu, G. (1999)**.Nepetalactones and other constituents of *Nepeta nuda* ssp. albiflora. *Turkish Journal of Chemistry*, 23(1), 99-104.
- König, W. A., Joulain, D., et Hochmuth, D. H. (2004)**.Terpenoids and related constituents of essential oils. *Library of MassFinder*, 2.
- Kossel, A. (1891)**. Ueber Abkömmlinge der Phenylamidoessigsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 24(2), 4145-4156.
- Kovats, E. S. (1965)**. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr*, 1, 229-247.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., et Abdelly, C. (2008)**.Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biologies*, 331(11), 865-873
- Kudrzycka-Bieloszabska, F. W., Szaniawska-Dekundy, D., et Pikula, W. (1976)**. Preliminary investigation on sterols and triterpenes in the *Nepeta nuda* L. herb (author's transl). In *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina* (Vol. 31, p. 175).
- Lachowicz, K. J., Jones, G. P., Briggs, D. R., Bienvenu, F. E., Wan, J., Wilcock, A., et Coventry, M. J. (1998)**. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Letters in Applied Microbiology*, 26(3), 209-214.

- LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A., et Lewis, K. (2006).** Candida albicans biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), 3839-3846.
- Lang, G., et Buchbauer, G. (2012).** A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 13-39.
- Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., et Prost, M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines: Bilan et perspectives préventives. *La Presse médicale*, 30(21), 1076-1081.
- Leong, L. P., et Shui, G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry*, 76(1), 69-75.
- Lewis K.G. et Tucker D.J. (1983)** .The Separation of Substituted Olean-12-en-28-oic Acids from the Corresponding Urs-12-en-28-oic Acid Isomers. *Aust. J. Chem.* 36, 2297-305.
- Lewis, K. (2010).** Persister cells . *Annual review of microbiology*, 64, 357-372.
- Liblikas I., Santangelo E.M., Sandell J., Baeckstrom P., Svensson M., Jacobsson U., et Rikard Unelius C.(2005)** : Simplified Isolation Procedure and Interconversion of the Diastereomers of Nepetalactone and Nepetalactol. *J. Nat. Prod.* 68, 886-890
- Lis-Balchin, M., Deans, S. G., et Eaglesham, E. (1998).** Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(2), 98-104.
- Lis-Balchin, M., Hart, S., et Simpson, E. (2001).** Buchu (*Agathosma betulina* and *A. crenulata*, rutaceae) essential oils: Their pharmacological action on guinea-pig ileum and antimicrobial activity on microorganisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(4), 579-582.
- Lisu W., Jui-Hung Y., Hsiao-Ling L., Ming-Jiuan W. (2003).** Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifeca* Gertn), *Journal of food and drug analysis*, 11(1): 60-66.
- Liu J., 1995** : Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. of Ethnopharmacology*. 49, 57-68

- Ljaljević Grbić M, Stupar M, Vukojević J, Soković M, Mišić D, Grubišić D, Ristić M.(2008)** . Antifungal activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil. *J Serb Chem Soc* ;73:961–5.
- Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K. V., et Bíró, L. (2003).**The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*,47(1-4), 119-25.
- Mabberley, D. J. (1997).**The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants. Cambridge university press .
- Madhyastha, M. S., et Bhat, R. V. (1984).**Minicolumn chromatography for the detection of argemone oil in edible oils. *Journal of food science and technology*, 21(1), 20-21.
- Malizia, R. A., Molli, J. S., Cardell, D. A., et Retamar, J. A. (1996).**Volatile constituents of the essential oil of *Nepeta cataria* L. grown in Cordoba Province (Argentina). *Journal of Essential Oil Research*, 8(5), 565-567.
- Marfak, A., Trouillas, P., Allais, D. P., Calliste, C. A., et Duroux, J. L. (2003).**Redox reactions obtained by γ irradiation of quercetin methanol solution are similar to in vivo metabolism. *Radiation research*, 159(2), 218-227.
- Maruzzella, J. C., & Tirpak, J. A. (1962).** Antibacterial activity of fern extracts.*Naturwissenschaften*, 49(24), 615-615.
- Mazari, K., Bendimerad, N., et Bekhechi, C. (2010).**Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(10), 959-964.
- Mc Lafferty F. et Stauffer D.(1994)** .Registry of Mass Spectra Data, 6th Ed. Mass spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, 3.10d éd. Palisade: Newfield .
- McCord, J. M. et Fridovich, I. (1969)** .*J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., et Nacoulma, O. G. (2005).**Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*,91(3), 571-577.

- Mehrabani, M., Asadipour, A., et Amoli, S. S. (2004).** Chemical constituents of the essential oil of *Nepeta depauperata* Benth. from Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 98-100.
- Meziti .A (2007).** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Etude in vitro et in vivo. Mémoire de Magister Université de Batna.p 30-35-49-67.
- Miceli, N., Taviano, M. F., Giuffrida, D., Trovato, A., Tzakou, O., et Galati, E. M. (2005).** Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. *Journal of ethnopharmacology*, 97(2), 261-266.
- Middleton, E., Kandaswami, C., et Theoharides, T. C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., et Rice-Evans, C. A. (1996).** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters*, 384(3), 240-242.
- Mishurova, S. S., Serkerov, S. V., et Abbasov, R. M. (1981).** Content of ursolic acid in *Nepeta transcaucasica*. *Rastitel'nye resursy*.
- Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M., et Ghannoum, M. A. (2003).** Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and immunity*, 71(8), 4333-4340.
- Mukherjee, P. K., et Chandra, J. (2004).** *Candida* biofilm resistance. *Drug resistance updates*, 7(4), 301-309.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H., et Evans, R. M. (1998).** Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell*, 93(2), 229-240.
- Navarro-Martínez, M. D., Cabezas-Herrera, J., et Rodríguez-López, J. N. (2006).** Antifolates as antimycotics?: Connection between the folic acid cycle and the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans*. *International journal of antimicrobial agents*, 28(6), 560-567.

Nestorović J., Mišić D., Šiler B., Soković M., Glamočlija J., Ćirić A., Maksimović V., Grubišić D., (2010) : Nepetalactone content in shoot cultures of three endemic *Nepeta* species and the evaluation of their antimicrobial activity. *Fitoterapia* 81 (2010) 621–626 .

Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., et Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425 .

Nobuyuki K., Hirobumi Y., Reiko L. et Kenichiro I.(2001) : 7-Deoxyloganin 7-hydroxylase in *Lonicera japonica* cell cultures, *Phytochemistry* 58 (2001) 53–58.

Nostro A., Roccaro A. S, Bisignano G., Marino A., Cannatelli M. A., Pizzimenti F. C., P. L. Cioni P. L. , Procopio F., et Blanco, A. R .(2007) « Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms », *J. Med. Microbiol.*, vol. 56, n° Pt 4, p. 519-523 .

O.N.M : Office National de la Météorologie, 2011.

Oyaizu M., (1986) .« Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. », vol. 44, p. 307–315, 1986.

Padrini, F., & Lucheroni, M. T. (1996). *El gran libro de los aceites esenciales*. Editorial De Vecchi, SAU.

Palmeira-de-Oliveira, A., Gaspar, C., Palmeira-de-Oliveira, R., Silva-Dias, A., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., ... et Rodrigues, A. G. (2012).The anti-*Candida* activity of *Thymbra capitata* essential oil: effect upon pre-formed biofilm.*Journal of ethnopharmacology*, 140(2), 379-383.

Pandey, A. K., et Rai, M. (2003).Antimycotic potential in some naturally occurring essential oils. *Plant-derived Antimycotics. Current trends and future prospects*. Haworth Press. Binghampton, NY, 343-356.

Pathak, M. A., Daniels, F., et Fitzpatrick, T. B. (1962).The Presently Known Distribution of Furocoumarins (Psoralens) in Plants1. *Journal of investigative Dermatology*, 39(3), 225-239.

- Pavel, M., Ristic, M., et Stevic, T. (2010).** Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(1), 27-34.
- Pavlovic, S., Sevarda, A. L., Kuznetsova, G. A., Zivanovic, P., Jancic, R., et Vujcic, S. (1985).** Anatomical characteristics of the organs of *Nepeta nuda* and the composition of its essential oil. *Arch. Farm.*, 35, 227-232.
- Pemán, J., Cantón, E., et Valentín, A. (2008).** Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 124-128.
- Peronny, S. (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*) (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).
- Pervykh, L. N., Zapesochayaya, G. G., et Shchavlinskii, A. N. (1984).** Flavonoids of *Nepeta velutina*. *Chemistry of Natural Compounds*, 20(4), 494-494.
- Pierozan, M. K., Pauletti, G. F., Rota, L., Santos, A. C. A. D., Lerin, L. A., Di Luccio, M., ... et Oliveira, J. V. (2009).** Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. *Food Science and Technology (Campinas)*, 29(4), 764-770.
- Pigulevskii G. V. et Chistova Z. G., 1935.** Oil of *Nepeta botryoides* Ait. *Zhurnal Obschei Khimii*, 5, 1798-1800.
- Piochon, M. (2008).** Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. ProQuest.
- Plouvier, V., & Favre-Bonvin, J. (1971).** Les iridoïdes et séco-iridoïdes: Répartition, structure, propriétés, biosynthèse. *Phytochemistry*, 10(8), pp.1697-1722.
- Price, L et Price, S. (2004).** Understanding hydrolats: the specific hydrosols for aromatherapy : a guide for health professionals. Edinburgh; New York: Churchill Livingstone.
- Quézel, P. et Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Éditions du Centre national de la Recherche scientifique, 1962.
- Rahman, I. (2002).** « Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets », *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, vol. 1, n° 3, p. 291-315.

- Ramage, G., Martínez, J. P., et López-Ribot, J. L. (2006).** Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS yeast research*, 6(7), 979-986.
- Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., et Lopez-Ribot, J. (2009).** Our current understanding of fungal biofilms. *Critical reviews in microbiology*, 35(4), 340-355.
- Ranga, R., Sarada, A., Baskaran, V., et Ravishankar, G. A. (2009).** Identification of carotenoids from green alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and their antioxidant properties. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 19(13331341), 27.
- Rangkadilok N., Sitthimonchai S. , Worasuttayangkurn L. , Mahidol C., Ruchirawat M., et J. Satayavivad, J. (2007) .** « Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract », *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 45, n° 2, pp. 328-336.
- Raven, P. H., Evert, R. F., et Eichhorn, S. E. (2000).** *Biologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., et Pridham, J. B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375-383.
- Robles, M., Choi, B. H., Han, B., Santa Cruz, K., et Kim, R. C. (1998).** Repin-induced neurotoxicity in rodents. *Experimental neurology*, 152(1), 129-136.
- Rustaiyan, A., et Nadji, K. (1999).** Composition of the essential oils of *Nepeta isphanica* Boiss. and *Nepeta binaludensis* Jamzad from Iran. *Flavour and fragrance journal*, 14(1), 35-37.
- Rustaiyan, A., Monfared, A., et Masoudi, S. (1999).** Composition of the essential oil of *Nepeta asterotrichus* Rech. F. et Aell. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 11(2), 229-230.
- Rustaiyan, A., Masoudi, S., Monfared, A., Kamalinejad, M., Lajevardi, T., Sedaghat, S., et Yari, M. (2000).** Volatile constituents of three *Thymus* species grown wild in Iran. *Planta medica*, 66(02), 197-198.
- Saez E., Rodriguez M. And Bermejo P.(1985).** Contributions to the Study of Phenolic Acids in *Nepeta L. (Labiata)* Species. *Anales-De-La-Real-Acadmia-De-Farmacia.*, 52(1):597-603.

- Saez E., Rodriguez M.J. et Bermejo Benito P. (1986)** . Acidos feolicos en dos especies de *Nepeta* L. (Labiatae). *An. Real. Acad. Farm.* 52 : 113-116.
- Sajjadi, S. E., & Ghassemi, N. (1999)**. Volatile constituents of *Nepeta glomerulosa* Boiss. subsp. *carmanica*. *Flavour and fragrance journal*, 14(5), 265-267.
- Samarth R. M., Panwar M. , Kumar M., Soni A., Kumar M. , et Kumar A.(2008)**. « Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts », *Food Chem.*, vol. 106, n° 2, p. 868-873.
- Sanchez-Moreno C. et Larrauri, J. A .(1998)** .« Principales metodos para la determinacion de la oxidacion lipidica Main methods used in lipid oxidation determination », *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 4, n° 6, p. 391-399,
- Sanon, A., Garba, M., Auger, J., & Huignard, J. (2002)**. Analysis of the insecticidal activity of methylisothiocyanate on *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Rondani)(Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Stored Products Research*, 38(2), 129-138.
- Saxena, J., & Mathela, C. S. (1996)**. Antifungal activity of new compounds from *Nepeta leucophylla* and *Nepeta clarkei*. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 702-704.
- Sefidkon, F., Jamzad, Z., & Mirza, M. (2006)**. Chemical composition of the essential oil of five Iranian *Nepeta* species (*N. crispa*, *N. mahanensis*, *N. ispahanica*, *N. eremophila* and *N. rivularis*). *Flavour and fragrance journal*,21(5), 764-767.
- Seladji, M., Bekhechi, C., Beddou, F., Hanane, D. I. B., & Bendimerad, N. (2014)**. Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(2), 12.
- Seladji ., M .(2015)** .Etude phytochimique,activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de cinq plantes médicinales et analyse de leurs huiles essentielles . Thèse de doctorat en Biologie cellulaire et biochimie . Université Abou Bekr belkaid Tlemcen .
- Senatore, F., & Özcan, M. (2005)**. Composition of the essential oil of *Nepeta betonicifolia* CA Meyer (Lamiaceae) from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 15(3), 200-201.
- Seneviratne, C. J., Jin, L., & Samaranayake, L. P. (2008)**. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral diseases*, 14(7), 582-590.

- Sharma, A., & Goutam, M. P. (1977).** Investigation on the antifungal activity of the volatile oil derived from *Nepeta hindostana* (Roth). Haines. *Indian Drugs and Pharm. Ind*, 12, 33-34.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012).** *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 288-305.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1997).** Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3197-3201.
- Snook, M. E., Blum, M. S., Whitman, D. W., Arrendale, R. F., Costello, C. E., & Harwood, J. S. (1993).** Caffeoyltartronic acid from catnip (*Nepeta cataria*): a precursor for catechol in lubber grasshopper (*Romalea guttata*) defensive secretions. *Journal of chemical ecology*, 19(9), 1957-1966.
- Soliman, K. M., & Badaea, R. I. (2002).** Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and chemical toxicology*, 40(11), 1669-1675.
- Sonboli, A., Salehi, P., & Yousefzadi, M. (2004).** Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(9-10), 653-656.
- Stojanović G, Radulović N, Lazarević J, Miladinović D, Đoković D.(2005).** Antimicrobial activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil. *J Essent Oil Res*;17:587–9.
- Svoboda, K. P., & Hampson, J. B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW, 1-17.
- Swartz JH, Medrek TF. (1968).** Antifungal properties of cranberry juice. *Appl Microbiol*: 1524-1527:

- Tagawa, M., & Murai, F. (1983).** 5-Epideoxyloganic acid from *Nepeta cataria*. *Planta medica*, 47(02), 109-111.
- Takeda, Y., Yagi, T., Matsumoto, T., Honda, G., Tabata, M., Fujita, T., ... & Yesilada, E. (1996).** Nepetanudosides and iridoid glucosides having novel stereochemistry from *Nepeta nuda* ssp. *albiflora*. *Phytochemistry*, 42(4), 1085-1088
- Takeda, Y., Kiba, Y., Masuda, T., Otsuka, H., Honda, G., Tagawa, M., ... & Yesilada, E. (1999).** Nepetaracemosides A and B, Iridoid Glucosides from *Nepeta racemosa*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 47(10), 1433-1435.
- Taweetchaipapong S, Choopan T, Singhara S, Chatrchaiwiwatana S, Wongkham S.(2005).** In vitro effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *J Ethnopharmacol.* 2005; 96 : 221-226.
- Taweetchaipapong S, Klanrit P, Singhara S, Pitiphat W, Wongkham S.(2006).** Inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic. *J Ethnopharmacol.* 2006; 106 : 414-417.
- Teisseire, P. J. (1991).** *Chimie des substances odorantes. Technique et documentation-Lavoisier.*
- Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koornneef, M., & Smeekens, S. (2005).** Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiology*, 139(4), 1840-1852.
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H. A., & Aydin, E. (2007).** Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, 100(3), 985-989.
- Tereschuk, M. L., Baigorí, M. D., de Figueroa, L. I., & Abdala, L. R. (2004).** Flavonoids from Argentine *Tagetes* (Asteraceae) with antimicrobial activity. *Public Health Microbiology: Methods and Protocols*, 317-330.
- Thappa, R. K., Agarwal, S. G., Srivastava, T. N., & Kapahi, B. K. (2001).** Essential oils of four Himalayan *Nepeta* species. *Journal of Essential Oil Research*, 13(3), 189-191.

- Timchuk, K. S. (1981).** Gas chromatographic investigation of the essential oils of plants. *Izvestiia Akademii nauk Moldavskoi SSR. Serii biologicheskikh i khimicheskikh nauk.*
- Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Ferreres, F., & Tomás-Lorente, F. (1992).** Flavonoid p-coumaroylglucosides and 8-hydroxyflavone allosylglucosides in some Labiatae. *Phytochemistry*, 31(9), 3097-3102.
- Touafek, K. (2010).** Contribution à l'étude et à la conception d'un système énergétique utilisant des capteurs hybrides photovoltaïques thermiques (Doctoral dissertation, Ecole nationale supérieure polytechnique).
- Tsutomu . F et Hisachi .K , (1971).** *Phytochemistry*. 8 -10 .
- Tümen, G., Baser, K. H. C., Kürkcüoğlu, M., Demirci, B., & Yildiz, B. (1999).** Composition of the essential oil of *Nepeta trachonitica* Post from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 11(1), 21-22.
- Tzakou, O., Harvala, C., Galati, E. M., & Sanogo, R. (2000).** Essential oil composition of *Nepeta argolica* Bory et Chaub. subsp. *argolica*. *Flavour and Fragrance Journal*, 15(2), 115-118.
- Ubera ,J. L. et B. Valdes,B. (1983)** .Revisión del género *Nepeta*(Labiatae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. Sevilla.
- Upton, T. M., Grayer, R. J., Greenham, J. R., Williams, C. A., Al-Ghamdi, F., & Chen, F. H. (2000).** Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical systematics and ecology*, 28(10), 991-1007.
- Usher, G, A.(1984).** dictionary of plants used by man. Delhi - India,
- Valdes, B., Talavera, S., & Fernandez-Galiano, E. (1987).** Flora vascular de Andalucía Occidental: 3. Barcelona: Ketres Editora 555p.-illus., maps.. ISBN 8485256662 Sp Icones, Maps, Chromosome numbers. Geog, 1.
- Valnet, J. (1978).** Une nouvelle médecine. Phytothérapie et Aromathérapie, Presses de la Renaissance, Paris, 185-6.

- Van Acker, S. A., van Balen, G. P., van den Berg, D. J., Bast, A., & van der Vijgh, W. J. (1998).** Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical pharmacology*, 56(8), 935-943.
- Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., ... & Tepe, B. (2003).** Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 63-67.
- Vargas, I., Sanz, I., Moya, P., & Prima-Yúfera, E. (1999).** Antimicrobial and antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed orange essential oil. *Journal of Food Protection®*, 62(8), 929-932.
- Velasco-Negueruela A. , Perez-Alonso M., J, et A. B. Rodriguez,(1989).** « Continuación del estudio químico de los aceites esenciales de nepetas ibéricas : *Nepeta nepetella* L. y *N. amethystina* Poiret », *An. Jardín Botánico Madr.*, vol. 47, nº 2, p. 395-400.
- Velasco-Negueruela A., José Pérez-Alonson M. et Buades Rodrigues A., (1990) :** Continuacion del eestudio quimico de los aceites esenciales de *N. amethystina* Poiret. *Anales Jardin Botanico de Madrid*, 47 (2).
- Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M., & Heinonen, M. (2005).** Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(22), 8492-8497.
- Walencka, E., Rozalska, S., Wysokinska, H., Rozalski, M., Kuzma, L., & Rozalska, B. (2007).** Salvipisone and aethiopinone from *Salvia sclarea* hairy roots modulate staphylococcal antibiotic resistance and express anti-biofilm activity. *Planta medica*, 73(06), 545-551.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008).** Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163-175.
- Williams, D. W., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S., & Lewis, M. A. (2011).** *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology 2000*, 55(1), 250-265.
- Yaacoub R. (2009).** Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux. l'intéret de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés.

Thèse de doctorat. N° 2009AGPT 0048. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech).

Yao, L. H., Jiang, Y. M., SHI, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition*, 59(3), 113-122.

Yi, S., Sahni, N., Daniels, K. J., Pujol, C., Srikantha, T., & Soll, D. R. (2008). The same receptor, G protein, and mitogen-activated protein kinase pathway activate different downstream regulators in the alternative white and opaque pheromone responses of *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell*, 19(3), 957-970.

Yoshida H., Ishikawa T., Hosoi H., Suzukawa M., Ayaori M., Hisada T., Sawada S., Yonemura A, Higashi K., Ito T. , Nakajima K. , Yamashita T., Tomiyasu K., Nishiwaki, M. Ohsuzu F. , et Nakamura H., (1999) .« Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 58, n° 11, p. 1695-1703.

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

Zamurenko, V. A., Kluyev, N. A., Dmitriev, L. B., & Grandberg, I. I. (1984). Gas—liquid chromatography—mass spectrometry in the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 303, 109-115.

Zapesochnaya, G. G., Pervykh, L. N., & Kurkin, V. A. (1991). A study of the herb *Aerva lanata*. III. Alkaloids. *Chemistry of Natural compounds*, 27(3), 336-340.

Zenasni, L., Boudida, H., Hancali, A., Boudhane, A., Idrissi, H. A. A. I., El Aouad, R., ... & Benjouad, A. (2008). The essential oils and antimicrobial activity of four *Nepeta* species from Morocco. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(5), 111-114.

Zhang Y., Vareed S. K et. Nair, M. G .(2005) . « Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables », *Life Sci.*, vol. 76, n° 13, p. 1465-1472.

Annexes

ANNEXE 1

Enquête ethnopharmacologique

1-Questionnaire sur l'utilisation de *N. amethystina* à Aïn Sefra

1- Connaissez- vous la plante ?

Oui Non

Si oui, quelle est son nom en arabe ?.....

2- Utilisez-vous cette plante ?

Oui Non

Si oui, pour quelles utilisations ?.....

3- Sous quelle forme vous utilisez ?

.....

4- Quelle est la fréquence avec laquelle vous utilisez ?

.....

Annexe 2 : Analyses RMN

RMN du proton

Les spectres de RMN du proton ont été enregistrés en utilisant une sonde de 5 mm, durée de l'impulsion 2,0 μ s (angle d'impulsion 25°), temps d'acquisition 2,3s correspondant à une acquisition de 16 000 avec une largeur spectrale (SW) de 3500 Hz (17,5 ppm), temps de répétition entre deux expériences 3,3s.

RMN du carbone-13

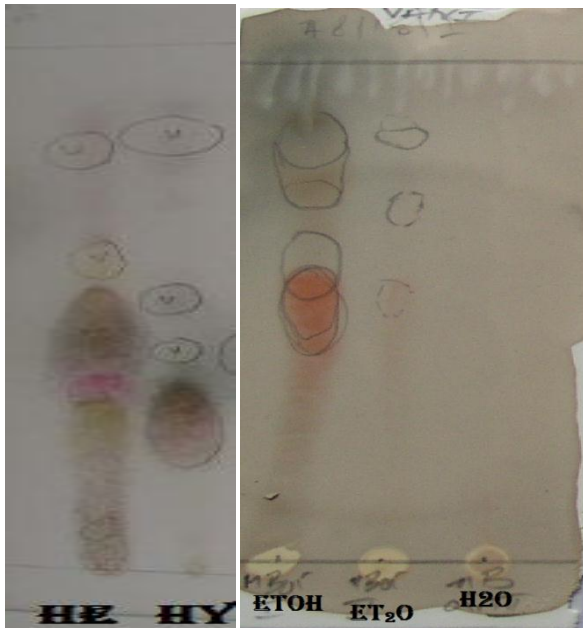
Sonde de 10 mm, durée de l'impulsion 5ms (angle d'impulsion 45°), temps d'acquisition 1,3s correspond à une acquisition de 32 000 avec une largeur spectral (SW) de 12 500 Hz (250 ppm), résolution digitale de 0,763 Hz/pt, temps de répétition entre deux expériences 3,3 s. 60 à 200 mg d'extrait sont dissous dans 3 ml de CDCl₃. Le nombre d'accumulation est compris entre 2000 et 10 000 pour chaque enregistrement.

Annexe 3

Tableau 1 : Résultats de l'enquête ethnopharmacologique sur *N. amethystina*
(Gouzia)

Indications thérapeutiques	Parties utilisées	Recettes
Piqures d'insectes	Feuilles, graines	Décoction
Diurétique	Feuilles	Infusion
Fébrifuge	Feuilles, racines	Infusion
Spasmolytique	Feuilles	Infusion
Fortifiante	Partie aérienne	Infusion
Stimulante	Feuille	Infusion

Annexe 4 : Résultats de développement des CCM

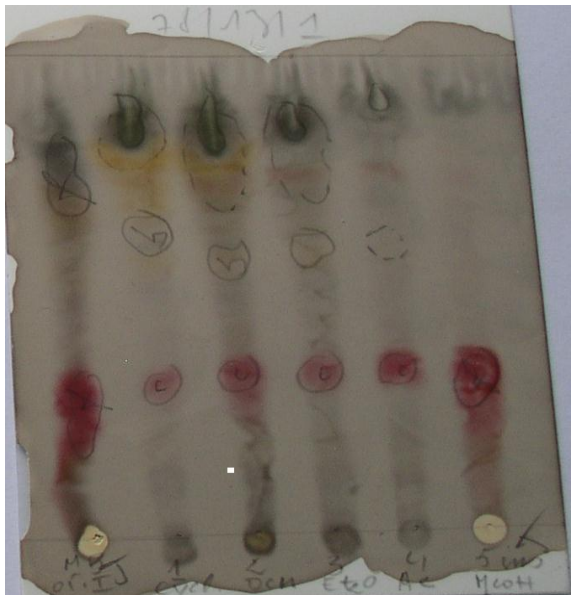


CCM HE

AcoEt /Tol (5/95)

CCM extraits bruts

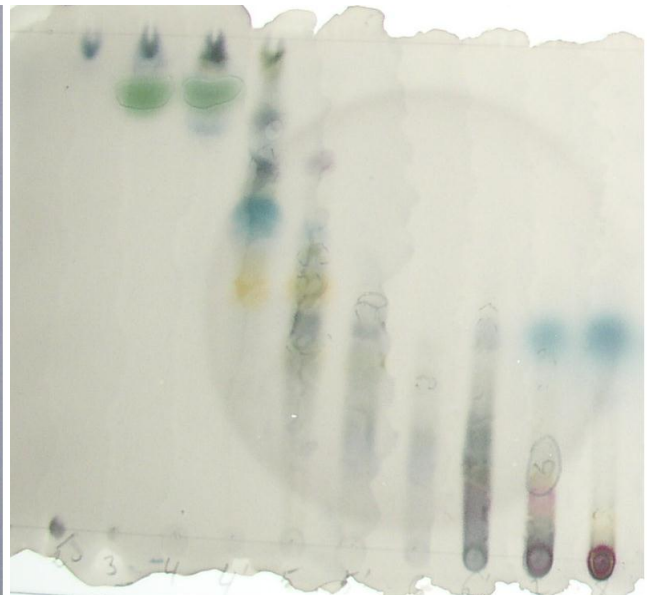
AcoEt/MeOH/H₂O (78/13/1)



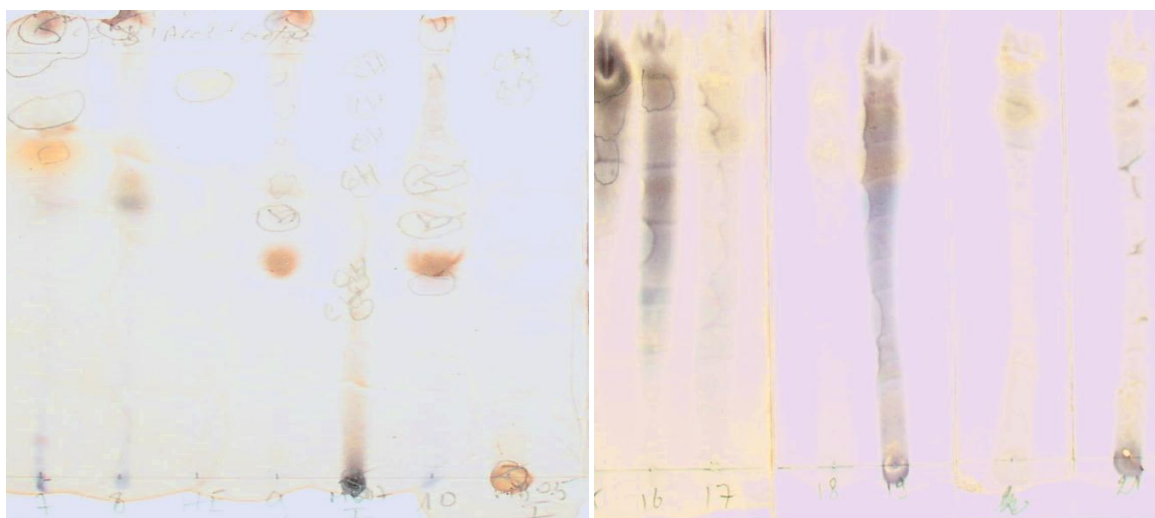
ETOH CYH DCM ET₂O AC MEOH
F1 F2 F3 F4 F5

AcoEt/MeOH/H₂O (78/13/1)

CHCl₃/ AcoEt (50/50)



F6 - F15



F16 - F22

F23 - F30

AcoEt /Tol (5/95)

AcoEt/MeOH/H₂O (78/13/1)

Figure 1 : Chromatographie sur couche mince des extraits de *N. amethystina*

Annexe 5

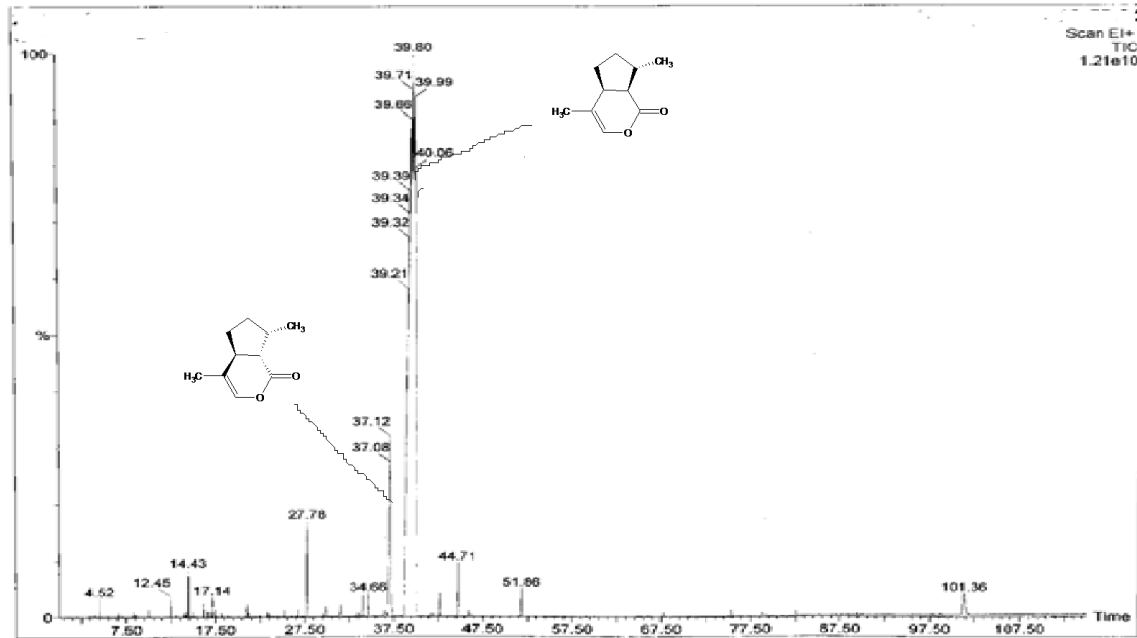


Figure 2 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *N. amethystina*

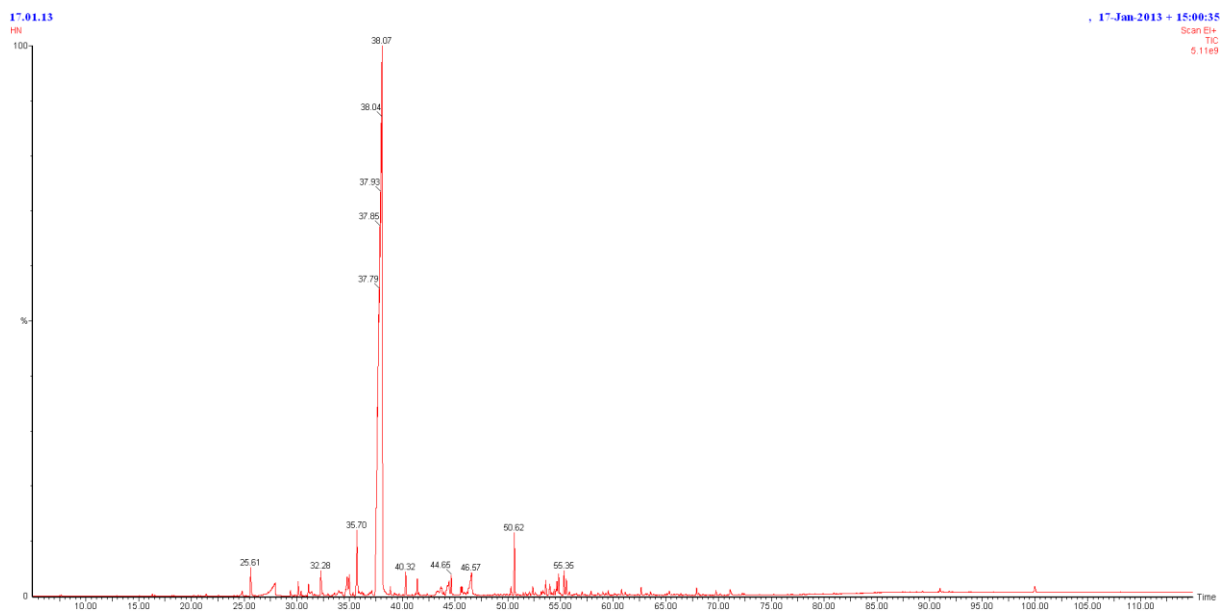
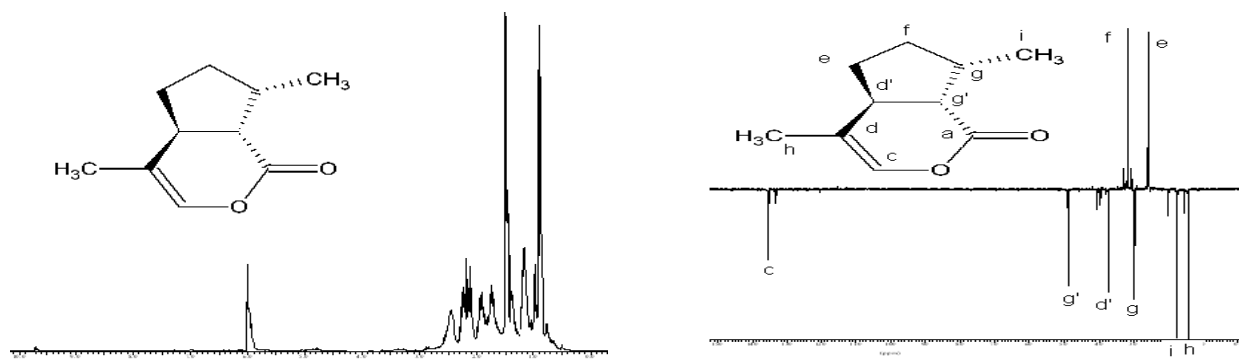
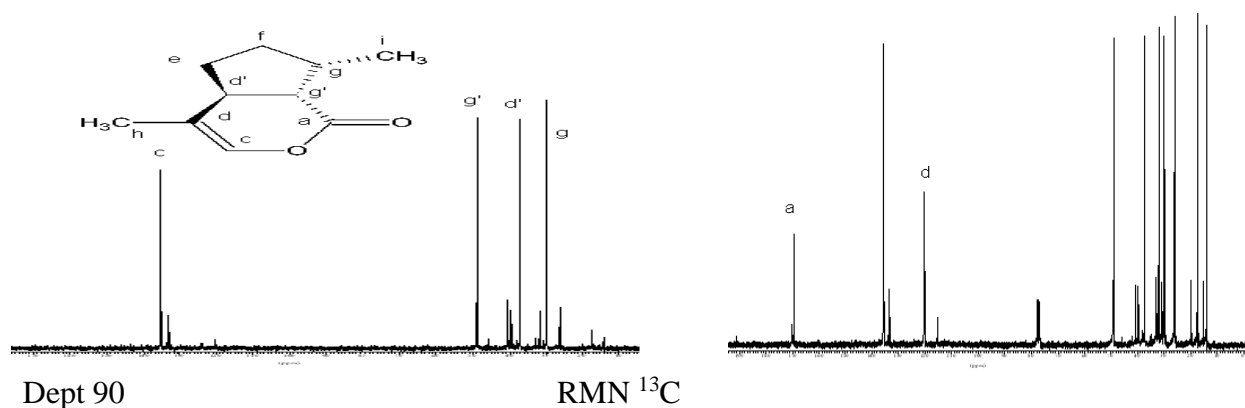


Figure 3 : Chromatogramme CPG/SM de l'extrait d'hydrolat de *N. amethystina*

Annexe 6



RMN ^{13}C Dept 135



Dept 90

RMN ^{13}C

Figure 4 : Spectres RMN (^1H , ^{13}C , Dept 90 et Dept 135) de l'HE de *N. amethystina*

Tableau 2 : Tableau comparatif des résultats de la RMN ^{13}C de la fraction 5

carbones	δ ppm Produit majoritaire	δ ppm (Liblikas et al., 2005)	δ ppm Produit minoritaire	δ ppm (Liblikas et al., 2005)
Carbone quaternaire	169.6	170.1	170.0	170.7
	120.25	120.4	115.21	115.1
Carbones tertiaires	17.2	17.6	19.92	20.2
	13.87	14.3	15.13	15.5
Carbones secondaires	31.79	32.0	31.8	30.9
	25.86	26.1	26.08	
Carbones primaires	135.54	135.8	133.28	133.6
	48.74	49.0	49.07	49.3
	37.07	37.3	40.45	40.7
	29.76	29.9	39.55	39.7
Composés identifiés	4 α , 7 α , 7 β -népétalactone		4 α , 7 α , 7 α -népétalactone	

Tableau 3 : Tableau comparatif des résultats de la RMN ^{13}C de la fraction F32 avec la bibliographie

carbones	δ ppm Produit majoritaire	δ ppm (Lewis et Tucker, 1983)
Carbone quaternaire	53.0 49.97 17.6 23.35 30.74 38.91 44.42	38.8 17.6 49.8 23.0 23.6 46.6 44.8
Carbones tertiaires	152.06 137.89 127.58 125.8 57.75 55.47 41.42 41.33	78.7 122 143 41.4 55.4 41.3 177.8
Carbones secondaires	20.7 25.55 26.83 30.06 31.92 33.00 35.5 39.37 41.0 - -	38.5 27.1 28.8 18.3 32.6 39.3 36.9 27.7 30.6 33.8 32.3
Carbones primaires	18.52 55.22 19.38 25.85 49.97 80.09 19.46	55.2 55.1 49.9 25.8 80.1 19.4 19.3
Composé probable	Acide oléanolique	

Tableau 4 : Tableau comparatif des résultats de la RMN ¹³C de la fraction F31 avec labibliographie

carbones	δ ppm Produit minoritaire	δ ppm (Teng et <i>al.</i> , 2005)
C1	100.97	100.7
C3	153.22	153.2
C4	?	113.3
C5	34.05	34.0
C6α	32.33	32.3
C6β	-	-
C7α	33.67	33.6
C7β	-	-
C8	37.2	37.1
C9	44.3	44.3
C10	16.74	16.8
COOH	?	170.9
Glucosyl		
1'	103.9	103.8
2'	75.2	75.2
3'	78.06	78.0
4'	71.1	71.1
5'	78.36	78.2
6'a	62.5	62.5
6'b	?	?
Composé probable	Acide 7-déoxyloganique	

Annexe 7

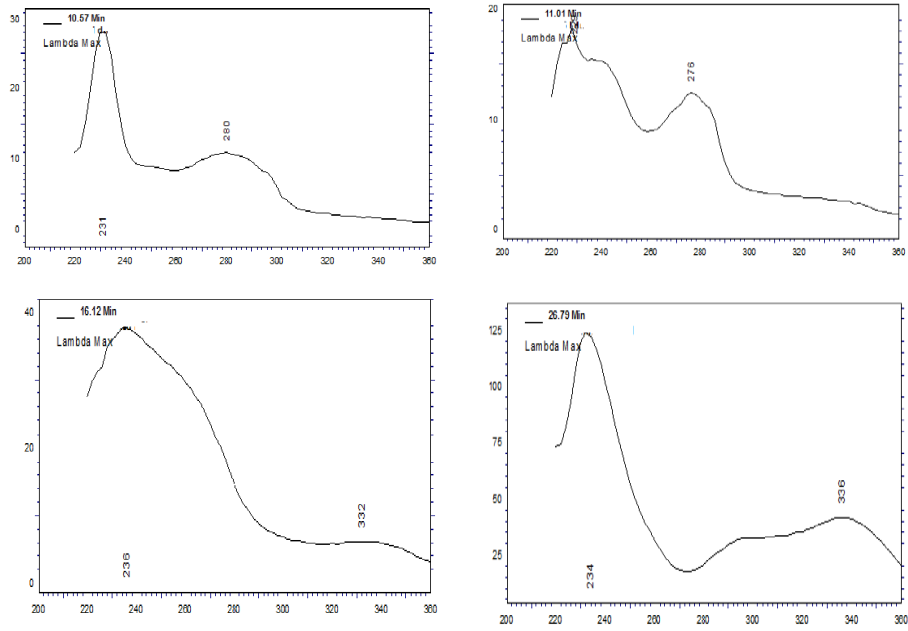
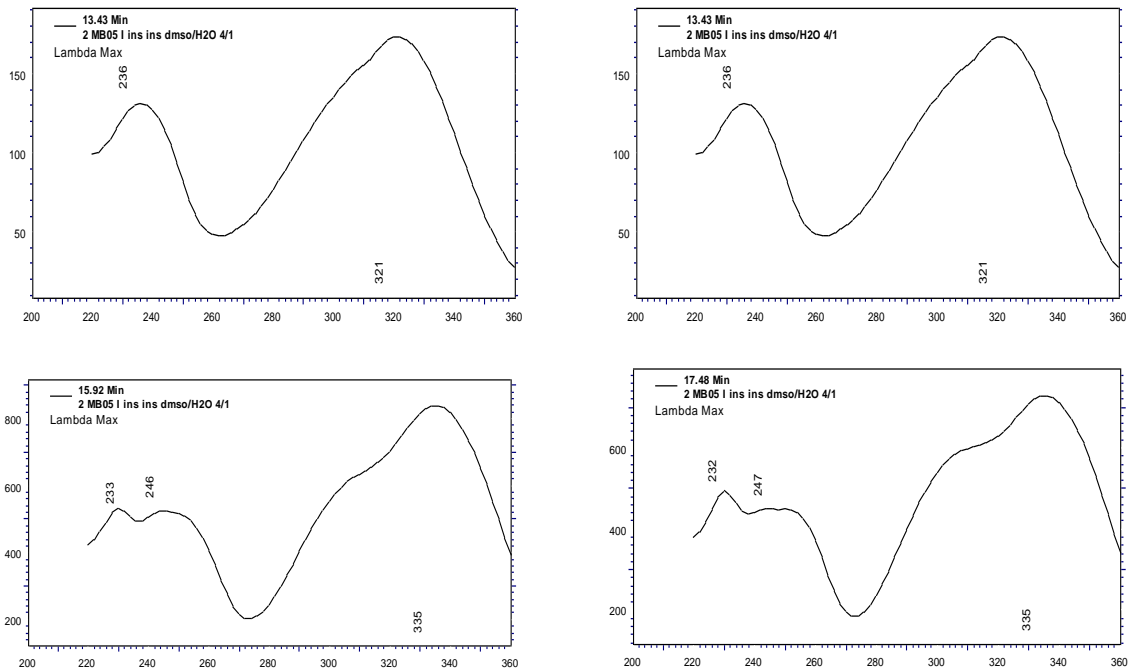


Figure 5 : Spectres UV en vol des pics de l'extrait au MeOH



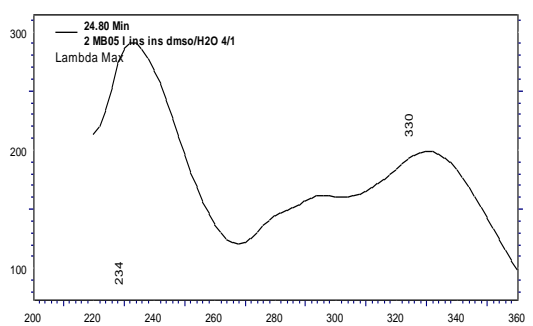
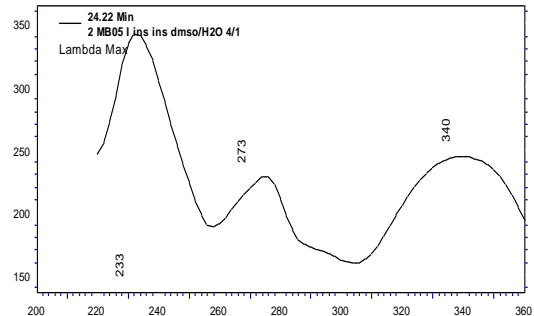
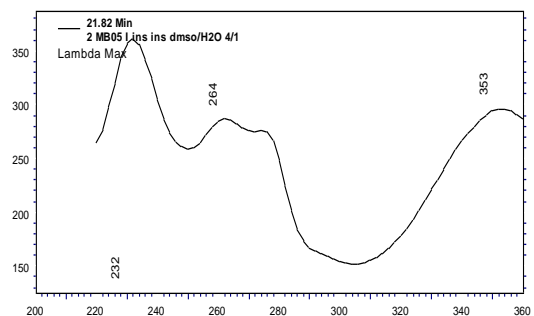
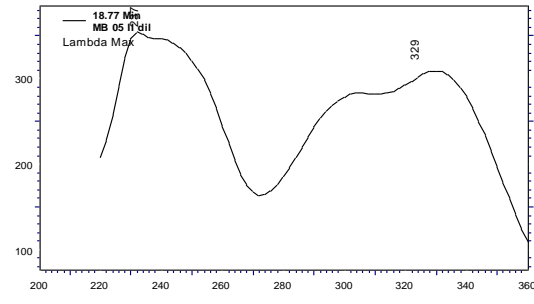
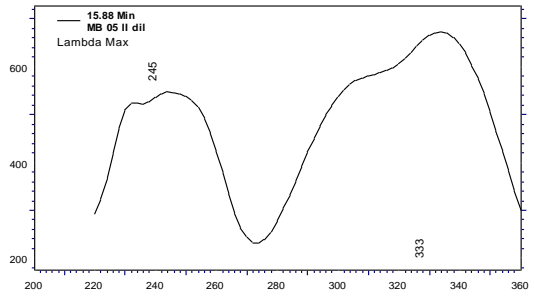
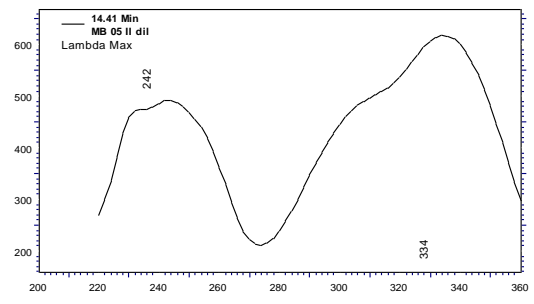
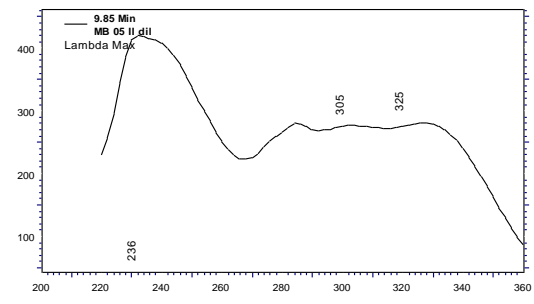


Figure6: Spectres UV en vol des pics de l'extrait acétate d'éthyle



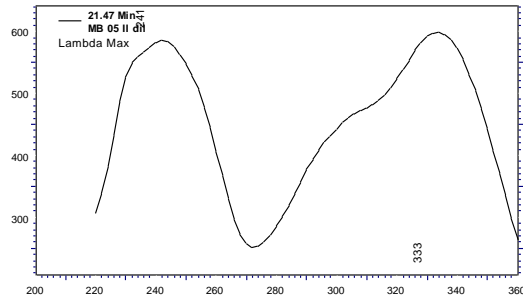
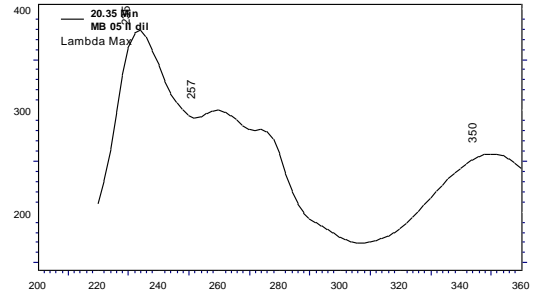
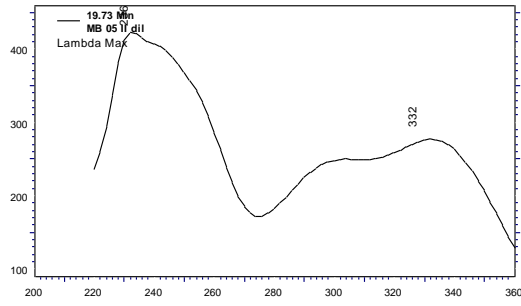


Figure7 : Spectres UV en vol des pics de l'extrait 1-ButOH

Annexe 8

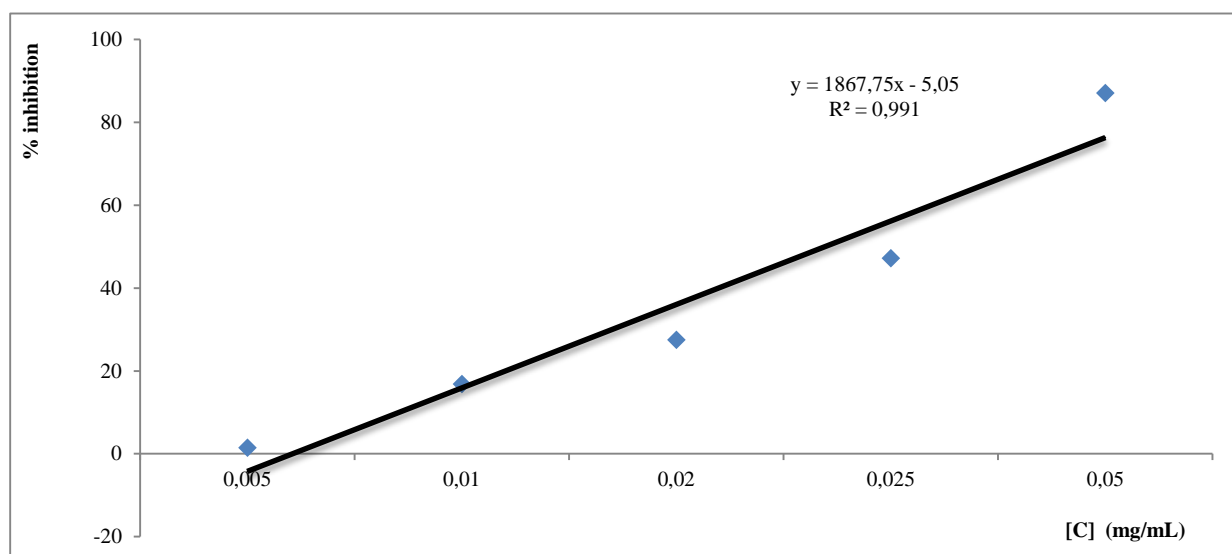


Figure 8: Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

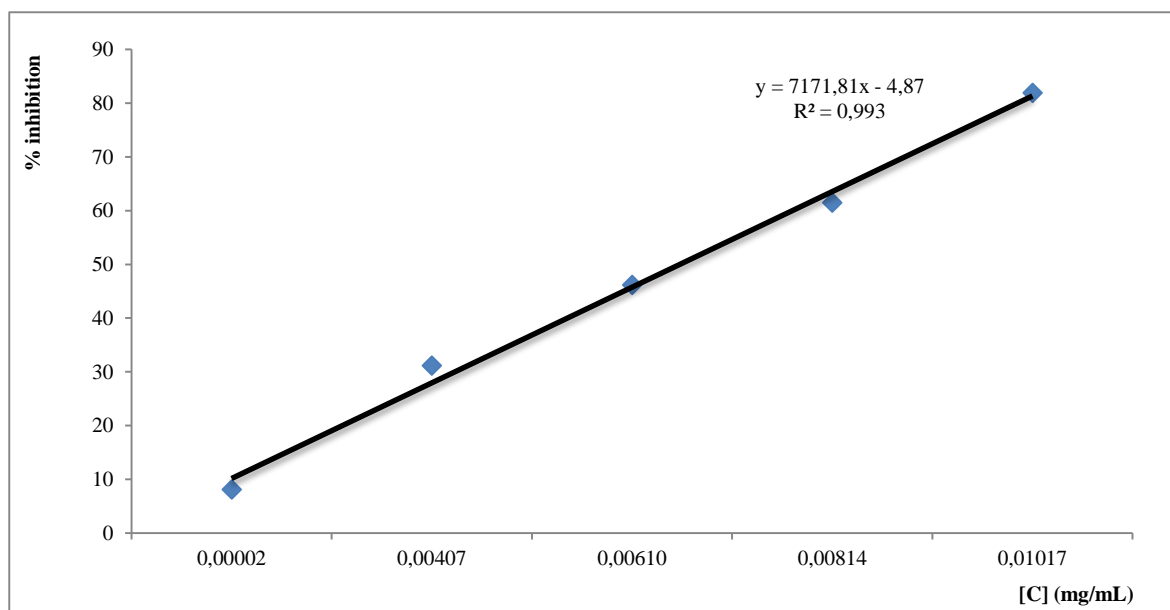


Figure 9: Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de BHT.

Travaux personnelles

Publication:

Bellahsene, C., Bendahou, M., Khadir, A., Zenati, F., Benbelaïd, F., Aissaoui, N., ... & Costa, J. (2015). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil and hydrosol extract of *Nepeta nepetella* subsp. *amethystina* (Poir.) Briq. from Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol 5(09).pp 021-025.

Communications:

Bellahsene, C., Bendahou, M., Khadir, A., Zenati, F., Ben belaid, F., Bouali, W., Museili, A., paollini, J., Desjobert, J. et Costa, J. Antimicrobial activity of essential oil of *Nepeta Nepetella*. Le Congrès International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. 8-10 mai 2012 .Univ. Djillali Liabès. Algérie.

Bellahsene, C, Bendahou, M., Abdelouahid, D. E., Khadir, A., Zenati, F., Benbelaid, F., Abdoune, M. A., Museili, A., Paollini, J., Desjobert, J. Costa .Antimicrobial activity of essential oil of *Nepeta Nepetella*. 4th international workshop on industrial biotechnology .April 10-11 2013, Tlemcen, Algérie.

Résumé

Ce travail est une démarche visant à analyser l'huile essentielle et les flavonoïdes de *Nepeta amethystina*, ainsi que leurs activités antimicrobienne et antiradicalaire. L'analyse des extraits alcoolique, hydroalcoolique et étherique a montré que l'espèce *Nepeta amethystina* est riche en huile essentielle, en flavonoïdes et en tanins. Le dosage des polyphénols totaux par le reactif de Folin-Ciocalteu et les flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ ont révélé la richesse de l'extrait aqueux en polyphénols (11,84 mg EAG /gMs) et l'extrait butanolique en flavonoïdes (7,68 mg EQ/g Ms). L'analyse par CPG/SM de l'huile essentielle obtenu par hydrodistillation (0,6%) et l'extrait d'hydrolat (0,39%) obtenu par extraction liquide-liquide a permis l'identification de 34 composés appartenant majoritairement à la classe des monoterpènes oxygénés dont les népétalactones de type trans-cis (72,40% et 49,21% respectivement) sont les plus abondants. Les analyses par CCM et HPLC ont mis en exergue la présence des terpènes (népétalactones), des acides phénoliques (acides caféïque, sirigique, hydroxybenzoïque, p-coumarique, chlorogénique, cinnamique) et des flavonoïdes (cathéchines, quercétine, kampférol). Alors que l'analyse par RMN (^{13}C , 1H) a révélé la présence des népétalactones, l'acide oléanolique et l'acide 7-déoxyloganique. Les tests de l'activité antimicrobienne des différents extraits réalisés sur quatorze souches (9 bactéries, 3 candidas et 2 moisissures) ont montré que l'huile essentielle et l'hydrolat sont plus antifongiques qu'antibactériens. Par contre, les deux fractions flavonoïdiques (acétate d'éthyle et 1-butanol) ont inhibé la croissance de *Candida albicans* à l'état biofilm. L'activité antioxydante évaluée par les deux méthodes DPPH et FRAP, a montré que l'hydrolat et les extraits flavonoïdiques sont dotés d'un pouvoir antioxydant intéressant.

Mots clés : *Nepeta amethystina*, Analyse, Criblage phytochimique, Huile essentielle, Flavonoïdes, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante.

Summary

This study is an approach to analyze the essential oil and the flavonoids of *Nepeta amethystina*, as well as their antimicrobial and antioxidant activities. The analysis of the alcoholic, hydroalcoholic and etheric extract showed that the *Nepeta amethystina* is rich in essential oil, in flavonoids and in tannins. The dosage of the total polyphenols by the reactive of Folin-Ciocalteu and the flavonoids by the method of $AlCl_3$ revealed the wealth of the aqueous extract in polyphenols (11.84 mg EAG/gMs) and the butanolic extract in flavonoids (7.68 mg EQ/g Ms). The analysis by GPC/MS of the essential oil obtained by hydrodistillation (0.6 %) and the hydrosol extract obtained by liquid-liquid extraction (0.39 %) allowed the identification of 34 compounds belonging mainly to the class of the oxygenated monoterpenes whose trans-cis type nepetalactones are the major compounds (72.40 % and 49.21 % respectively). The analysis by TLC and HPLC highlighted the presence of terpenes (nepetalactones), phenolic acids (caffeic acid, sirigique, hydroxybenzoic, p-coumaric, chlorogenic, cinnamic) and flavonoids (catechins, quercetin, kaempferol). While, the analysis by NMR (^{13}C , 1H) revealed the presence of nepetalactones, oleanolic acid and the 7-déoxyloganic acid. The tests of the antimicrobial activity of the various extracts realized on fourteen strains (9 bacteria, 3 candidas and 2 molds) showed that the essential oil and the extract of hydrolat are more active on fungi than on bacteria. On the other hand, both flavonoidic fractions (ethyl acetate and 1-butanol) inhibited the formation of *Candida albicans* biofilm. The antioxidant activity estimated by two methods (DPPH and FRAP) showed that the hydrosol and the flavonoids extracts revealed an interesting antioxidant power.

Keywords: *Nepeta amethystina*, Analysis, Phytochemical screening, Essential oil, Flavonoids, Antimicrobial activity, Antioxidant activity.

ملخص

هذا البحث يهدف لتحليل زيت الطيار والفلافونويدات المستخلصة من *Nepeta amethystina* بالإضافة لدراسة مسؤلهم كمضاد للبكتيريا والفلافونويدات المستخلصة من الكورين. دراسة المستخلصات الكحولية، المائية والأثيرية أظهرت ثباتها النباتية غنية بالزيت العطري، الفلافونويد و التانينات امام معايير البوليفينوليكاشف Folin-ciocalteu والفلافونويدات بطريقة ثلاثي كلوريد الامنيوم أظهرت ثبات المحلول المائي للفلافونويد و خلاصة بيوتانولغنية بالفلافونويد. تحليل زيت الطيار والهيدرولا المتحصل عليهما بمردود 0,6% و 0,39% على التوالي باستعمال تقنية الكروماتوغرافيا أظهر وجود 34 مركب الأكثر تواجدا من بينها المونوتربينات وخاصة النيببتالكتونات بنسب 72,4% و 49,21%. مكننا التحليل الكروماتوغرافي من تحديد تواجد التربينات وخاصة النيببتالكتونات بالإضافة الى الاحماض الفينولية (acides caféïque, sirigique, 2-hydroxybenzoïque, p-coumarique, chlorogénique, cinnamique) والفلافونويدات (cathéchines, quercétine, kampférol). وتحاليل (^{13}C , 1H) RMN أظهرت تواجد النيببتالكتونات، حمض الاوليبيانوليك وحمض 7 دي اوكسيلوغانيك. اختبار النشاط المضاد للميكروبات (9 بكتيريا و 3 خمائر من نوع *Candida albicans* ونوعين من الفطريات) أظهر بان الزيت الطيار والهيدرولا يتمتعان بقوة مضادة للجراثيم ومستخلص الفلافونويد يمنع نمو بيوفيلم الخاص بـ *Candida albicans* اما دراسة مقدرة المستخلصات كمضادات للاكسدة باستعمال طريقتي DPPH و FRAP بينت فعالية كل من الهيدرولا والفلافونويدات.

الكلمات المفتاحية: *Nepeta amethystina*؛ فحص كيميائي نباتي، زيت عطري، فلافونويد، القدرة المضادة للاكسدة، النشاط المضاد للميكروبات.

