

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et biologie  
Cellulaire et Moléculaire

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجية  
الخلوية و الجزيئية

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie  
**Filière :** Science Biologiques  
**Spécialité :** Biochimie de Nutrition

N° d'ordre :  
N° de série :

Intitulé :

---

Contribution à l'étude des activités biologiques de deux espèces végétales :  
*Stachys byzantina* et *Ocimum basilicum*

---

**Présenté par :** MESSAI Nesrine  
HADDADA Saloua

**Le 30/06/2022**

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** Mme DAKHMOUCHE Scheherazed (MCA, ENS Assia Djebbar, Constantine).

**Examineur 1 :** Mme BENNAMOUN Leila (MCB Université des frères Mentouri, Constantine1).

**Examineur 2 :** LAHNECHE Amina Maya (MCB. ENS Assia Djebbar, Constantine).

**Année universitaire**  
**2021 - 2022**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## ***REMERCIEMENTS***

**Saloua**

**Nesrine**

Nous remercions tout d'abord **Dieu** qui nous donne le pouvoir et le courage pour réaliser ce travail.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide de l'encadrement de **Mme DAKHMOUCHE Scheherazed**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de mémoire.

Nos remerciement aux membres de jury **Mme BENNAMOUN Leila** et **Mme LAHNECHE Amina Maya** qui ont accepté d'examiner notre travail avec bienveillance.

Un grand merci à toute l'équipe de Laboratoire de biochimie, faculté de Science de la Nature et de la Vie Université des Frères Mentouri Constantine 1 et laboratoire de biochimie du Centre National de Recherche en Biotechnologie CRBT de Constantine pour leurs aides.

Nous remercions tous nos professeures depuis la première année jusqu'à la dernière année.

Merci à tous les personnes qui ont aidé de près ou de loiz notre travail.

## **DÉDICACES**

*Avec louange et action de grâces à Dieu dernières bénédictions ...louanges et remerciements à Dieu d'abord.*

*Je dédie ce travail :*

*À ma très chère mère «**Benchikhe Sonia** »*

*L'exemple parfait de la femme idéale et la source de tendresse aussi le symbole d'amour et des sacrifices, qui ma toujours poussée et encouragée pour étudiée et être ce que je suis*

*Je t'aime maman*

*À mon très cher père «**Haddada Azzedine**»*

*Tu as toujours été à mes cotés pour me soutenir et m'encourager*

*Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection*

*Que Dieu te protège*

*À mon cher fiancé : « **Hamlaoui Bachir** »*

*À mes très chers frères : **Abdarrahim, Syfaddine et Mohamed***

*À mes belles sœurs : **Sara, Douâa et Iman***

*À tout ma famille « **Haddada** »*

*À toutes mes amis de près ou de loin*

*À toutes mes camarades de promotion*

*À toutes les personnes qui j'aime*

*Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite*



**SALOUA**



## **DÉDICACES**

*Avant toute chose je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience et le courage pour terminer mes études et réaliser ce travail*

*JE DEDIE CE MODESTE TRAVAIL :*

*À toutes les personnes qui m'encouragent toujours aux moments difficiles :*

*À ma très chère mère « YASSADI Nadia »*

*L'exemple parfait de la femme idéale et la source de tendresse aussi le symbole d'amour et des sacrifices, qui ma toujours poussée et encouragée pour étudiée et être ce que je suis*

*Je t'aime maman*

*À mon très cher père « MESSAI Rachid »*

*Tu as toujours été à mes cotés pour me soutenir et m'encourager*

*Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection*

*Que Dieu te protège*

*À mon cher marie : ZIMOUCHE Walid*

*À petit bel fils : ABD EL MOUDJIB*

*À mes très chers frères : Salah eddine, Alaeddine*

*À ma unique belle sœur : Raghed*

*À tout ma famille « MESSAI »*

*À toutes mes amies de près ou de loin*

*À toutes mes camarades de promotion*

*À toutes les personnes qui j'aime*

*Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite*



**NESRINE**

## TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
INTRODUCTION.....	01

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

#### CHAPITRE I : PLANTES MEDICINALES ETUDIÈES

I. Généralités sur « <i>Ocimum basilicum</i> ».....	03
I.1. Historique.....	03
I.2. Description botanique.....	03
I.2.1. Classification .....	03
I.2.2. Distribution géographique.....	04
I.2.3. Caractéristiques.....	05
I.2. Utilisation.....	05
II. Généralités sur « <i>Stachys byzantina</i> ».....	06
II.1. Historique.....	07
II.2. Description botanique.....	07
II.2.1. Classification.....	07
II.2.2. Distribution géographique.....	07
II.2.3. Caractéristiques.....	08
II.2. Utilisation .....	09

#### CHAPITRE II : METABOLITES SECONDAIRES

I. Métabolites secondaires.....	10
I.1. Définition.....	10
I.2. Classification de métabolites secondaires .....	10
I.2.1. Composés phénoliques.....	10

I.2.1.1. Définition.....	10
I.2.1.2. Classification des composés phénoliques.....	11
I.2.1.2.1. Flavonoïdes.....	11
I.2.1.2.2. Tanins .....	14
I.2.1.2.2.a Tanins hydrolysables.....	14
I.2.1.2.2.b. Tanins condensés.....	15
I.2.2. Composés terpéniques.....	15
I.2.2.1. Définition.....	15
I.2.2.2. Classification des terpènes.....	15
I.2.3. Les composés alcaloïdes.....	16
I.2.3.1. Définition.....	16
I.2.3.1. Classification des alcaloïdes .....	17

### **Chapitre III : ACTIVITES BIOLOGIQUES**

I. Activités Anti-oxydantes .....	18
I.1. Stress Oxydatif .....	18
I.2. Radicaux libres .....	18
I.3. Détermination de l'activité antioxydante.....	19
I.3.1. Activité anti-radicalaire par le test au DPPH° .....	19
I.3.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS.....	19
I.3.3. Activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>2+</sup> phenanthroline.....	20
I.3.4. Activité du pouvoir réducteur FRAP .....	21
II. Activité Antibactériennes.....	21
II.1. Choix de germes.....	21
II.2. Aspect méthodologique.....	21
II.2.1. Méthode de référence : Méthode en milieu gélosé.....	21
II.2.2. Méthode fréquente : Méthode des disques.....	22
II.2.3. Méthode alternative : Méthode en milieu liquide.....	22
III. Activité antifongiques.....	24
III.1. Evaluation de l'activité antifongique.....	24
III.2. Test-antifongique (anti-fongigramme).....	24
IV. Activité Enzymatiques.....	24
IV.1. Maladie d'Alzheimer.....	25

IV.2. Activité anti cholinestérase.....25

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES**

I. Matériel végétal.....26

    I.1. Broyage et tamisage.....26

II. Méthode d'extraction.....27

    II.1. Extraction solide-liquide.....27

        II.1. 1.Macération par une solution hydro-alcoolique.....27

        II.1.2. Macération aqueuse.....27

    II.2. Rendement d'extraction.....30

III. Analyse quantitatives.....30

    III.1. Dosage des polyphénols totaux.....30

    III.2. Dosage des flavonoïdes.....32

IV. Evaluation de l'activité biologique in vitro.....34

    IV.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....34

        IV.1.1. Piégeage du radical libre diphényle-picryl-hydrazyle (DPPH).....35

        IV.1.2. Piégeage du radical (ABTS).....35

        IV.1.3. Pouvoir réducteur (FRAP).....36

        IV.1.4. Activité phénanthroline .....36

    IV.2. Evaluation de l'activité enzymatique in vitro.....36

        IV.2.1. Activité de l'acétylcholine estérase.....36

    IV.3. Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique.....37

### **CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

I. Détermination du rendement de l'extraction.....39

II. Analyses quantitatives .....40

    II.1. Dosage des polyphénols totaux .....40

    II.2. Dosage des flavonoïdes.....42

    II.3. Evaluation des activités biologiques in vitro.....44

        II.3.1.Evaluation d'activité antioxydant.....44

II.3.1.1. Test DPPH° .....	44
II.3.1.2. Test ABTS.....	45
II.3.1.3. Test Phénantroline.....	47
II.3.1.4. Test FRAP.....	48
II.3.2. Evaluation d'activité enzymatique.....	51
II.3.2.1. Activité de l'acétylcholine estérase.....	51
II.3.3. Activité Antibactériennes.....	52
II.3.4. Activité antifongiques.....	56
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>60</b>
<b>RESUMÉ</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>ملخص</b>	

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 01 :** Classification hiérarchique d'*Ocimum basilicum*
- Tableau 02 :** Classification hiérarchique de *Stachys byzantina*
- Tableau 03 :** Fiche technique de *Stachys byzantina*
- Tableau 04 :** Structure des différentes sous-classes des flavonoïdes résumés
- Tableau 05 :** Principales Classes de terpénoïdes
- Tableau 06 :** Les différentes classes des alcaloïdes
- Tableau 07 :** Le rendement des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*
- Tableau 08:** Contenu total en polyphénols des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*.
- Tableau 09 :** Contenu total en flavonoïdes des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*
- Tableau 10:** Valeurs des CI<sub>50</sub> du test DPPH pour les extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*
- Tableau 11:** Valeurs des CI<sub>50</sub> du test ABTS pour les extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*
- Tableau 12:** Valeurs des A<sub>0,5</sub> du test phénantroline pour des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*
- Tableau 13:** Valeurs des A<sub>0,5</sub> du test FRAP pour les extraits brut d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*
- Tableau 14:** Valeurs des CI<sub>50</sub> des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* obtenus par le test d'acétylcholinestérase.
- Tableau 15:** Effet inhibiteur des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sur la culture de *P. aeruginosa*
- Tableau 16 :** Effet inhibiteur des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sur la culture de *S.aureus*
- Tableau 17 :** Effet inhibiteur des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sur la culture d'*E.coli*
- Tableau 18 :** Effet inhibiteur des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sur la culture de *Fusarium oxysporium sp.albedinis*

## LISTE DES FIGURES

- Figure 01 :** *Ocimum Basilicum* (Basilic)
- Figure 02 :** Présence mondiale d'*ocimum basilicum*
- Figure 03 :** *Stachys byzantina* (Oreille de lapin ou d'ours)
- Figure 04 :** Répartition de *Stachys byzantina* en France
- Figure 05 :** Structure d'un phénol le plus simple des composés phénoliques
- Figure 06 :** Principales catégories de polyphénols et des principaux flavonoïdes
- Figure 07 :** 2-phénylchromane Structure de base des flavonoïdes
- Figure 08 :** Structures de base des principaux flavonoïdes
- Figure 09 :** Types de tanins hydrolysables
- Figure 10 :** Structure d'un tanin condensé
- Figure 11 :** La structure du radical DPPH° et sa réduction par un antioxydant (AO-H)
- Figure 12 :** Réaction chimique d' ABTS
- Figure 13 :** Formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phenanthroline
- Figure 14 :** La réduction du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>
- Figure 15 :** Principe de la diffusion du principe actif dans la méthode « des disques »
- Figure 16 :** Macrométhode en milieu liquide
- Figure 17 :** Microméthode en milieu liquide
- Figure 18 :** La poudre de la partie aérienne après broyage
- Figure 19 :** Etapes de l'extraction solide-liquide
- Figure 20 :** Protocole d'étude expérimentale
- Figure 21 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique
- Figure 22 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine
- Figure 23 :** Préparation des dilutions et mode opératoire sur une microplaque 96 puits
- Figure 24 :** Plaque de dosage des Polyphénols des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bisantina*
- Figure 25 :** Courbe d'étalonnage Acide gallique
- Figure 26 :** Plaque de dosage des flavonoïdes des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bisantina*
- Figure 27 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine
- Figure 28 :** Plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bisantina*

- Figure 29 :** Plaque de dosage du cation radical ABTS des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bizantina*
- Figure 30 :** Plaque de dosage de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup> phénantroline des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bizantina*
- Figure 31 :** Plaque de dosage du pouvoir réducteur (FRAP) des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bizantina*
- Figure 32 :** Plaque de dosage de l'acétylcholine estérase des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bizantina*
- Figure 33 :** Test antibactérienne des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bizantina* Sur *P. aeruginosa*
- Figure 34 :** Test antibactérienne des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bizantina* Sur *S. aureus*
- Figure 35 :** Test antibactérienne des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bizantina* Sur *E. coli*
- Figure 36 :** Résultats du test antifongique des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys bizantina* sur *Fusarium oxysporium sp.albedinis*



**LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>C<sup>0</sup></b>	Degré Celsius
<b>A0.5</b>	Concentration indiquant 0,50 d'absorbance
<b>ABTS</b>	Acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique
<b>AChE</b>	Acétylcholine estérase
<b>Aq</b>	Aqueux
<b>ASCh</b>	Acétylthiocholine
<b>CI50</b>	Concentration d'inhibition à 50%
<b>CMI</b>	Concentration minimale d'inhibition
<b>Da</b>	Dalton
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>DTNB</b>	5-5' dithiobis-2-nitrobenzoïque
<b>EOA</b>	Espèces oxygénées activées
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>EXT</b>	Extrait
<b>FCR</b>	Folin-Ciocalteu
<b>FRAP</b>	Pouvoir antioxydant réducteur ferrique
<b>g</b>	Gramme
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydases
<b>HA</b>	Hydro alcoolique
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>mg</b>	Milligramme
<b>min</b>	Minute
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonate de sodium
<b>OB</b>	<i>Ocimum basilicum</i>
<b>SB</b>	<i>Stachys byzantina</i>
<b>SOD</b>	Super oxyde dismutases
<b>TC</b>	Tanins condensés
<b>CTF</b>	Contenu total en flavonoïdes
<b>TH</b>	Tanins hydrolysables
<b>CTP</b>	Contenu total en Polyphénols
<b>TPTZ</b>	Tripyridyltriazine
<b>µl</b>	Microlitre

# *Introduction*

## INTRODUCTION

Avec une superficie de 2 381 741 km<sup>2</sup>, l'Algérie est le plus grand pays riverain de la Méditerranée. Il est reconnu par sa diversité en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays (**Sahi, 2016**).

L'Algérie, par la richesse et la diversité de sa flore, constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires. Cependant, la flore médicinale algérienne reste méconnue jusqu'à nos jours, car sur les quelques milliers d'espèces végétales, seules 146 sont dénombrées comme médicinales (**Hamel *et al.*, 2018**).

Les plantes médicinales sont les plantes utilisées en phytothérapie pour leurs principes actifs. Souvent, parmi ces plantes certaines sont également des aromatiques (Basilic, Souge, Thym, Menthe, etc...), sont très faciles à cultiver, puis elles sont récoltées, séchées pour être finalement consommées sous forme de préparation diverses (**Boutamina, 2014**).

Les plantes médicinales sont une bonne source de produits naturels pouvant avoir une activité antimicrobienne, antidiabétique, anti-Alzheimer et anti-inflammatoire. Ceci en raison de leur richesse en métabolites secondaires tels que les terpènes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Donc la présence des antioxydants naturels dans les plantes peut fournir une protection contre un certain nombre de maladies et leur utilisation a été inversement associée à la morbidité et à la mortalité due aux troubles dégénératifs (**Baba et Malik, 2015**).

L'étude de la médecine traditionnelle et du traitement par les plantes est donc particulièrement intéressante car peu de travaux de recherche ont concerné cet aspect, et plus particulièrement l'utilisation des espèces spontanées en médecine traditionnelle (**Hamel *et al.*, 2018**).

Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoirs antifongique, antibactérien, antioxydant et insecticide (**Hmiri *et al.*, 2011**).

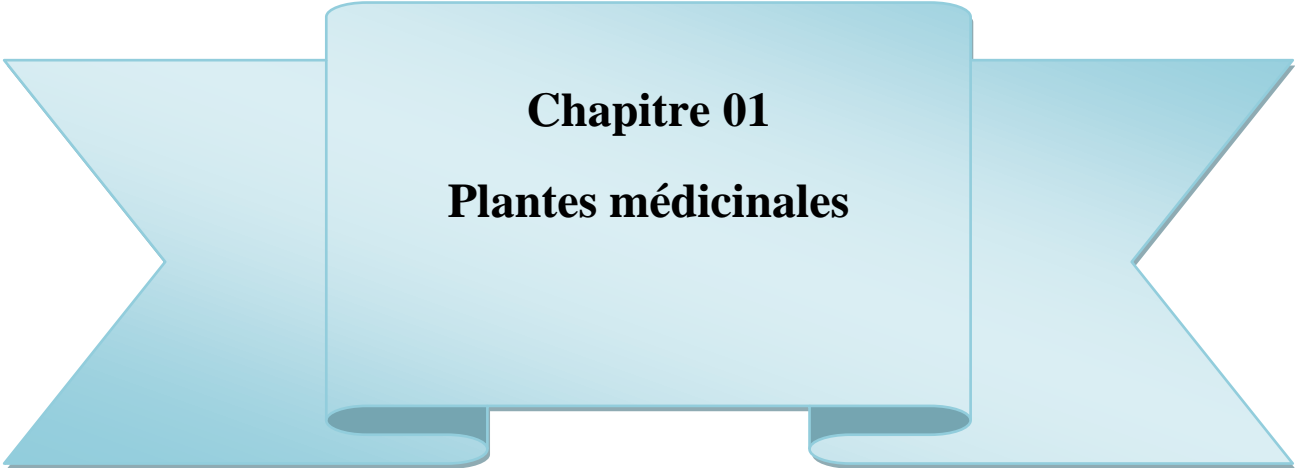
La recherche de nouveaux médicaments plus efficaces et sans effets secondaires pour combattre le stress oxydatif et les différentes maladies est devenue un défi majeur des chercheurs. Les plantes ont toujours suscité l'intérêt des chercheurs eu égard à leur richesse en molécules thérapeutiques, propagation dans le monde, diversité, accessibilité, disponibilité en quantités importantes et les informations prises de l'usage traditionnel. C'est pourquoi, le présent travail a été entrepris afin de mettre en évidence les propriétés phytochimiques et thérapeutiques de deux plantes largement distribuées en Algérie :

Notre manuscrit renferme une partie bibliographique en deux chapitres ; Dans le premier, nous avons présenté la morphologie des deux plantes étudiées, leurs répartitions géographique et leurs utilisations. Le deuxième chapitre traite les différentes activités biologiques, nous avons décrit le principe de certaines activités.

Pour la partie expérimentale, elle renferme le matériel et les méthodes utilisées, les résultats et leurs discussions ainsi qu'une conclusion générale. Les différentes étapes de notre travail sont :

- ✓ Préparation des extraits organiques à partir de la partie aérienne des deux plantes.
- ✓ Détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes présentes dans les extraits de la plante.
- ✓ Evaluation croisée de l'activité antioxydante, antibactérienne, antifongique et enzymatique in vitro par plusieurs tests.

*Revue*  
*Bibliographique*



**Chapitre 01**  
**Plantes médicinales**

## I. *Ocimum Basilicum* (Basilic)

*Ocimum basilicum* (Basilic) est une plante de la famille des Lamiacées (labiacées, labiées) (figure 01), cultivée comme plante aromatique et condimentaire (Site 01).



Figure 01 : *Ocimum Basilicum* (Basilic)

### I.1. Historique

A I<sup>er</sup> siècle évoque une croyance répandue en Afrique selon laquelle la consommation de basilic supprime les douleurs provoquées par une piqûre de scorpion. Aussi, les Romains ont utilisé cette plante pour combattre les flatulences, favoriser la montée de lait ainsi que comme antidote et diurétique (*Encyclopédie, 2002*).

### I.2. Description botanique

#### I.2.1. Classification

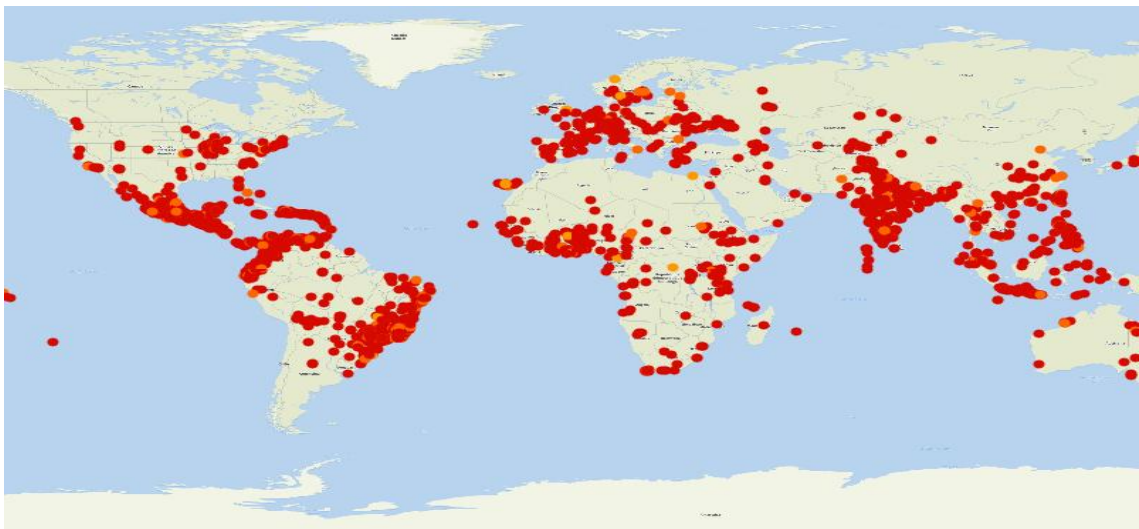
La classification d'*Ocimum basilicum* est présentée dans le tableau suivant :

**Tableau 01** : Classification hiérarchique d'*Ocimum basilicum* (site 02).

Domaine	<b>Biota Endl. (D.Don)</b>
Règne	<b>Plantae Haeckel</b>
Sous-Règne	<b>Viridaeplantae</b>
Classe	<b>Equisetopsida C.Agardh</b>
Sous-Classe	<b>Magnoliide Novak ex Takht</b>
Famille	<b>Lamiaceae Martinov</b>
Sous-Famille	<b>Nepetoideae Burnett</b>
Genre	<b>Ocimum</b>
Espèce	<b>basilicum</b>

### I.2.2. Distribution géographique

Le genre *Ocimum*, appelé collectivement basilic, a longtemps été acclamé pour sa diversité. Il comprend au moins 150 espèces et de nombreuses variétés (Abramovič *et al.*, 2018) distribuées dans les régions tropicales et subtropicales d'Asie, d'Afrique et d'Amérique centrale et du Sud (figure 02), mais le principal centre de diversité semble être l'Afrique (Simon *et al.*, 1999).

**Figure 02** : Présence mondiale d'*Ocimum basilicum* (site 02).



### **I.2.3. Caractéristiques d'*Ocimum basilicum***

#### **I.2.3.1. Systématique**

Nom Scientifique : *Ocimum basilicum*

Nom commun : Basilic, le basilic commun, basilic romain, herbe royale ou pistou.

#### **I.2.3.2. Description Botanique**

C'est une plante herbacée qui peut atteindre 15 à 50 cm de hauteur. Ses feuilles sont lisses, longues et larges. Ses fleurs sont blanchâtres ou rosées. Son parfum est très aromatique (**site 03**).

#### **I.2.3.3. Habitat**

C'est une espèce cultivée dans les jardins familiaux (**site 03**). Sans doute originaire de l'Inde, le basilic commun (plus de 150 espèces) est cultivé dans le monde entier comme aromate et pour son huile essentielle. On récolte les feuilles et les sommités fleuries à la floraison. (*Encyclopédie, 2002*)

### **I.3. Utilisation d'*Ocimum basilicum***

#### **I.3.1. Domaine pharmaceutique**

Les feuilles de basilic ont beaucoup d'avantages pharmaceutiques à savoir l'activité anticancéreuse, l'activité radioprotectrice, l'activité antimicrobienne, les effets anti-inflammatoires, l'activité immunomodulatrice, l'activité antistress, l'activité antidiabétique, l'activité antipyrétique, l'activité anti-arthrite, activité antioxydante, Antalgique, en tant qu'agent prophylactique dans les maladies cardiovasculaires. Nous utilisons également le basilic dans le traitement du rhume et du paludisme (**Shahrajabian et al., 2020**).

#### **I.3.2. Domaine médicinale**

Le basilic, qui agit principalement sur le système nerveux et l'appareil digestif, agit en cas de flatulences, de maux d'estomac, de coliques et d'indigestions. Il est également utilisé pour prévenir ou soulager les nausées et vomissements, et pour éliminer les vers. Du fait de son action sédative légère, le basilic est préconisé pour soigner l'irritabilité, la dépression, l'anxiété et les troubles du sommeil. Il est prescrit également contre l'épilepsie,

la migraine et la coqueluche. En usage externe, les feuilles de basilic éloignent les insectes. Le jus des feuilles soulage la douleur des morsures et des piqûres d'insectes. Le basilic a une action antibactérienne bien établie (*Encyclopédie, 2002*). Traditionnellement, il a été utilisé dans les problèmes rénaux, comme hémostatique à l'accouchement, mal d'oreille, irrégularités menstruelles, arthrite, anorexie (*Shahrajabian et al., 2020*)

### **I.3.3. Plantes aromatiques**

Le basilic, comme toutes les plantes aromatiques, est indispensable en cuisine pour parfumer les plats. Il est couramment utilisé pour la préparation du riz, de la viande, des ragoûts et des soupes (*Shahrajabian et al., 2020*).

## **II. *Stachys byzantina***

*Stachys byzantina* (épière de byzance ou laineuse) est une plante appelée aussi oreille de lapin ou d'ours (**figure 03**) à cause de la forme élancée et le duvet de ses feuilles de couleur gris-blanc. La corolle des fleurs est de couleur rose violacée et possède une lèvre supérieure concave (**Rebiere et Rebiere, s. d.**).



**Figure 03 : *Stachys byzantina* (Oreille de lapin ou d'ours).**

## II.1. Historique

C'est une plante médicinale très ancienne : les Égyptiens ont fumé les feuilles pour traiter de nombreux maux, dont les blessures, les problèmes digestifs et les difficultés respiratoires (**Rebiere et Rebiere, s. d.**).

## II.2. Description botanique

La plante *Stachys byzantina* peut atteindre 40 à 80 cm, montre des feuilles très épaisses et très douces, couvertes sur les deux faces, ainsi que la tige, d'une laine blanche extrêmement épaisse, la plupart sont lancéolées-aiguës, produisant au toucher la sensation d'une peluche. Leurs petites fleurs sont la plupart du temps, cachées par le flou, les calices où les cultivars fleurissent rarement (**Hawke, 2005; Garnier, 2020 et Benoit et al., 2021**)

### II.2.1. Classification

La classification de *Stachys byzantina* est montrée dans le tableau suivant :

**Tableau 02** : Classification hiérarchique de *Stachys byzantina* (**Benoit et al., 2021**)

Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Stachys
Espèce	Byzantina

### II.2.2. Distribution géographique

Le genre *Stachys* répartis dans les régions tempérées de la Méditerranée, l'Asie, l'Amérique et l'Afrique du sud (**Tomou et al., 2020**). Cette plante originaire de l'Iran, de la Turquie, de l'Arménie et de l'Azerbeïdjan (**Garnier 2020**) est fréquemment cultivée et subsponnée en Europe, notamment en France (**figure 04**) (**Benoit et al., 2021**).

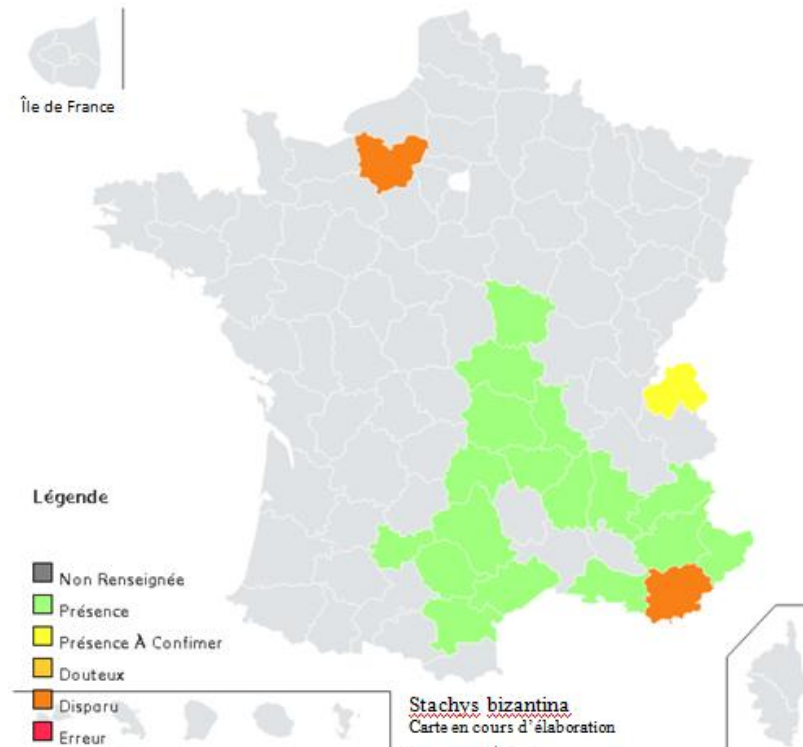


Figure 04 : Répartition de *Stachys byzantina* en France (Benoit et al 2021)

### II.2.3. Caractéristiques de *Stachys byzantina*

#### II.2.3.1. Systématique

Le tableau suivant montre la fiche technique de la plante *Stachys byzantina*

Tableau 03 : Fiche technique de *Stachys byzantina* (site04)

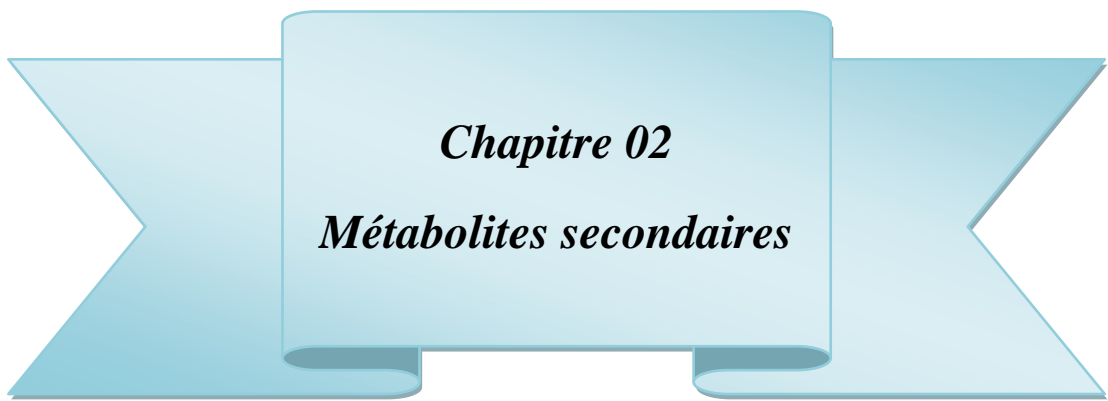
Nom Scientifique	<i>Stachys byzantina</i>
Synonyme	<i>Stachys lanata</i> , <i>Stachys olympica</i> , oreilles de lièvre, Épiaire de bizance, Épiaire laineuse
Nom commun	Oreille d'ours, Oreille de lapin
Origine	Asie mineure, Caucase, Turquie
Floraison	Juin, juillet et août
Fleurs	Mauve
Type	Plante herbacée, couvre sol
Végétation	Vivace

### **II.2.3.2. Habitat**

Les espèces de *Stachys* ne craignent ni le froid ni les terrains secs (**Menou 2007**). Cette plante peut être cultivée et s'adaptée facilement aux climat secs en montrant une croissance rapide (**Rebiere et Rebiere, s. d.**). Elle est généralement facile à cultiver dans les sols humides et bien drainés, en plein soleil et à l'ombre. Il a été montré qu'un bon drainage dans l'été et l'hiver est essentiel pour la santé et la longévité de *S. byzantina* et d'autres espèces à feuilles laineuses (**Hawke, 2005**). *Stachys byzantina* est une lamiacée utilisée fréquemment en culture ornementale dans les jardins (**Garnier 2020**).

### **II.3. Utilisation**

Les espèces de *stachys* sont largement utilisées comme antispasmodique, désinfectant, antitussif, cicatrisant, antiasthmatique, anticancéreux et emménagogue. En outre, des études modernes ont révélé, chez cette plante, la présence des activités antibactériennes, antifongiques, anti-anxiolytiques ainsi que des activités de cytotoxicité de leurs huiles essentielles (**Bahadori et al., 2020**). Des préparations à base de plusieurs espèces de ce genre sont largement utilisées pour le traitement du stress, les inflammations de la peau, troubles gastro-intestinaux, l'asthme et les tumeurs génitales (**Tomou et al., 2020**).



***Chapitre 02***  
***Métabolites secondaires***

## I. Métabolites secondaires

### I.1. Définition

Les métabolites secondaires sont de petites molécules (poids moléculaire de quelques centaines de daltons) de structure complexe et originale et généralement très stables. Les métabolites secondaires ou spécifiques ne sont pas indispensables à la vie mais interviennent favorablement dans les relations d'entretien de l'organisme producteur avec son environnement (défense, reproduction, communication et prédation) (**Pogam *et al.*, 2015**).

Les métabolites secondaires renferment toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante. Ces composés regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimique (**Djermane & Gherraf, 2013**).

### I.2. Classification de métabolites secondaires

On distingue trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- Les composés phénoliques.
- Les composés terpéniques.
- Les composés alcaloïdes.

Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Krief, 2003**).

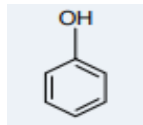
#### I.2.1. Composés phénoliques

##### I.2.1.1. Définition

Les composés phénoliques constituent un large groupe de substances qui possèdent un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (**Kouakou *et al.*, 2017**). Ils sont présents chez tous les végétaux supérieurs. Ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont caractérisés par une répartition qualitative et quantitative très inégale selon les espèces considérées mais aussi les organes, les tissus et les stades physiologiques (**Macheix, 1996**).

Ces composés renferment 8000 molécules connues, sont une des principales classes de métabolites secondaires des plantes. Leurs structures et leurs fonctions sont très diverses. Ils possèdent, au minimum, un cycle aromatique portant un à plusieurs

groupes hydroxyles (**fig 05**) (Mehinagic *et al.*, 2011).



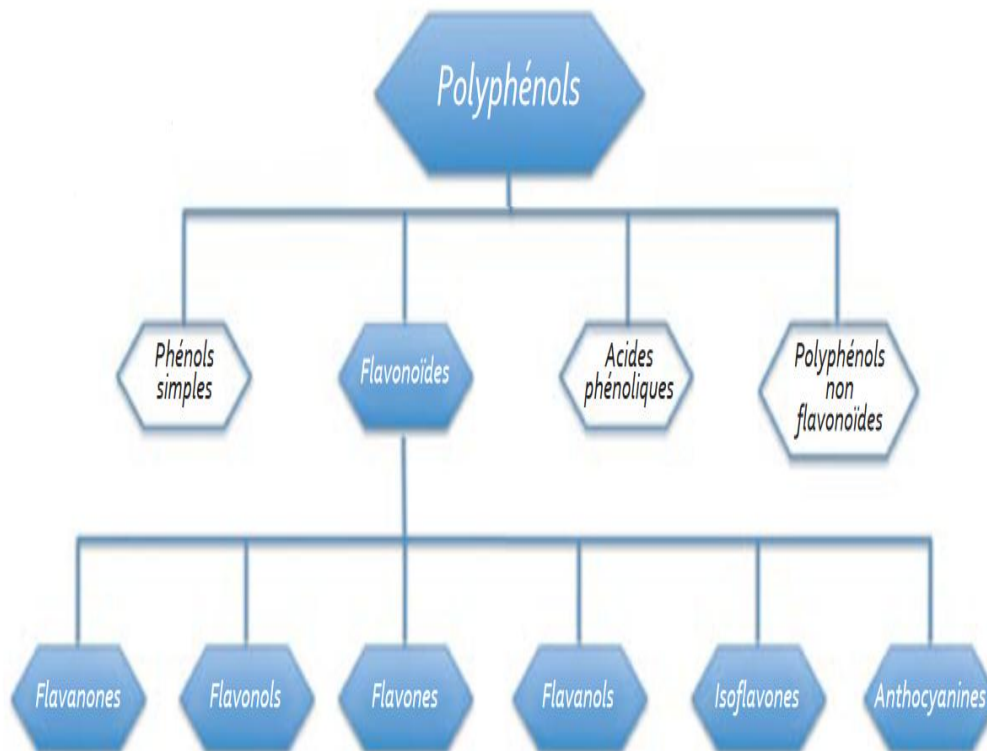
**Figure05** : Structure d'un phénol le plus simple des composés phénoliques.

### I.2.1.2. Classification des composés phénoliques

#### I.2.1.2.1. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés naturels répartis en plusieurs familles dont les plus importantes sont les flavones et les isoflavones qui se trouvent dans les plantes très colorées (Causse, 2005).

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 5000 composés différents identifiés dans le règne végétal, Les flavonoïdes sont classés en différentes catégories dont les plus importantes sont les flavanones, les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones et les anthocyanes. La (**fig 06**) montre les différentes classes des polyphénols et des principaux flavonoïdes selon Massaux (2012).



**Figure06** : Principales catégories de polyphénols et des principaux flavonoïdes.



Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6, soit deux noyaux aromatiques (benzo- $\gamma$ -pyrone) reliés par un pont de 3 carbones. Ces molécules possèdent toutes un squelette chimique commun illustré en (fig 07) (Elhadi, 2018).

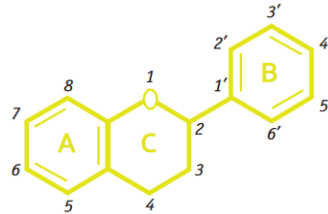


Figure 07 : 2-phénylchromane Structure de base des flavonoïdes.

La Structure de base des principaux flavonoïdes montrés dans la figure suivante :

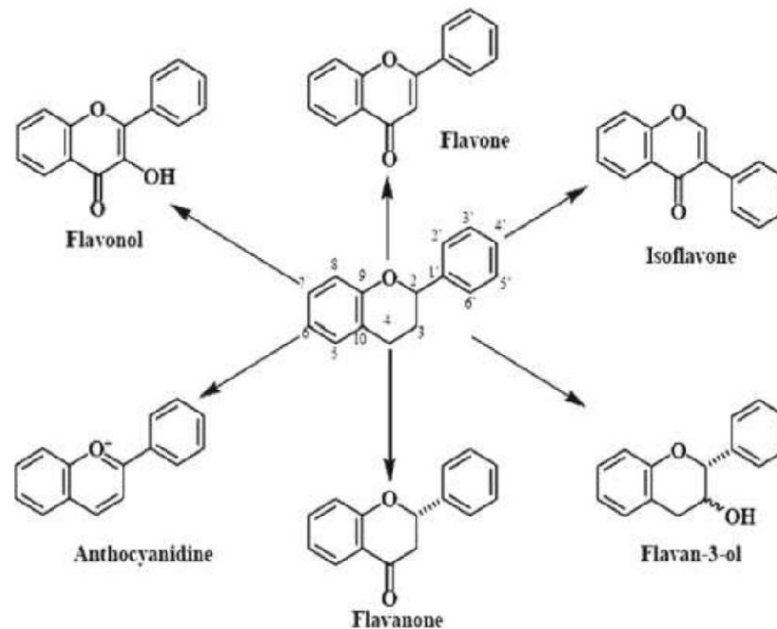
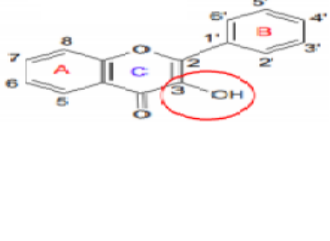
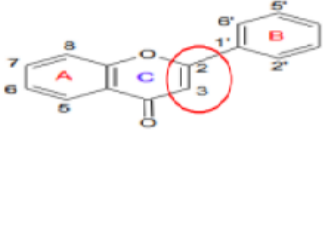
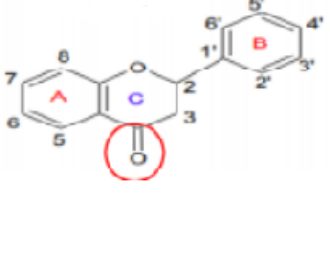
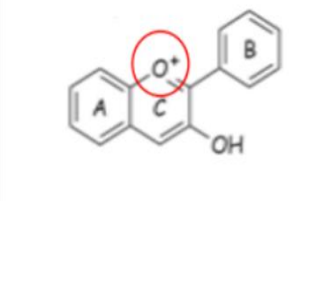
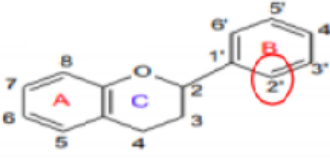


Figure 08 : Structures de base des principaux flavonoïdes (Elhadi, 2018).

Ces métabolites secondaires sont toujours tricycliques et caractérisé par la présence de deux cycles benzoïques A et B et d'un hétérocycle oxygéné (Tab 04) (Belkhiri & Baghiani, 2017).

**Tableau 04** : Structure des différentes sous-classes des flavonoïdes résumés à partir de Singla et al., (2019).

Structures	Différentes sous-classes des flavonoïdes
	<p>Flavonols (dihydroflavonols) : sont les dérivés de 3-hydroxyle de flavanones, il diffèrent des flavones par la présence d'un groupe hydroxyle dans la position C3, certains des flavonols les plus connus sont kaempférol et la quercétine.</p>
	<p>Flavones : ce qui concerne les flavones, un groupe carbonyle est présent en position C4 et le cycle B est attaché au cycle hétérocyclique en position C2 ; de plus, il existe une double liaison entre les atomes C2 et C3. Les flavones les plus importantes sont la lutéoline et l'apigénine.</p>
	<p>Flavanone : Contrairement aux flavonols et aux flavones, avec le groupe carbonyle en position C4, le cycle hétérocyclique des flavanones a une chaîne saturée à trois carbones sans groupe hydroxyle en position C3. Les flavanones sont caractérisées par un grand nombre dérivés substitués (Ex : les flavanones prénylées et les flavanones benzylées)</p>
	<p>Anthocyanidine : La présence de deux doubles liaisons dans leurs hétérocycles et caractérisées par des groupement hydroxyle et méthylation sur le cycle B. les différences dans le nombre de groupes hydroxyl et la nature et le nombre d'unités de sucre attachées à leur structure se traduisent par une variété d'anthocyanes.</p>
	<p>Flavane : Contient un cycle hétérocyclique saturé et il n'y a pas de double liaison entre C2 et C3, et le groupe hydroxyle est en position C3.</p>

### I.2.1.2.2. Tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires des plantes, leur conférant une protection contre les prédateurs (herbivores et insectes) (Paolini *et al.*, 2003). Ils ont un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs et les graines des plantes. Ils sont d'un grand intérêt pour la nutrition et la médecine à cause de leur capacité antioxydante puissante et leur effet protecteur possible sur la santé humaine (Belkhiri & Baghiani, 2017).

Les tanins renferment deux classes (Doat, 1978).

-Les pyrogallique (ou hydrolysables).

-Les catéchique (ou condensés non hydrolysables).

#### I.2.1.2.2.a. Tanins hydrolysables (TH)

TH sont des composés insolubles dans l'eau, ils se décomposent en sucres et en acides carboxyliques phénoliques, ils se subdivisent selon leurs produits d'hydrolyse en gallotanins (acide gallique et glucose) et ellagitanins (acide ellagique et glucose) (Woodward et Reed, 1989). Ils sont largement présents dans les plantes des zones chaudes et ils peuvent être considérés comme potentiellement toxiques (Nosière *et al.*, 2018).

Une forme simple de TH est le penta-galloylglucose. Elle est l'origine de la plupart des formes complexes (fig 09) (Macheix *et al.*, 2005).

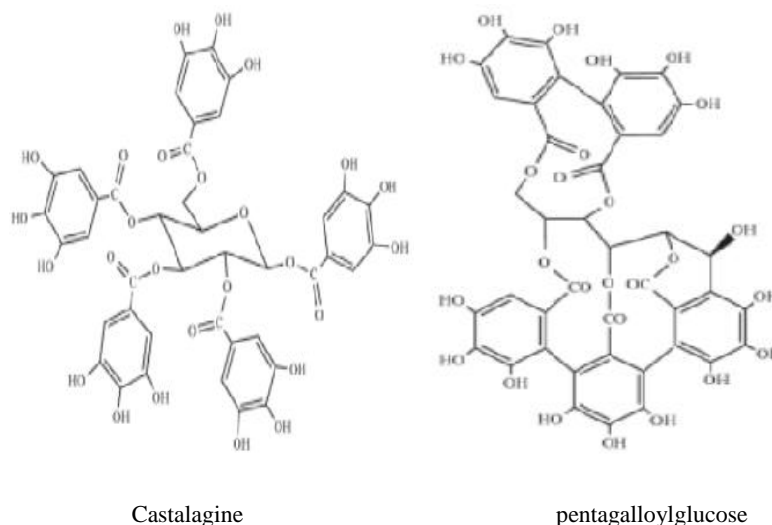
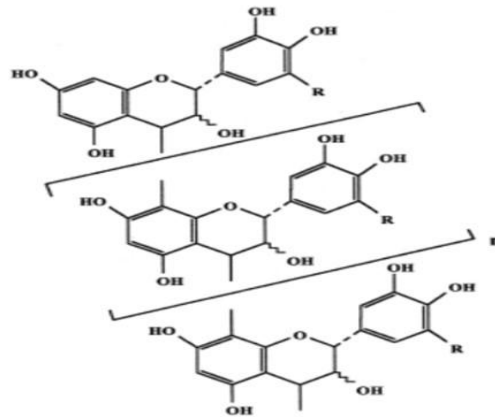


Figure 09 : Types de tanins hydrolysables.

### I.2.1.2.2.b. Tanins condensés (TC)

Les TC ou proanthocyanidols sont des polymères d'unités flavon-3-ol (**Boutefnouchet *et al.*, 2020**), possédant un poids moléculaire élevé de 1000 à 30000 Da et une forte affinité pour les protéines. Ils sont présents dans les vacuoles d'un réseau de cellules spécialisées (**Fig 10**) (**Jarrige *et al.*, 1995**).



R=H : unité procyanidine, dérivée de la catéchine

R=OH : unité prodelphinidine, dérivée de la gallocatéchine

**Figure10** : Structure d'un tanin condensé (**Macheix *et al.*, 2005**)

## I.2.2. Composés terpéniques

### I.2.2.1. Définition

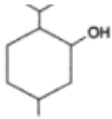
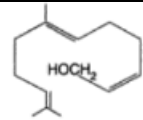
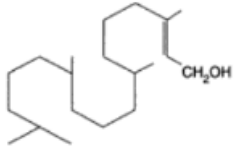

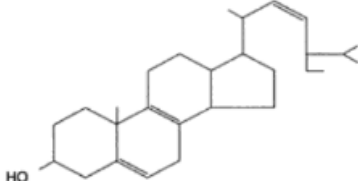
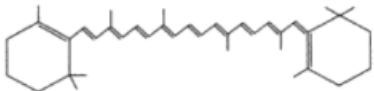
Les terpénoïdes sont des dérivés d'unités isoprènes à cinq atomes de carbone (unité de base) assemblés et modifiés de mille façons différentes (**Jost *et al.*, 2015**). Ils représentent un groupe très vaste de substances naturelles identifiées (> 90000 molécules décrites) (**Boutefnouchet *et al.*, 2020**).

### I.2.2.2. Classification

Ils ont été classés, d'après leur nombre d'unités isopréniques, en monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, tétraterpènes et polyterpènes (**tab 05**)

(**Jost *et al.*, 2015**).

Tableau 05 : Principales Classes de terpénoïdes (William, 2003).

Nombre de carbones	classe	exemple
5	Hémiterpénoïde	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{CH}_3-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2 \end{array}$ acide tiglique
10	Monoterpénoïde	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_3 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{CH}_3-\text{C}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2 \text{ OH} \end{array}$ géraniol(pelargonium)
10	Monoterpénoïde cyclique	 menthol(essence de menthe)
15	sesquiterpénoïde	 farnésol (très répandir)
20	diterpénoïde	 phytol(chlorophylle)
30	triterpénoïde	 squalène (précurseur et stéroïde)
30	triterpénoïde	 Stigmastérol (glycine de max)(un stérol)
40	tétraterpénoïde	 β-carotène

## I.2.3. Composés alcaloïdes

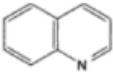
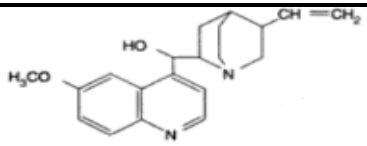
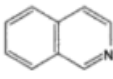
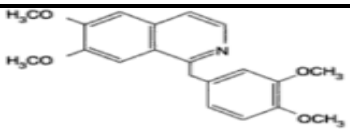
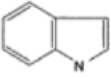
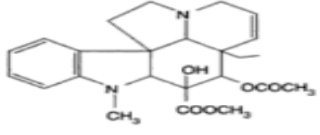

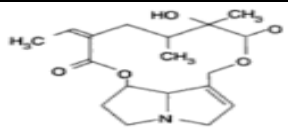
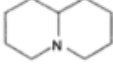
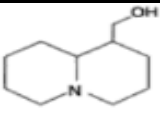

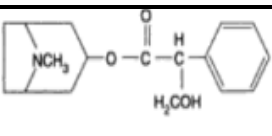

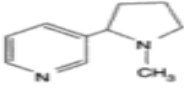
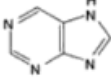
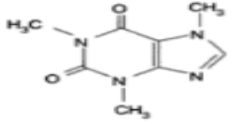
### I.2.3.1. Définition

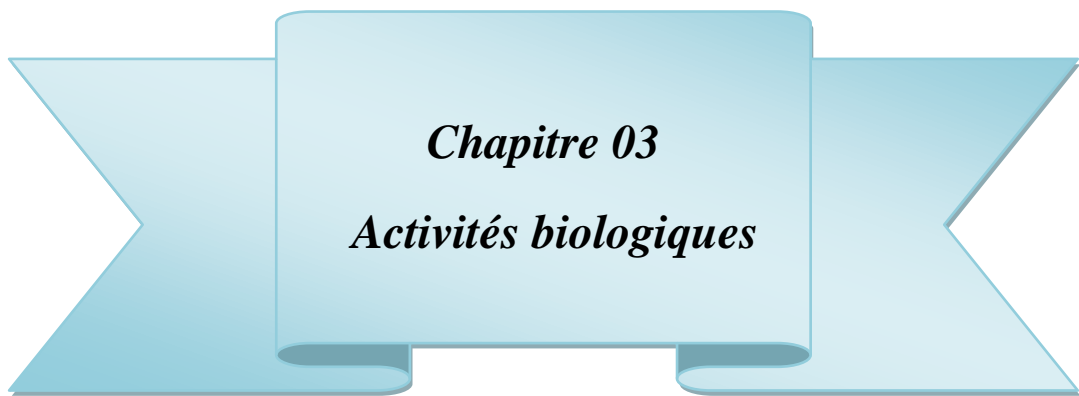
Les alcaloïdes sont des substances naturelles azotées plus ou moins basiques (Boutefnouchet *et al.*, 2020B). Ils ont une structure complexe et leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique. Ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé (Brunton, 2009).

I.2.3.2. Classification

Les alcaloïdes forment une grande famille très hétérogène de métabolites secondaires qui présentent un intérêt de par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. Le tableau suivant montre les différentes classes des alcaloïdes (le tab 06) (William, 2003).

Tableau 06 : Les différentes classes des alcaloïdes

Classe d'alcaloïde	exemple
Quinoléine 	 quinine
Isoquinoléine 	 paravérine
Indole 	 vindoline
Pyrrolizidine 	 sénécionine
Quinolizidine 	 lupinine
Tropane 	 atropine
Pipéridine 	 nocotine
Purine 	 catéine



*Chapitre 03*  
*Activités biologiques*

## ❖ Activités Biologiques

L'activité biologique d'un sol correspond au métabolisme de tout ce qui y vit, c'est-à-dire à l'ensemble des processus complexes de transformation de matière et d'énergie, au cours des phénomènes d'anabolisme et de catabolisme qui s'effectuent au sein de son peuplement (Bachelier, 1973).

### I. Activités Antioxydantes

De nouvelles sources d'antioxydants sont continuellement recherchées sur une variété des plantes, qui sont d'intérêt particulier car ils peuvent produire des matières premières ou des composés phytochimiques qui ont d'importantes capacités antioxydantes et bienfaits pour la santé (Madoui *et al.*, 2018).

Les composés phénoliques étant des agents antioxydants bien connus (Gang, 2011).

#### I.1. Stress Oxydatif

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme (Halenj *et al.*, 2007). Il résulte d'un déséquilibre entre des systèmes producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des systèmes antioxydants, enzymatiques (superoxyde dismutases [SOD], glutathion peroxydases [GPx], etc.) ou non (glutathion, vitamines, etc.), il résultera aussi d'une situation où l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques (Zbadi *et al.*, 2018).

Le stress oxydatif est impliqué dans une gamme de problèmes de santé (Gang, 2011).

#### I.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces réactives d'oxygène (ROS), qui comprennent toutes les molécules hautement réactives contenant de l'oxygène. Les types de ROS comprennent le radical hydroxyle, le radical anionique super-oxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène simple, le radical d'oxyde nitrique et divers peroxydes lipidiques (Boligon, 2014).

La production de radicaux chez les organismes vivants est un phénomène normal, régulé par le biais de divers processus chimiques ou enzymatiques de détoxification. En effet, l'organisme possède ses propres moyens de défense lui permettant de lutter contre les radicaux libres. Quand ce système de protection perd de son efficacité ou quand le nombre de radicaux libres augmente de manière importante, il survient un stress oxydant (Salem, 2018).

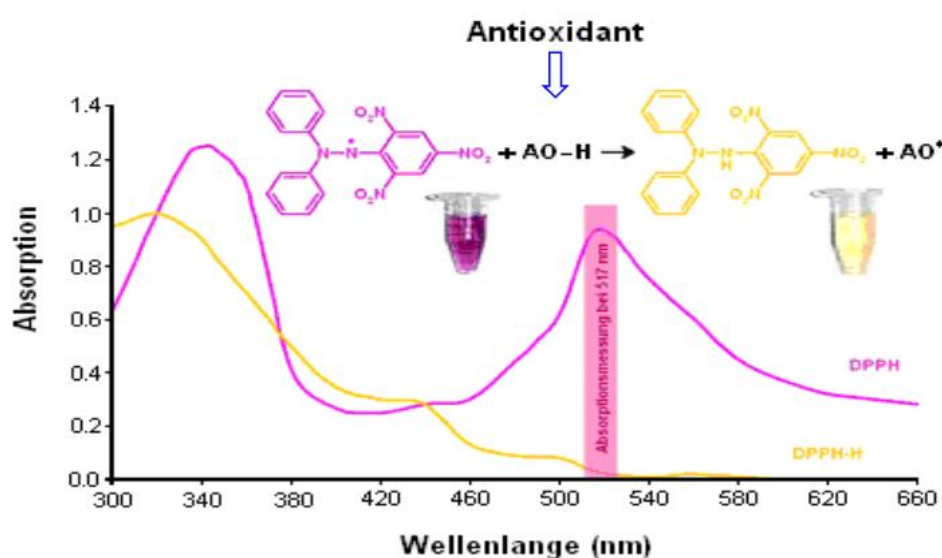


### I.3. Détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est mesurée par plusieurs méthodes à savoir :

#### I.3.1 Activité antiradicalaire par le test au DPPH°

Le test DPPH° permet de mesurer le **pouvoir antiradicalaire** des molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle (**figure 11**) (**site 05**).



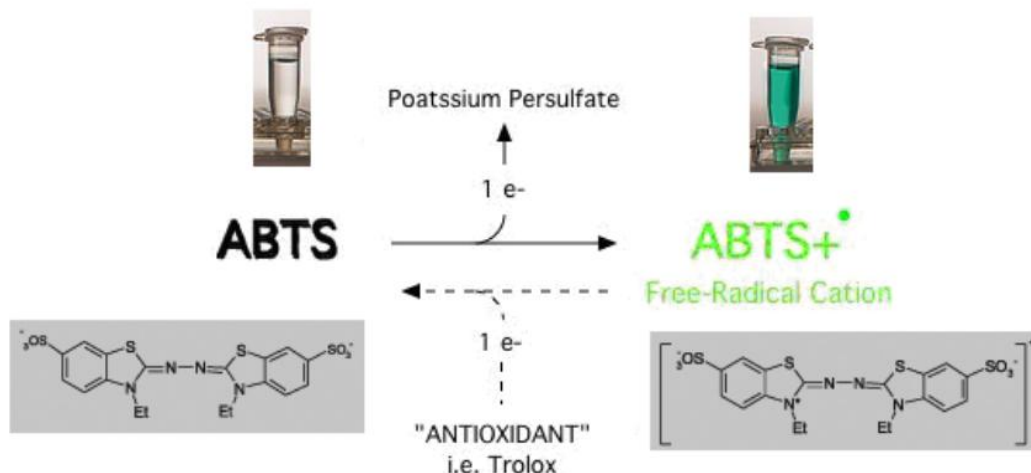
**Figure 11:** La structure du radical DPPH° et sa réduction par un antioxydant (AO-H) (**Boligon, 2014**).

La réduction du DPPH° est facilement mesurée par spectrophotométrie à 515 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  DPPH°). La réaction sera plus ou moins rapide selon la **nature** de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la **concentration** en antioxydant (**Site 05**).

#### I.3.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS

Le 2,2'-azinobis (3-éthylbenzthi- azoline-6-acide) (ABTS) est converti en son radical cation (ABTS•+) par addition de persulfate de sodium. Ce cation radical bleu-vert absorbe la lumière à 734 nm. ABTS•+ est réactif vis-à-vis de la plupart des antioxydants. Ce n'est pas affecté par la force ionique, et il peut être utilisé pour déterminer à la fois les capacités de

l'antioxydant hydrophile et hydrophobe. Au cours de cette réaction, le cation radical de l'ABTS bleu-vert est reconverti en son neutre incolore forme centrale (**figure 11**). La réaction peut être surveillée par spectrophotographie tométriquement (**Martysiak-Żurowska et Wenta, 2012**).

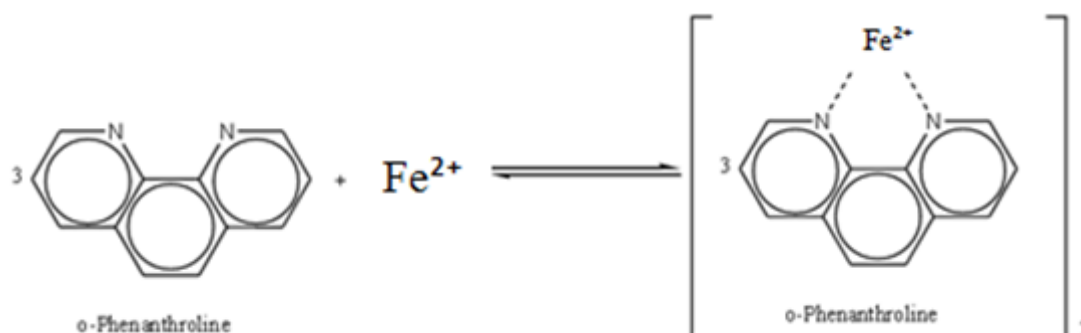


**Figure 12:** Réaction chimique d' ABTS (**Boligon, 2014**).

### I.3.3. Activité de réduction par la formation du complexe $\text{Fe}^{2+}$ phénanthroline

La 1,10-phénanthroline ou orthophénanthroline est un composé organique de formule brute  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ , formé de trois cycles aromatiques adoptant la disposition du phénanthrène. Les deux cycles opposés contiennent chacun un atome d'azote.

Seul le fer ferreux — $\text{Fe}(\text{II})$  ou  $\text{Fe}^{2+}$ — forme un complexe (**figure 13**) stable avec l'orthophénanthroline de couleur rouge orangé. On nomme ce complexe ferroïne pouvant subir une analyse colorimétrique ou photométrique à une longueur d'onde de 510 nm (vert) (**Labidi, 2020**).



**Figure 13:** Formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -phénanthroline.

### I.3.4. Activité du pouvoir réducteur FRAP

Le pouvoir réducteur des extraits est déterminé par la méthode de FRAP (Dieng *et al.* 2015). Elle est fondée sur la réduction de l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés à un faible pH. Le complexe de tripyridyltriazine (TPTZ) ferreux a une couleur bleu intense mesuré par un spectrophotomètre à 593nm (figure 14) (Soltani *et al.* 2017).

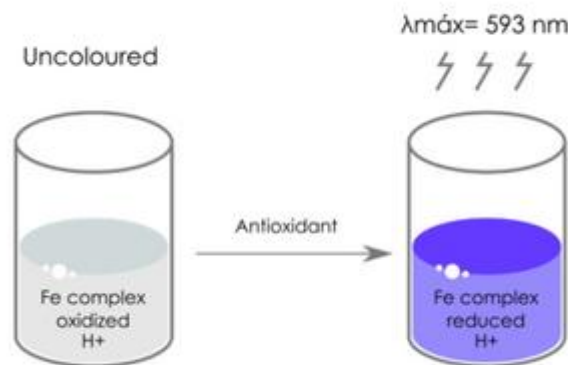


Figure 14: La réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$

## II. Activité Antibactérienne

### II.1. Choix de germes

Le choix des bactéries s'est porté sur deux souches de bactéries fréquentes en pathologie humaine, appartenant à deux catégories différentes (Gram positive et Gram négative). L'efficacité des produits testés ainsi que leur modalité de pénétration dans la bactérie sont différentes. Les souches bactériennes utilisées sont :

- bactérie Gram négative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*)
- bactérie Gram positive (*Staphylococcus aureus*) (Kaloustian *et al.*, 2008).

### II.2. Aspect méthodologique

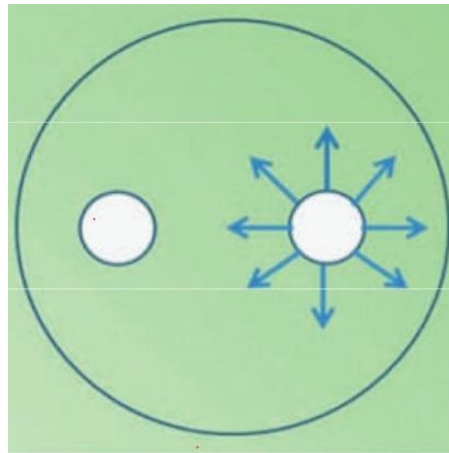
#### II.2.1. Méthode de référence : Méthode en milieu gélosé

Dans cette méthode, la substance à tester est incorporée dans la gélose, avant que celle-ci ne soit coulée dans les boîtes de Pétri. La gélose ne peut être coulée qu'après avoir été maintenue en surfusion (entre 50 et 60°C). Lorsque cette gélose est prise en masse, il ne reste qu'à ensemencer les bactéries, puis incubé à 35°C pendant 24h. La CMI ainsi obtenue

s'observe à l'œil nu par l'absence de croissance bactérienne à la surface de la boîte de Pétri. Elle sera ainsi fonction de la concentration en principe actif, mais aussi de la bactérie testée, dans la limite de la gamme de concentrations testée (Fontanay *et al.*, 2015).

### II.2.2. Méthode fréquente : Méthode des disques

Cette méthode est la plus connue, elle consiste en l'ensemencement sur un milieu gélosé, dans une boîte de Pétri, d'une suspension bactérienne. La substance à tester est ensuite imprégnée sur un disque de cellulose, lui-même déposé sur la boîte de Pétri. Durant l'incubation, la substance est alors censée diffuser dans la gélose (à la surface et/ou dans la masse) ce qui crée un gradient de concentration dépendant de la substance (figure 15).

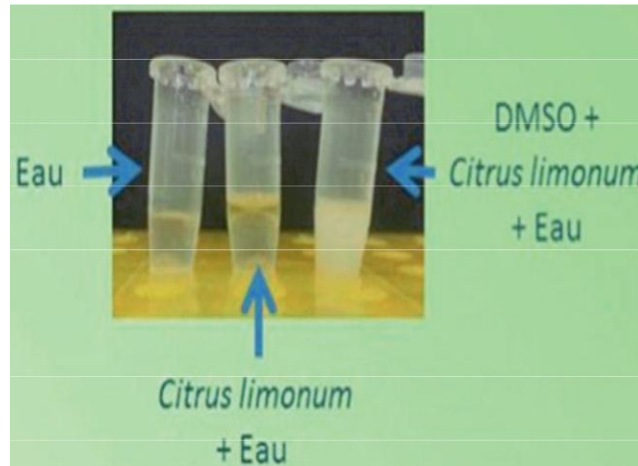


**Figure 15** : Principe de la diffusion du principe actif dans la méthode « des disques ».

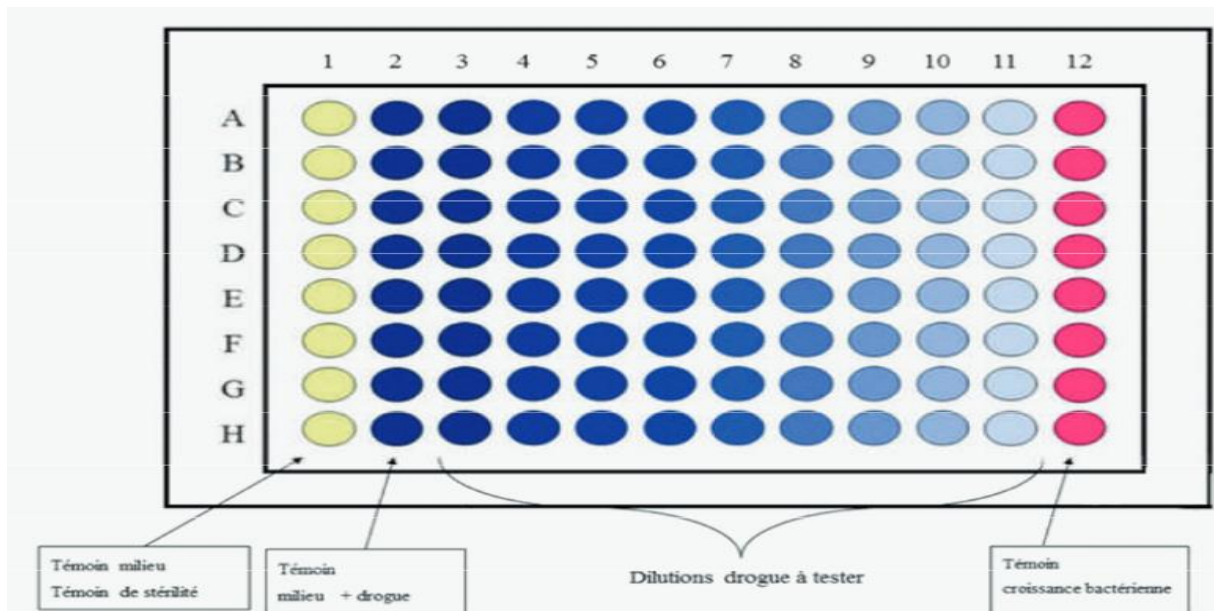
Les disques de cellulose imprégnés de la substance à tester sont déposés à la surface de la gélose et laisse diffuser la substance dans la gélose (à la surface et/ou dans la masse), créant ainsi un gradient de concentration de la substance à tester (Fontanay *et al.*, 2015).

### II.2.3. Méthode alternative : Méthode en milieu liquide

La méthode en milieu liquide peut se décliner en 2 techniques distinctes : soit en tube, appelée « macrométhode en milieu liquide » (figure 16), soit en plaque à 96puits (fond en «U»), appelée « microméthode en milieu liquide » (figure 17) (Fontanay *et al.*, 2015).



**Figure 16:** Macrométhode en milieu liquide.



**Figure 17:** Microméthode en milieu liquide.

Plan d'une microplaque pour la réalisation de la microméthode en milieu liquide

**La colonne 1 :** correspond au milieu de culture seul. Ce témoin permet de confirmer la stérilité des opérations.

**La colonne 2 :** contient du milieu MH et la substance à tester à sa plus forte concentration. Ce témoin permet de mettre en évidence une interaction éventuelle entre un ou des composants du MH et la substance testée. Si l'absorbance est modifiée dans ce témoin, il faudra en tenir compte de la détermination de la CMI.

**La colonne 12** contient seulement du MH et l'inoculum et permet de vérifier que l'absence de croissance dans les autres colonnes n'est pas due à de mauvaises conditions de culture mais bien à une action de la substance testée sur les bactéries.

**Les colonnes 3 à 11** correspondent à des concentrations de la substance à tester de jusqu'à 2 µg/ml suite à la réalisation d'une gamme de dilution d'ordre 2 et ce pour un volume final de 50 µl (**Fontanay et al., 2015**).

### **III. Activité antifongique**

#### **III.1. Evaluation de l'activité antifongique**

L'activité antifongique des extraits de plantes étudiées a été évaluée selon le pourcentage de l'inhibition de la croissance diamétrale des talles (%) :

- 30 à 40 % : faible activité,
- 50 à 60 % : activité modérée,
- 60 à 70 % : bonne activité,
- >70 % : excellente activité (**Hajji et al., 2016**).

#### **III.2. Test-antifongique (antifongigramme)**

Les antifongigrammes se font habituellement sur les levures isolées, en fonction de leur caractère pathogène. En ce qui concerne les champignons filamenteux, il est habituel d'utiliser des suspensions de spores. Or, les études in vitro ont montré que les résultats obtenus sont différents selon que l'on utilise des spores ou des filaments. Pour les levures, seule la méthode des disques a été utilisée. Les antifongigrammes sont utilisés par les méthodes suivantes :

- \_ Microméthode de dilution en milieu liquide de Sabouraud, pH 5,6.
- \_ Deuxième méthode, réalisée sur gélose (**Ouraïni et al., 2007**).

### **IV. Activité Enzymatique**

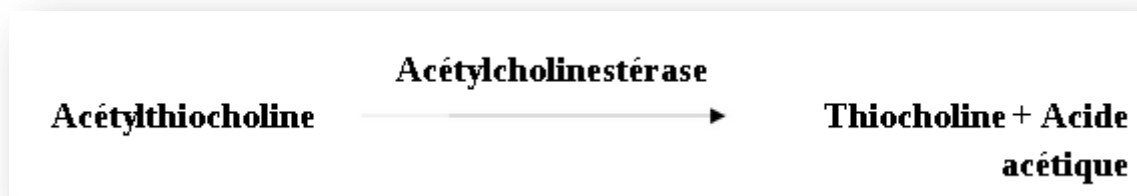
Une activité enzymatique correspond au calcul de l'effet catalytique d'une enzyme, reposant sur la quantité de substrat transformée par unité de temps (**Site 06**).

## IV.1. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la plus répandue forme courante et bien connue de démence. Dans cette maladie, les cellules et les nerfs du cerveau sont bloqués par des protéines anormales, entraînant la perturbation des transmetteurs qui transportent des messages dans le cerveau, en particulier ceux responsables du stockage des souvenirs (Gauthier *et al.* 2021). Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) ont été largement utilisés dans le traitement de cette maladie (Wang *et al.*, 2007).

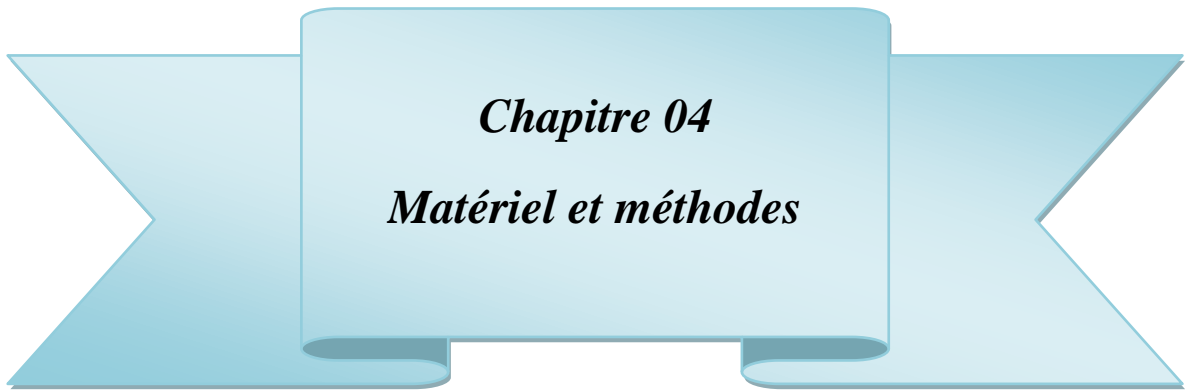
## IV.2. Activité anti cholinestérase

Le dosage de l'AChE a été effectué selon la méthode d'Ellman et al., (1961). Cette méthode consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'acétylthiocholine (ASCh), dont l'hydrolyse catalysée libère de la thiocholine (SCh) et de l'acide acétique. La quantité de thiocholine libérée agit avec l'acide 5-5' dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) forme un complexe de couleur jaune dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 412 nm (Hamdi-Ourfella *et Soltani* 2013).



*Partie*  
*Expérimentale*





***Chapitre 04***

***Matériel et méthodes***

## **MATERIEL ET METHODES**

Notre présente étude a pour but d'évaluer in vitro quelques activités biologiques des genres *Stachys byzantina* et *Ocimum basilicum*. A cet effet, une investigation phytochimique est réalisée sur les feuilles des deux plantes, afin d'extraire les métabolites secondaires responsables du pouvoir antioxydant, antifongique, antibactérien et enzymatique.

Pour cela, un suivi des paramètres physico-chimiques et biologiques a été réalisé au niveau de :

- Laboratoire de biochimie, faculté de Science de la Nature et de la Vie (Université des Frères Mentouri Constantine 1).
- Laboratoire de biochimie du Centre National de Recherche en Biotechnologie (CRBT) de Constantine.

### **I. Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé est constitué de deux espèces de plantes médicinales spontanées : *Stachys byzantina* et *Ocimum basilicum* récoltées dans la région Bouhalbes, Wilaya de Skikda (Algérie).

#### **I.1. Broyage et tamisage**

Les feuilles sont retirées des plantes, bien nettoyées à l'eau courante, afin de les débarrasser de la poussière et des matières étrangères et séchées à température ambiante dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière pendant 15 jours. Un complément de séchage à l'étuve à 40°C est effectué pendant 24 heures pour améliorer le broyage et l'extraction et aussi, pour limiter la prolifération des microorganismes. Cette température évite la dénaturation des composés chimiques de la plante (protéines, phénols, etc.). Les feuilles séchées sont réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique (**figure17**). La poudre résultante est conservée à l'abri de l'air, de l'humidité et de la lumière dans un flacon en verre hermétiquement fermé. Le broyage permet d'augmenter la surface de contact entre le solvant et la poudre (**Ouahiba et al., 2020**).



Figure 17: la poudre de la partie aérienne après broyage.

## II. Méthode d'extraction

### II.1. Extraction solide-liquide

Parmi les techniques d'extraction « solide - liquide » on retrouve les extractions à l'eau et les extractions hydro-alcooliques :

#### II.1.1. Macération par une solution hydro-alcoolique

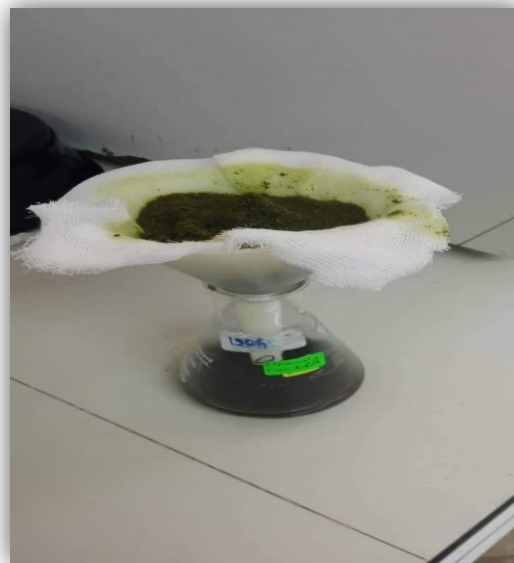
40 g de poudre des feuilles de *Stachys byzantina* et *d'Ocimum basilicum* sont à macérés, séparément, dans une solution hydro-alcoolique éthanol/eau distillée 8 : 2 v/v, sous agitation douce pendant 24h à une température ambiante. Chaque mélange est filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile et une fois sur du papier filtre (papier Whatman n°3). Le filtrat est évaporé à sec au évaporateur rotatif ou rotavapor sous pression réduite à 45°C et à 300 tour/min. L'extrait hydro-alcoolique récupéré sous forme d'une pâte dans un flacon stérile (Madoui *et al.*, 2018).

#### II.1.2. Macération aqueuse

L'extrait aqueux de la partie aériennes (feuilles) a été préparé selon la méthode décrite par Bohui *et al.* (2018) avec une légère modification : Une prise d'essai de 40 g de poudre de plante *d'Ocimum basilicum* a été introduite dans un bécher contenant 500 ml d'eau distillée. L'ensemble est agité pendant 24 heures à température ambiante. Après filtration sur coton hydrophile et sur papier filtre (Whatman n°3). Le filtrat a été placé à l'évaporateur rotatif sous vide à 45°C. L'extrait obtenu est récupéré par le méthanol et conservé dans un flacon. Ensuite, l'extrait est mis sous la hotte pour l'évaporation du méthanol et l'obtention de l'extrait sec. Les étapes sont illustrées dans la figure 18.



A-Macération



B-Filtration



C-Évaporation



D- extrait brut

**Figure 18** : Etapes de l'extraction solide-liquide.

Les différentes étapes du protocole d'étude expérimentale sont résumées dans la figure 19 suivante :

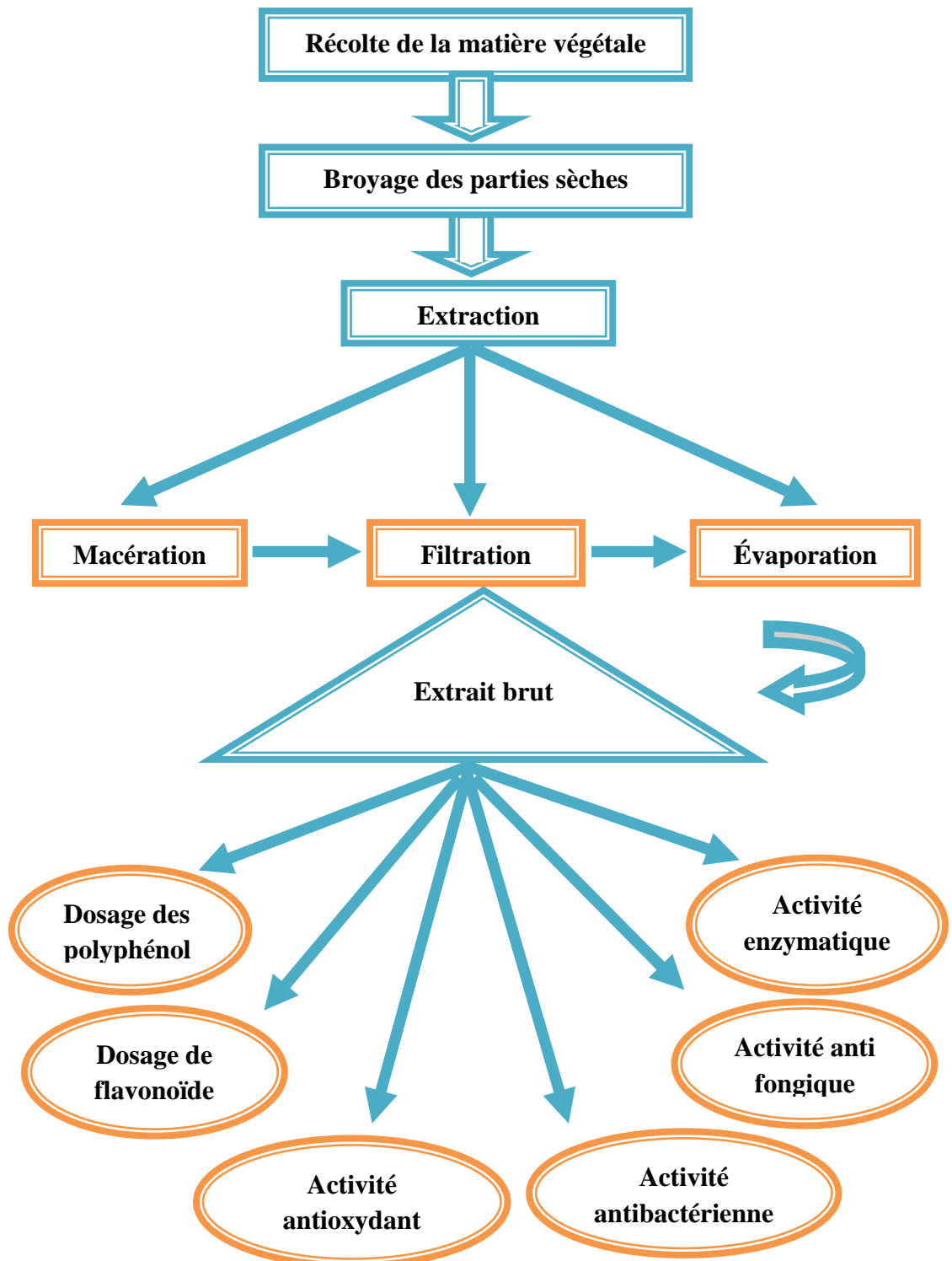


Figure 19 : Protocol d'étude expérimentale.

## II.2. Rendement d'extraction

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant le transfert du filtrat à évaporer) (Bohui *et al.*, 2018).

$$\text{Rendement (\%)} = ((\text{Masse d'extrait sec}) * 100) / (\text{Masse de la matière végétale}).$$

## III. Analyse quantitative

Toutes ces méthodes ont été effectuées sur des microplaques et leur lecture est effectuée par un spectrophotomètre à lecteur de microplaque.

### III.1. Dosage des polyphénols totaux (TPC)

#### -Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu (FCR), constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{MO}_8\text{O}_{23}$ ). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximale aux environs de 750 -765 nm (Muller *et al.*, 2010).

#### -Mode opératoire

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé en suivant la méthode décrite par Muller *et al.*, (2010).

#### -Préparation des produits

- Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 7,5%

7,5 gramme de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sont dissouts dans 100 ml d'eau distillé.

- Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois

1ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10ml avec l'eau distillée (9ml).

#### -Préparation de l'extrait végétal

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de l'eau distillée (ou Méthanol).

Un volume de 20 $\mu$ l d'extrait de plante (1mg d'extrait dissout dans 1 ml de méthanol) est ajouté à 100 $\mu$ l de FCR dilué .Ensuite, un volume de 75 $\mu$ l de carbonate de sodium est ajouté:

20  $\mu$ l d'extrait de plante + 100 $\mu$ l de FCR dilué (1 : 9) + 75  $\mu$ l de carbonate de sodium (7,5%).

Le blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le Méthanol.

Le mélange est incubé dans l'obscurité pendant 2h. La lecture est réalisée à 765 nm.

### ➤ Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique

Pour la préparation d'étalon, Une gamme des concentrations est préparée dans le méthanol par la dilution de la solution mère S1, cette dernière est préparée à partir de la dissolution de 0,5 mg d'acide gallique dans 5 ml du méthanol (MeOH), pour obtenir une concentration égale à 200  $\mu$ g/ml. Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

25 $\mu$ g/ml  $\longrightarrow$  25 $\mu$ l de S1+ 175 $\mu$ l de MeOH

50 $\mu$ g /ml  $\longrightarrow$  50 $\mu$ l de S1+ 150 $\mu$ l de MeOH

75 $\mu$ g/ml  $\longrightarrow$  75 $\mu$ l de S1+ 125 $\mu$ l de MeOH

100 $\mu$ g/ml  $\longrightarrow$  100 $\mu$ l de S1+ 100 $\mu$ l de MeOH

125 $\mu$ g /ml  $\longrightarrow$  125 $\mu$ l de S1+ 75 $\mu$ l de MeOH

150 $\mu$ g /ml  $\longrightarrow$  150 $\mu$ l de S1+ 50 $\mu$ l de MeOH

175  $\mu$ g /ml  $\longrightarrow$  175  $\mu$ l de S1+ 25 $\mu$ l de MeOH

200 $\mu$ g /ml  $\longrightarrow$  200 $\mu$ l de S1

Dans une microplaque : un volume de 20 $\mu$ l de chaque dilution sont transférés dans une microplaque avec 100 $\mu$ l FCR (1:10) et 75 $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5%). Suivi par une incubation de la plaque pendant 2 heures. Enfin, la lecture est faite à 765nm.

La teneur en composés phénoliques de l'extrait a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique (**Figure20**)

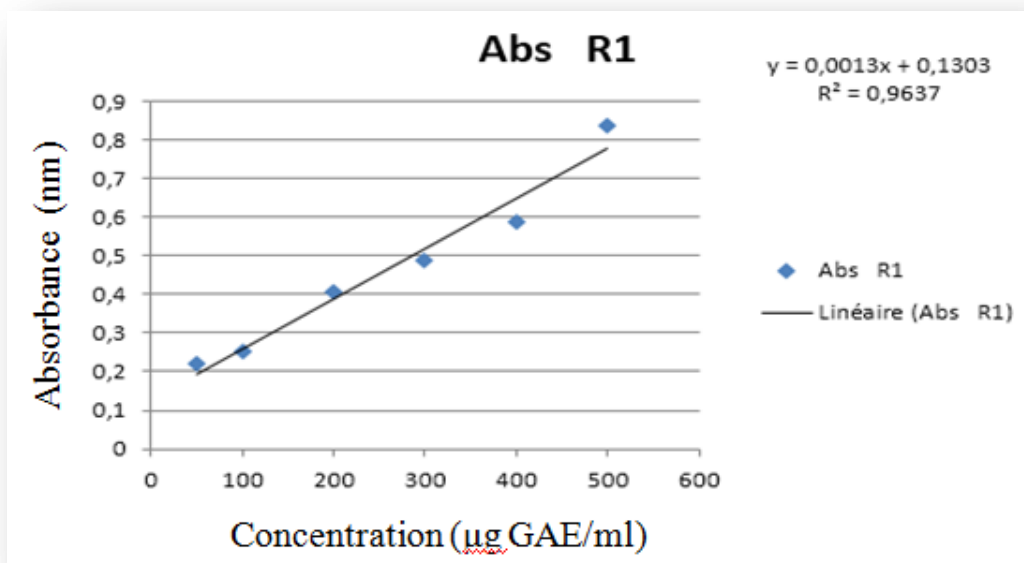


Figure 20 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

### III.2. Dosage des flavonoïdes (CTF)

#### -Principe

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre  $Al^{+3}$  et les flavonoïdes. La méthode de **Topçu et al. (2007)** est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

#### -Préparation des produits

- Pour 1 M Potassium acétate ( $CH_3COOK$ ) on dissout 9.80 gramme de ( $CH_3COOK$ ) dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution **S1**.
- Pour 10% nitrate d'aluminium ( $Al(NO_3)_3, 9H_2O$ ) on pèse 10g de ce produit dans 100ml d'eau distillée.

#### -Préparation de l'extrait de plante

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution **S2**.

On prend un volume de 50 µl d'extrait de plante (1mg d'extrait de plante dissout dans 1 ml de méthanol) et ajouté à 10 µl de potassium acétate diluée, puis, un volume de 10 µl de nitrate d'aluminium est ajouté selon l'équation suivante :

50 µl (S2) (extrait de plante) + 130 µl (MeOH) +10 µl (S1) ( $CH_3COOK$ ) + 10 µl ( $Al(NO_3)_2, 9H_2O$ ) + attendre 40 mn + lecture à 415 nm.

Le blanc est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50µl extrait +150µl méthanol).



Le mélange est incubé pendant 45 min à température ambiante. La lecture est réalisée à 415 nm.

➤ **Préparation de la gamme d'étalon de la quercétine**

Dans un eppendorf, 1 mg de la quercétine a été dissous dans 5 ml de méthanol pour obtenir une solution mère (S1) d'une concentration égale à 0,2 mg/ml. À partir de cette solution, Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

Quercetin (25) → 25 µl S1 + 175 µl MeOH

Quercetin (50) → 50 µl S1+ 150µl MeOH

Quercetin (75) → 75 µl S1 + 125µ MeOH

Quercetin (100) → 100 µl S1 + 100µl MeOH

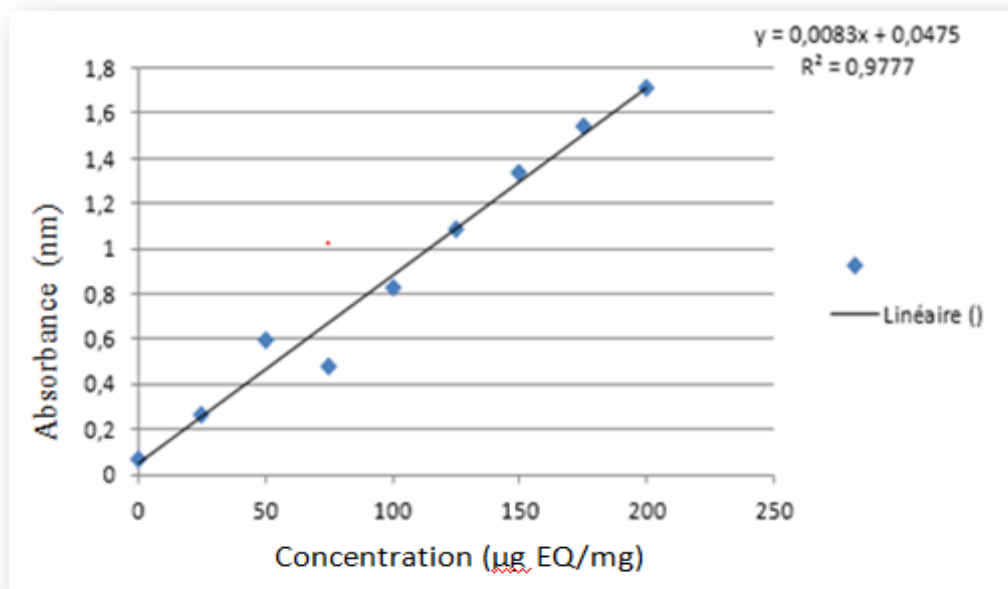
Quercetin (125) → 125 µl S1 + 75µl MeOH

Quercetin (150) → 150 µl Sm1+ 50µl MeOH

Quercétine (175) → 175µl S1+ 25µl MeOH

Quercetin (200) → 200µl S1 + 0 MeOH

Après la préparation des dilutions : 50 µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque à 96 puits, avec 130µl de méthanol (MeOH), 10µl de la d'acétate de potassium ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) et 10 µl de nitrate d'aluminium ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ). Après une durée de 40 mn la lecture est réalisée à 415 nm. Enfin, une courbe d'étalonnage de la quercétine a été réalisée (**Figure21**)



**Figure 21** : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

## IV. Evaluation de l'activité biologique in vitro

### IV.1. Evaluation de l'activité antioxydante

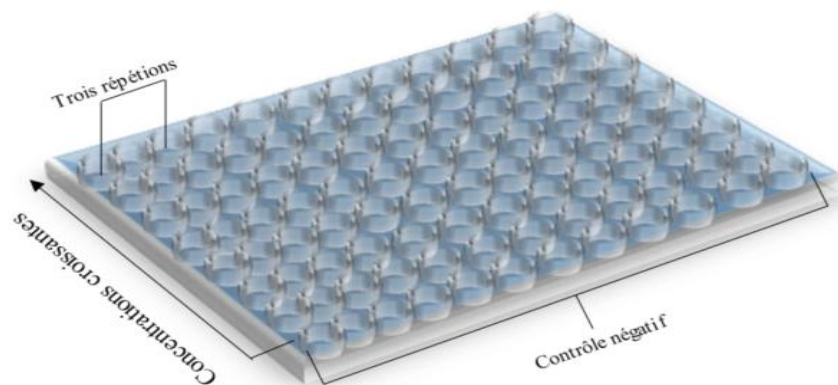
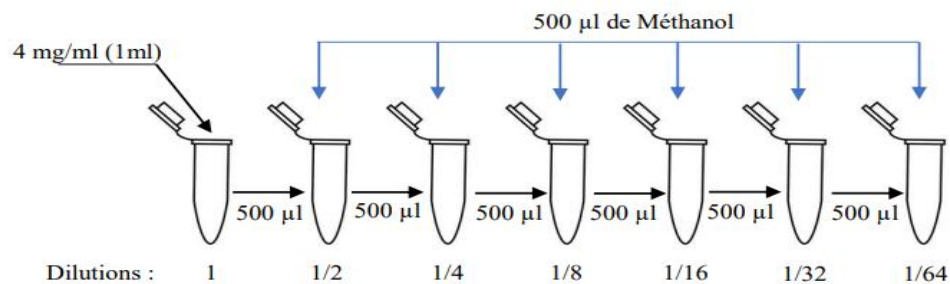
L'activité anti-oxydante des extraits végétaux est réalisée par 04 méthodes :

- Piégeage du radical libre DPPH.
- Piégeage du cation radical ABTS.
- Pouvoir réducteur FRAP.
- Activité phénanthroline.
- **Préparation d'une gamme de dilution une fois pour toutes :**

L'évaluation de l'activité antioxydante est effectuée sur une microplaque de 96 puits utilisant différentes concentrations d'échantillon à partir de la concentration initiale de 4 mg/ml. Pour cela, une série de 7 dilutions a été réalisée dans des eppendorfs par transfert d'un volume de 500  $\mu$ l de chaque concentration dans un eppendorf contenant 500  $\mu$ l du méthanol.

N.B : Dans toutes les activités et dans chaque concentration, l'expérience est répétée 3 fois.

La figure suivante montre comment prépare les concentrations et comment les activités sont réalisées sur les microplaques en détail (**figure 22**).



**Figure22** : Préparation des dilutions et mode opératoire sur une microplaque 96 puits.

#### IV.1.1. Piégeage du radical libre diphényle-picryl-hydrazyle (DPPH)

La capacité des extraits à réduire les radicaux libres de la DPPH est déterminée par la méthode spectrophotométrie décrite par **Blois (1958)**. Le  $\alpha$ -tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

Dans une microplaque à 96 puits, 40 $\mu$ l de l'extrait préparé à plusieurs concentrations (une masse de 4mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1ml de méthanol) a été mélangé avec une solution de 160  $\mu$ l du DPPH ( $D_{0.7}$ ).

Le mélange est incubé pendant 20 min à l'abri de la lumière. La lecture de l'absorbance à 517 nm est réalisée par spectrophotomètre des microplaques.

Le blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le méthanol. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{inhibition (DPPH)} = [(A \text{ Contrôle} - A \text{ Extrait}) / A \text{ Contrôle}] \times 100$$

**A contrôle** : l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs ; **A extrait** : l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

#### IV.1.2. Piégeage du radical (ABTS)

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de **Re et al. (1999)**.

Dans une microplaque à 96 puits, 40 $\mu$ l de l'extrait préparé à plusieurs concentrations (une masse de 4mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1ml de méthanol) a été mélangé avec une solution de 160  $\mu$ l de l'ABTS.

Le mélange est incubé pendant 10min à l'abri de la lumière. La lecture de l'absorbance à 734 nm est effectuée par le spectrophotomètre des microplaques. Le blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le méthanol.

L'activité ABTS<sup>+</sup> a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_c - A_e) / A_c] \times 100$$

**A<sub>c</sub>** : absorbance du contrôle / **A<sub>e</sub>** : absorbance de l'extrait

### **IV.1.3. Pouvoir réducteur (FRAP)**

#### **-Principe**

L'activité du pouvoir réducteur est déterminée par la méthode d'Oyaizu (1986) avec une légère modification.

#### **-Préparation des produits**

- Potassium ferricyanide (0.1%)  $K_3Fe(CN)_6$  : 0.1g de  $K_3Fe(CN)_6$  dans 100 ml  $H_2O$
- Tri-chloro acide acétique (TCA) (10%) : 1 g de TCA dans 10 ml  $H_2O$
- 10  $\mu$ l ferrique chlorure  $FeCl_3$  (0.1%) : 0,1 g de  $FeCl_3$  dans 100 ml  $H_2O$ .

Dans une microplaque à 96 puits, 10 $\mu$ l de l'extrait préparé à plusieurs concentrations (une masse de 1mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1ml de méthanol) a été mélangé avec une solution de 40  $\mu$ l phosphate buffer (pH 6.6) et 50  $\mu$ l potassium ferricyanide (1%), cette étape est répétée 3 fois. Le mélange est incubé à 50<sup>0</sup>C pendant 20min, ensuite on ajoute 50  $\mu$ l tri-chloro acide acétique (TCA) (10%) et 40  $\mu$ l  $H_2O$  + 10  $\mu$ l ferrique chlorure  $FeCl_3$  (0.1%). lecture à 700 nm.

Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le Méthanol.

### **IV.1.4. Activité phénanthroline**

L'activité de phénanthroline est déterminée par la méthode de Szydlowska-Czerniaka (2008).

#### **-Préparation des produits**

- Phénanthroline (0.5%) : 0.05g de Phénanthroline dans 10ml de MeOH.
- Ferrique chlorure  $FeCl_3$  (0.2%) : 0.02g de  $FeCl_3$  dans 10ml de  $H_2O$ .

Dans une microplaque à 96 puits, 10 $\mu$ l de l'extrait préparé à plusieurs concentrations (une masse de 4mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1ml de méthanol) a été mélangé avec une solution de 50  $\mu$ l de Ferrique chlorure  $FeCl_3$  et 30  $\mu$ l Phénanthroline (0.5%) plus 110 $\mu$ l de méthanol. lecture à 510 nm.

Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

## **IV.2. Evaluation de l'activité enzymatique in vivo**

### **V.2.1. Activité de l'acétylcholine estérase**

L'activité Acétylcholinesterase est déterminée par la méthode d'Ellman et al. (1961)

Dans une microplaque à 96 puits, 10µl de l'extrait préparé à plusieurs concentrations (une masse de 4mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1ml de méthanol) a été mélangé avec une solution de 20 µl d'enzyme (AChE) et 10µl de tampon, cette étape est répétée 3 fois. Incubation à l'obscurité pendant 15min à 25°C, ensuite on ajoute 10 µl DTNB plus 10 µl d'ACI (substrat), lecture en T0, puis incubation pendant 15min et faire une autre lecture en T15. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le Méthanol.

Le pourcentage d'inhibition d'AChE est déterminé par rapport au blanc (éthanol avec le tampon phosphate-sodium à pH 8) en utilisant la formule suivante :

$$(E - S)/E * 100.$$

E : l'activité de l'enzyme sans extrait ; S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

Le Galantamine est utilisé comme référence.

### VI.3. Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique

#### -Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans le présent travail proviennent de laboratoire de Microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie , Université des frères Mentouri Constantine 1. Elles sont souvent multi résistantes aux antibiotiques et responsables d'infections **plus ou moins graves**. Il s'agit de : *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 5538 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

#### -Souche fongique

La moisissure utilisée pour le test antifongique est *Fusarium oxysporium* sp. *Albedinis*. Cette espèce provoque la maladie fusariose chez le blé.

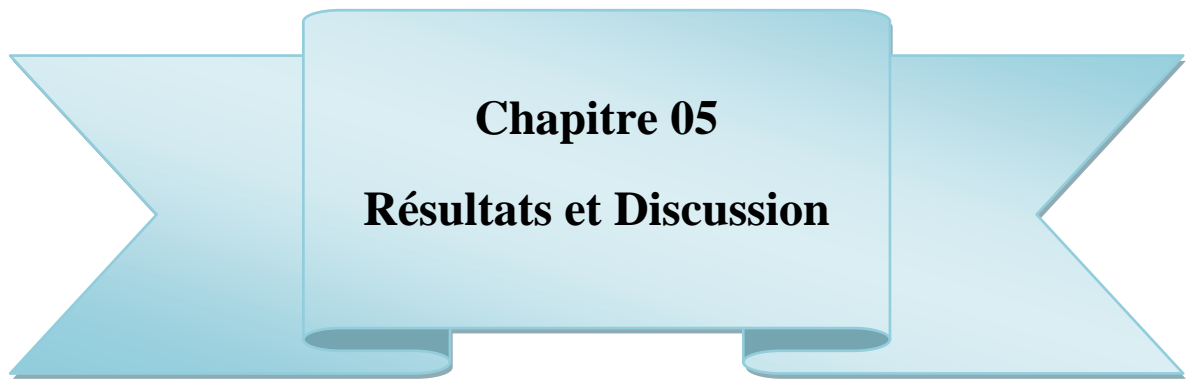
#### -Milieux de culture

Dans le but de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits, nous avons utilisé deux milieux de culture : Mueller-Hinton (MH) pour les bactéries et Sabouraud pour les moisissures

#### -Mode opératoire

La technique de diffusion sur milieu solide est utilisée pour cette étude. C'est une méthode similaire à celle de l'antibiogramme qui consiste à déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs produits. Des disques stériles de

papier filtre (Wattman n°1) de 6 mm de diamètre sont imbibés des extraits végétaux à tester. Ces disques sont ensuite placés sur de la gélose coulée dans des boîtes de Pétri standard sur 4 mm d'épaisseur. Ces boîtes de Pétri sont préalablement inoculées avec les souches bactériennes et fongiques choisies. La concentration de l'inoculum utilisée est de l'ordre de pour les bactéries et  $10^8$  spores /ml pour le champignon. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries et à 30°C pendant 3 jours pour les champignons. Si le produit est toxique pour l'espèce, il se forme une zone d'inhibition ou un halo transparent autour du disque. Plus cette zone est grande, plus l'espèce est sensible. Des disques témoins sont inclus dans les essais, Il s'agit de disques imprégnés de DMSO stérile. L'expérimentation a été réalisé en triplicata.



**Chapitre 05**  
**Résultats et Discussion**

Dans cette partie, nous présentons et nous discutons les résultats obtenus de l'étude de l'activité biologique des extraits hydro-alcooliques et aqueux des plantes *Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*.

L'étude phyto-chimique des feuilles d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* a été réalisée. Ceci dans le but d'extraire les métabolites secondaires et d'effectuer l'analyse quantitative par des dosages colorimétriques ainsi que l'évaluation de différentes activités biologiques à savoir : l'activité anti-oxydante, anticholinestérase, antibactérienne et antifongique des extraits végétaux étudiés.

## I. Détermination du rendement de l'extraction

La détermination du rendement de l'extrait étudié est une étape importante permettant de connaître la quantité et le pourcentage d'extrait obtenus par la méthode d'extraction utilisée. Les résultats des rendements des extraits hydro-alcoolique et aqueux de la partie aérienne (feuilles) d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 07:** Rendement des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*.

Extraits	Masse de la Matière végétale (g)	Aspect	Masse d'extraits sec (g)	Rendement (%)
EXT HA SB	40	poudre	9,54	23,85
EXT HA OB	40	poudre	7,95	19,88
EXT Aq OB	40	poudre	10,3	25,75

D'après les résultats, nous avons constaté que le rendement le plus élevé est obtenu par l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* (25,75%) suivi par celui de l'extrait hydro-alcoolique de *Stachys byzantina* (23,85%) puis de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ocimum basilicum* (19,88%). Aussi, nous pouvons constater que la méthode d'extraction influence le rendement puisque le rendement de l'extrait de la plante *Ocimum basilicum* dans un milieu aqueux (25,75%) semble être plus important que celui de l'extrait hydro-alcoolique de la même plante (19,88%).

**Basha et al., (2011)** ont étudié l'espèce *Ocimum basilicum*. Les rendements obtenus de l'extrait hydro-alcoolique (10,8%) et aqueux (4,5%) sont moins importants que ceux montrés dans notre étude pour l'extrait hydro-alcoolique (19,88%) et l'extrait aqueux (25,75%). Il est important de souligner que la variation des résultats d'un extrait



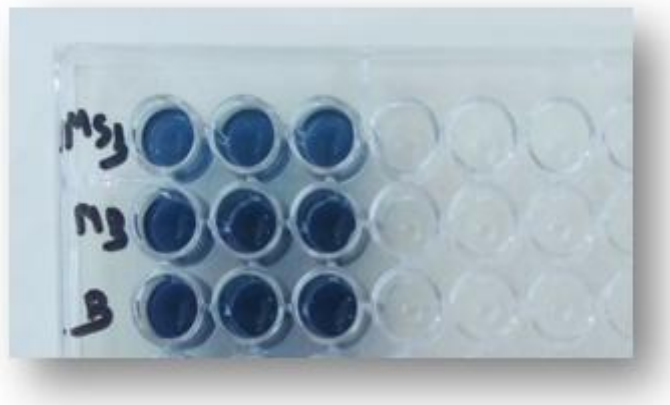
végétal même d'une espèce identique peut être expliqué par l'influence de la méthode utilisée (choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (Celhay, 2013). En plus, l'origine des plantes, la composition des sols et la saison et la période de la cueillette ont probablement un effet sur le rendement et aussi sur la composition des plantes.

## II. Analyses quantitative

### II.1. Dosage des polyphénols totaux

Le choix de quantifier les polyphénols parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait que les polyphénols ont des activités biologiques (Ulomskiy et al., 2020). De même pour les flavonoïdes qui sont considérés comme la classe la plus importante des polyphénols (Athamena, 2009)

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et de *Stachys byzantina* a été effectué par la méthode spectrophotométrique (figure 24) avec le réactif de Follin-Ciocalteu adaptée de Müller et al.,(2010).



**Figure 24:** Plaquette de dosage des Polyphénols des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*.

Le taux des polyphénols totaux est calculé à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique et les résultats obtenus sont représentés dans la figure 25. L'équation suivante détermine la teneur en polyphénols totaux (exprimée en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique par mg d'extrait ou  $\mu\text{g}$  GAE/mg) :

$$Y = 0,0013x + 0,1303 \text{ avec un coefficient de corrélation } R^2=0.9637.$$

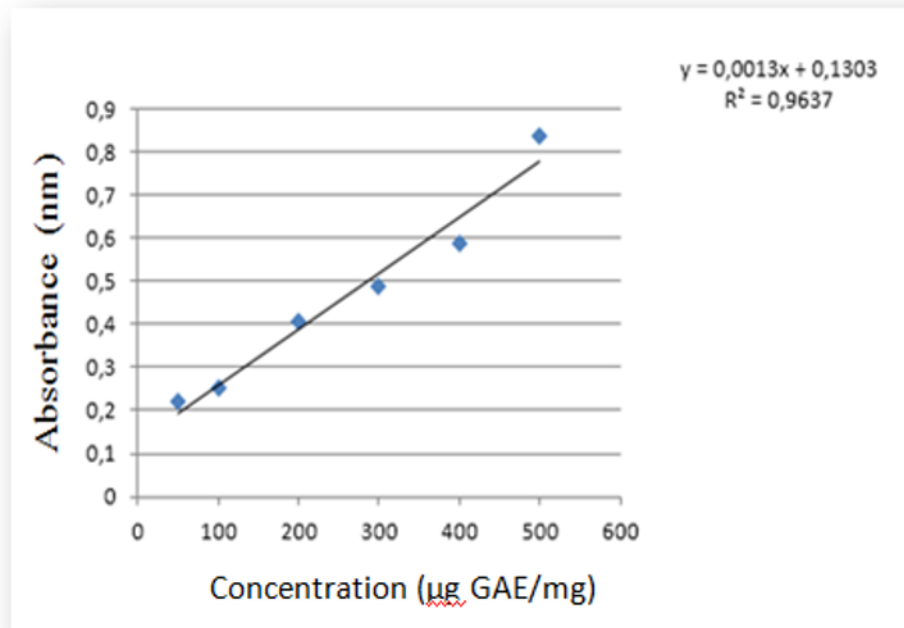


Figure 25: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Le contenu total en polyphénols des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 08: Contenu total en polyphénols des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*.

Extraits	Contenu en polyphénols (µg GAE/mg)
EXT HA SB	741,56±0,004
EXR HA OB	1261,82±0,063
EXT Aq OB	1382,59±0,052

Les résultats présentés dans le tableau (08) montrent que les valeurs de variation du contenu total en polyphénols par l'extrait hydro-alcoolique d'*Ocimum basilicum* (1261,82±0,063 µg GAE/mg) sont plus élevées que les valeurs de variation du contenu total en polyphénols par l'extrait hydro-alcoolique de *Stachys byzantina* (741,56±0,004 µg GAE/mg). Par ailleurs, l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* (1382,59±0,052 µg GAE/mg) présente une teneur en polyphénols importante par rapport à l'extrait hydro-alcoolique (1261,82±0,063 µg GAE/mg) de la même plante.

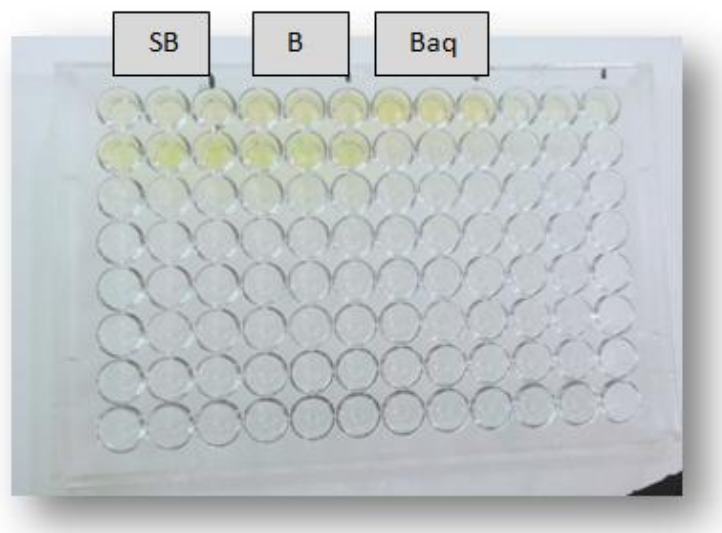
La teneur de *Stachys byzantina* en polyphénols est de 741,56±0,004 (µg GAE/mg), elle est supérieure à celle rapporté par Bahadori et al. (2020) qui ont trouvé

une teneur de  $58.06 \pm 1.28$  mg GAE/g en utilisant un extrait de la même plante obtenu par décoction. De même, nos résultats sont largement supérieurs à ceux de **toplan et al. (2021)** qui ont trouvés des valeurs de l'ordre de ( $0.0173 \pm 0.0109$  mg GAE/g extrait,  $0.0386 \pm 0.0062$  mg GAE/g extrait,  $0.0901 \pm 0.098$  mg GAE/g extrait,  $0.0630 \pm 0.0057$  mg GAE/g extrait) obtenu avec l'extrait n-hexane, chloroformique, méthanolique et l'extrait par un infusion respectivement de la même espèce.

Les résultats de l'étude de **Tuong et al., (2020)** ont révélé que l'espèce d'*Ocimum basilicum* n'est pas riche en polyphénols et ont obtenu des teneurs très faible avec l'extrait éthanolique (0.92 mg GAE/g), l'extrait méthanolique (1.4 mg GAE/g), l'extrait acétonique (0.89 mg GAE/g) et l'extrait aqueux (0.70 mg GAE/g) par rapport à nos résultats obtenu avec les deux extraits (extrait aqueux ;  $1382,59 \pm 0,052$  µg GAE/mg, extrait hydro- alcoolique ;  $1261,82 \pm 0,063$  µg GAE/mg).

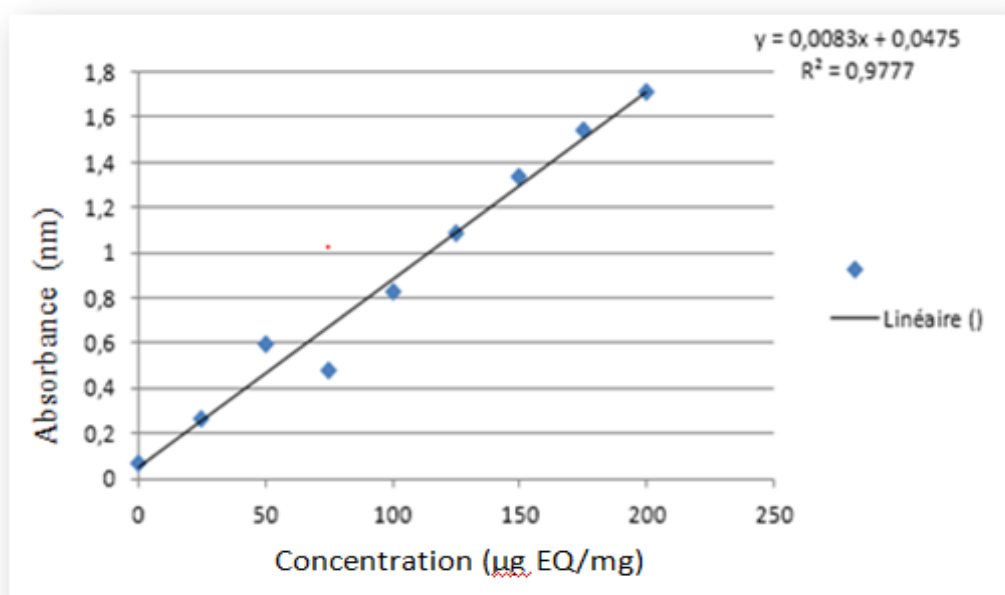
## II.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage quantitatif des flavonoïdes totaux des extrait bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* a été effectué par la méthode spectrophotométrique (figure 26) adaptée de **Topçu et al., (2007)** avec quelques modifications.



**Figure 26** : Plaque de dosage des flavonoïdes des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*.

Le taux des flavonoïdes est calculé à partir de la gamme d'étalonnage de la quercétine (quercétol). La quantité des flavonoïdes a été rapportée en µg d'équivalent de la quercétine par mg d'extrait (µg EQ/mg) (figure 27).



**Figure 27** : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats du contenu total en flavonoïdes des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* dans le tableau suivant :

**Tableau 09**: Contenu total en flavonoïdes des extraits bruts.

Extraits	Contenu en flavonoïdes (µg QE/mg)
EXT HA SB	26,205±0,03
EXR HA OB	46,084±0,05
EXT Aq OB	41,787±0,01

Les résultats du **tableau 09** indiquent que la teneur en flavonoïdes d'*Ocimum basilicum* (46,084±0,05µg QE/mg) est plus importante que celle de *Stachys byzantina* (26,205±0,03µg QE/mg). Aussi, pour *Ocimum basilicum*, le contenu en flavonoïdes de l'extrait hydro-alcooliques (46,084±0,05 µg QE/mg) est supérieur à la teneur de l'extrait aqueux (41,787±0,01 µg QE/mg).

Le taux des flavonoïdes totaux d'extraits hydro-alcoolique de *Stachys byzantina* est supérieur à celui rapporté par **Bahadori et al. (2020)** qui on trouvé une quantité de  $34.70 \pm 0.22$  mg RE/g dans un extrait obtenu par décoction. Notre résultats est également supérieur aux teneurs en flavonoïdes (7.13mg QE/g, 10.43mg QE/g, 8.61mg QE/g) trouvées dans des extrait obtenus par différentes méthodes d'extractions (par méthanol, méthanol Soxhlet et éthanol 70% respectivement) à partir de l'espèce *Stachys lavandulifolia Vahl*» (**Tundis et al., 2015**).

Ces variations des teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes entre espèce du même genre sont liées à plusieurs facteurs tels que les facteurs environnementaux, biogénique stade de maturation ou période de stockage (Nicolétti *et al.*, 2015).

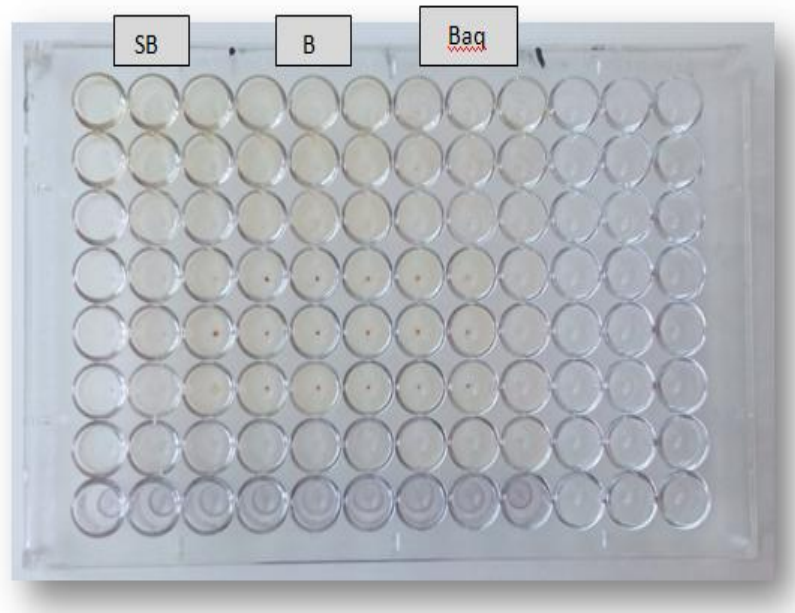
## II.3. Evaluation des activités biologiques in vitro

### II.3.1. Evaluation d'activité antioxydant

Plusieurs méthodes sont utilisées pour déterminer l'activité antioxydante d'un échantillon. Dans cette étude, les propriétés antioxydantes des extraits hydro-alcoolique et aqueux de la partie aérienne (feuilles) d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* ont été déterminées par les quatre méthodes suivantes : Le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du radical-cation ABTS, le test d'acide gallic et le test FRAP.

#### II.3.1.1. Test DPPH°

La capacité des extraits à réduire les radicaux libres de la DPPH est déterminée par la méthode spectrophotométrie décrite par Blois (1958). La concentration inhibitrice de 50 % du radical DPPH (CI<sub>50</sub>) est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé, plus la valeur CI<sub>50</sub> est faible, plus l'activité antioxydante de l'échantillon est élevée (Jadid *et al.*, 2017). Ceci en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune (figure 28).



**Figure 28** : plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*

La capacité des extraits de piéger le radical libre DPPH° hydro-alcoolique et aqueux de la partie aérienne (feuilles) d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 10** : Valeurs des CI<sub>50</sub> du test DPPH pour les extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*

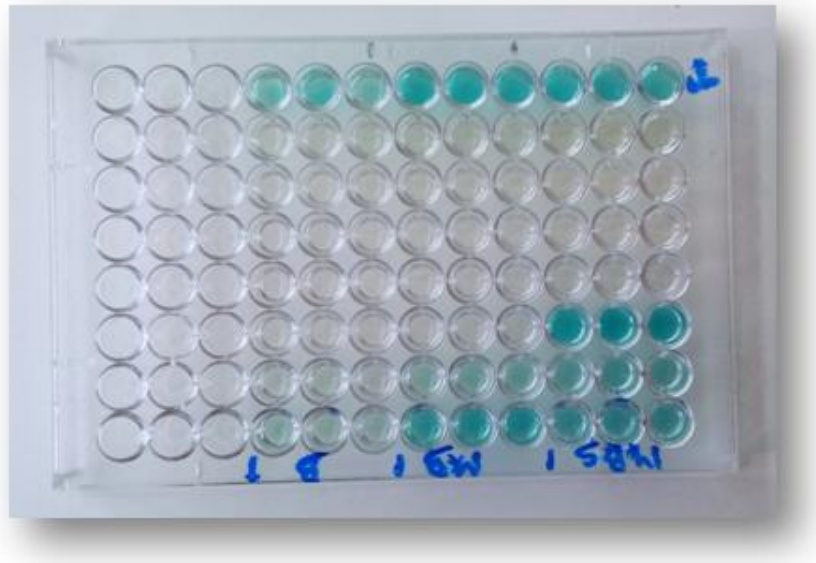
EXTRAIT	% Inhibition (DPPH)							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	CI <sub>50</sub> µg/ml
HA SB	-30,52± 0,96	-2,05± 3,09	41,64± 1,89	69,66± 2,22	76,16± 0,15	77,31± 0,27	77,85± 0,00	<b>57,36± 1,32</b>
HAOB	-4,36± 3,71	40,48± 1,49	69,48± 2,98	77,31± 0,53	79,27± 2,30	79,54± 0,86	80,25± 0,27	<b>28,96± 2,78</b>
Aq OB	26,87± 2,31	73,67± 2,33	74,64± 1,67	74,91± 3,33	76,42± 1,01	76,60± 1,32	78,02± 2,07	<b>21,49± 2,04</b>
BHA	76,55± 0,48	79,89± 0,26	81,73± 0,10	84,18± 0,10	87,13± 0,17	89,36± 0,19	90,14± 0,00	<b>6,14± 0,41</b>
BHT	49,09± 0,76	72,63± 2,06	88,73± 0,89	94,00± 0,31	94,97± 0,08	95,38± 0,41	95,02± 0,23	<b>12,99± 0,41</b>
α-Tocopherol	37,21± 1,82	81,53± 1,51	89,23± 0,12	89,38± 0,19	89,45± 0,22	89,99± 0,23	89,52± 0,33	<b>13,02± 5,17</b>

Selon les valeurs de CI<sub>50</sub>, on remarque que l'extrait hydro-alcoolique d'*Ocimum basilicum* exhibe une activité antiradicalaire au DPPH (CI<sub>50</sub>=**28,96±2,78**µg/ml) supérieure à celle de l'extrait hydro-alcoolique de *Stachys byzantina* (CI<sub>50</sub>=**57,36±1,32**µg/ml). Par ailleurs, l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* présente une activité antiradicalaire (CI<sub>50</sub>=**21,49±2,04** µg/ml) supérieure à celle de l'extrait hydro-alcoolique (CI<sub>50</sub>=**28,96±2,78** µg/ml) de la même plante.

D'après les résultats, les trois extraits ne présentent pas des activités antioxydantes importantes par comparaison a ceux des standards α-Tocopherol (CI<sub>50</sub>=**13,02±5,17**µg/ml), BHT (CI<sub>50</sub>=**12,99±0,41**µg/ml) et BHA (CI<sub>50</sub>=**6,14±0,41**µg/ml).

### II.3.1.2. Test ABTS

L'ABTS est converti en son radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) par addition de persulfate de sodium. Ce cation radical bleu-vert est reconverti en son neutre incolore forme centrale. Cette transformation est suivie par la mesure de l'absorbance à 734 nm. La disparition de la coloration bleue est proportionnelle à la capacité d'inhiber le radical ABTS<sup>•+</sup> (figure 29).



**Figure 29** : Plaque de dosage du cation radical ABTS des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 11**: Valeurs des  $CI_{50}$  du test ABTS pour les extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et de *Stachys byzantina*

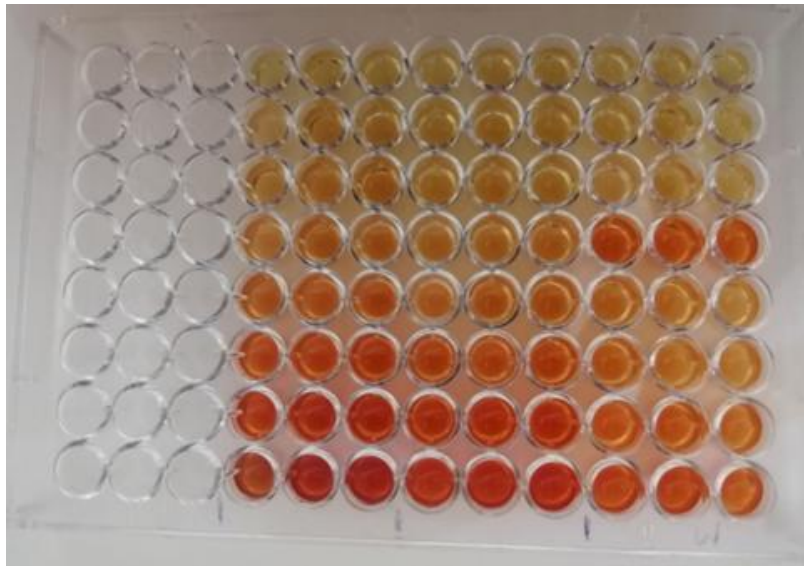
EXTRAIT	% Inhibition (ABTS)							$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$
	12.5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	200 $\mu\text{g}$	400 $\mu\text{g}$	800 $\mu\text{g}$	
HA SB	27,29 $\pm$ 0,56	33,40 $\pm$ 1,13	52,01 $\pm$ 1,78	68,63 $\pm$ 0,74	77,86 $\pm$ 4,07	90,67 $\pm$ 3,23	93,19 $\pm$ 0,25	<b>13,83<math>\pm</math> 0,24</b>
HAOB	44,08 $\pm$ 2,57	60,80 $\pm$ 3,31	88,74 $\pm$ 2,73	91,31 $\pm$ 2,27	92,49 $\pm$ 0,46	92,76 $\pm$ 0,74	91,10 $\pm$ 1,19	<b>4,28<math>\pm</math> 0,47</b>
Aq OB	30,19 $\pm$ 1,90	47,02 $\pm$ 1,35	73,57 $\pm$ 0,40	88,74 $\pm$ 2,43	92,33 $\pm$ 0,09	92,49 $\pm$ 0,91	91,47 $\pm$ 0,70	<b>7,23<math>\pm</math> 0,26</b>
BHT	69,21 $\pm$ 0,40	78,23 $\pm$ 1,34	88,12 $\pm$ 1,28	88,76 $\pm$ 3,07	90,85 $\pm$ 1,74	90,95 $\pm$ 0,51	96,68 $\pm$ 0,39	<b>1,29<math>\pm</math> 0,30</b>
BHA	92,83 $\pm$ 1,42	94,68 $\pm$ 0,42	94,95 $\pm$ 0,90	95,32 $\pm$ 0,25	95,59 $\pm$ 0,47	95,83 $\pm$ 0,15	95,86 $\pm$ 0,10	<b>1,81<math>\pm</math> 0,10</b>

D'après ces résultats, on observe que l'extrait hydro-alcoolique d'*Ocimum basilicum* possède un pouvoir anti radicalaire le plus actif avec une valeur d' $CI_{50}$  de **4,28 $\pm$ 0,47  $\mu\text{g/ml}$** . Cette valeur est élevée presque 3 fois plus que celle du BHT (**1,29 $\pm$ 0,30  $\mu\text{g/ml}$** ) et 2 fois plus que celle du BHA (**1,81 $\pm$ 0,10  $\mu\text{g/ml}$** ). Par contre, elle est meilleure que celle exprimée par l'extrait aqueux (**7,23 $\pm$ 0,26  $\mu\text{g/ml}$** ) de la même plante et l'extrait hydro-alcoolique de *Stachys byzantina* (**13,83 $\pm$ 0,24 $\mu\text{g/ml}$** ) qui exhibe un potentiel anti oxydant le plus faible ( $CI_{50}$ =**13,83 $\pm$ 0,24 $\mu\text{g/ml}$** ).



### II.3.1.3. Test Phénantroline

Ce test est basé sur la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par un composé riche en antioxydant. Le  $\text{Fe}^{2+}$  forme un complexe stable avec la phénantroline. La couleur rouge orange issue de cette réduction est mesurée par spectrophotomètre à 510 nm. Les résultats obtenus dans la **figure 30** indiquent qu'il y a un changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au rouge-orangée, ce qui montre qu'il présente une capacité antioxydante.



**Figure 30** : Plaque de dosage de la réduction par la formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$  phénantroline des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*

Cette réduction est déterminée par la mesure de la valeur  $A_{0,5}$  qui correspond à la concentration des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* nécessaire pour réduire 50% du complexe ( $\text{Fe}^{2+}$ -phénantroline). Les résultats sont récapitulés dans le tableau **12**.



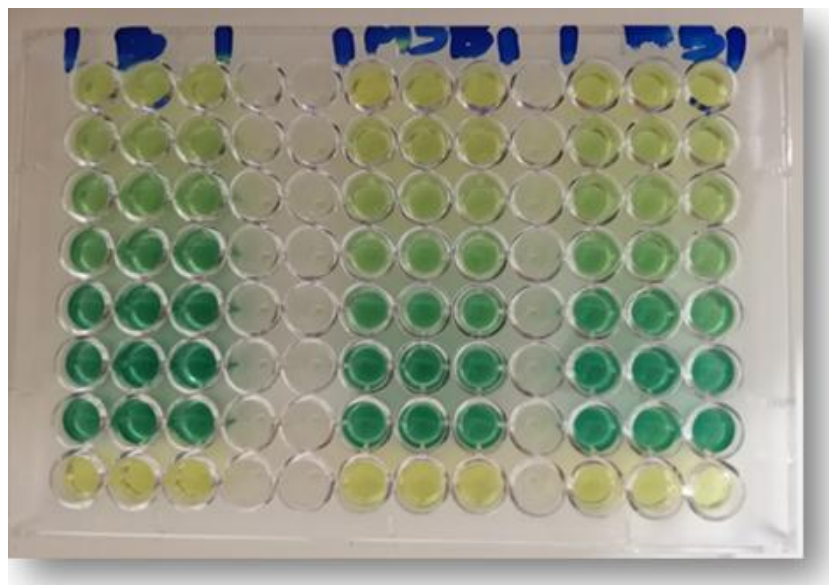
**Tableau 12** : Valeurs des  $A_{0,5}$  du test phenantroline pour des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*

Extrait	% Inhibition (phenantroline)							
	0.7812 5 µg	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	$A_{0,5}$ µg/mL
HA SB	0,27± 0,01	0,32± 0,00	0,57± 0,01	0,80± 0,01	1,30± 0,09	1,61± 0,12	2,52± 0,16	<b>12,05± 0,13</b>
HAOB	20,3± 0,01	20,34± 0,00	20,53± 0,01	20,81± 0,04	21,36± 0,14	22,84± 0,26	24,43± 0,28	<b>12,19± 0,44</b>
Aq OB	30,3± 0,01	30,54± 0,01	30,75± 0,02	31,17± 0,14	32,03± 0,20	33,69± 0,09	34,28± 0,44	<b>11,61± 0,16</b>
BHA	0,49± 0,01	0,59± 0,01	0,73± 0,02	0,93± 0,01	1,25± 0,04	2,10± 0,05	4,89± 0,06	<b>0,93± 0,07</b>
BHT	0,47± 0,01	0,47± 0,01	0,53± 0,03	1,23± 0,02	1,84± 0,01	3,48± 0,03	4,84± 0,01	<b>2,24± 0,17</b>

D'après les résultats obtenus, le pouvoir réducteur le plus élevé est enregistré par l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* exprimant une valeur d' $A_{0,5}$  de **11,61±0,16 µg/ml**. Cette valeur est presque 5 fois supérieure que celle exprimée par le BHT (**2,24±0,17 µg/ml**) et 12 fois plus que celle du BHA (**0,93±0,07 µg/ml**) suivit des extraits hydro-alcooliques de *Stachys byzantina* et d'*Ocimum basilicum* avec des pouvoirs réducteurs similaires de **12,05±0,13µg/ml** et **12,19±0,44µg/ml** respectivement.

#### II.3.1.4. Test FRAP

Le dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) repose sur la capacité des antioxydants à réduire le fer (III) en fer (II). L'évaluation est basée sur la réaction de réduction du  $Fe^{3+}$  présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en  $Fe^{2+}$ , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en couleur bleu vert du fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) (Jones et al. 2017, Li et al. 2008, Amarowicz et al. 2010). L'intensité de cette coloration (figure 31) est mesurée par spectrophotomètre à 700 nm.



**Figure 31** : Plaque de dosage du pouvoir réducteur (FRAP) des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*

Le test FRAP est appliqué à une large gamme d'antioxydants, mais sa vitesse de réaction et son rendement final peuvent varier pour chaque composé antioxydant. (Jones, 2017 ; Li, 2008 and Amarowicz, 2008). Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 13** : Valeurs des  $A_{0,5}$  du test FRAP pour les extraits brut d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*

EXTRAIT	% Inhibition (FRAP)							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	$A_{0,5}$ µg/mL
HA SB	0,10± 0,00	0,19± 0,03	0,22± 0,01	0,30± 0,01	0,65± 0,01	0,69± 0,53	0,95± 0,04	<b>38,67± 0,74</b>
HAOB	0,08± 0,01	0,13± 0,02	0,20± 0,00	0,28± 0,01	0,57± 0,00	0,81± 0,04	0,92± 0,12	<b>44,24± 0,44</b>
Aq OB	0,14± 0,01	0,23± 0,01	0,38± 0,03	0,56± 0,01	0,91± 0,08	1,14± 0,02	1,21± 0,01	<b>21,04± 0,96</b>
Ascorbic acid	0,35± 0,05	0,46± 0,03	0,84± 0,12	0,93± 0,30	1,18± 0,34	1,44± 0,21	1,37± 0,20	<b>6,77± 1,15</b>
Tannic acid	0,28± 0,02	0,78± 0,06	1,02± 0,07	1,24± 0,18	0,86± 0,6	1,01± 0,21	1,02± 0,13	<b>5,39± 0,91</b>
α-Tocopherol	0,11± 0,00	0,16± 0,00	0,21± 0,03	0,35± 0,03	0,73± 0,03	1,37± 0,08	1,81± 0,09	<b>34,93± 2,38</b>

A travers les valeurs présentées dans le **tableau 13**, il ressort que les extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* renferment un pouvoir réducteur dont le plus élevé a été prouvé par l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* (**21,04±0,96** µg/ml).

Là aussi, l'extrait hydro alcoolique de *Stachys byzantina* exhibe un pouvoir réducteur de  $38,67 \pm 0,74 \mu\text{g/ml}$  qui est proche de celui du  $\alpha$ -Tocopherol ( $34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/ml}$ ).

En revanche, le pouvoir réducteur FRAP pour l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* ( $21,04 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ ) est plus important que celle de l'extrait hydro alcoolique de la même plantes. Ces résultats présentés sont plus inférieure aux standards : l'acide ascorpique ( $6,77 \pm 1,15 \mu\text{g/ml}$ ) et l'acide tannique ( $5,39 \pm 0,91 \mu\text{g/ml}$ ).

La comparaison des résultats des tests antioxydants (DPPH, ABTS, FRAP) de notre plante «*Stachys byzantina*» avec ceux d'autres plantes étudiées a été effectuée. Nous avons constaté que les résultats des tests antioxydants (DPPH :  $57,36 \pm 1,32$ , ABTS :  $13,83 \pm 0,24$ , FRAP :  $38,67 \pm 0,74$ ) sont plus faibles que ceux de Bahadori *et al.*, (2020) qui ont étudié trois extraits du même genre par la méthode de décoction : *Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia*. Les résultats obtenus sont comme suit :

- *Stachys byzantina* : DPPH :  $139.15 \pm 0.19$ , ABTS :  $30.19 \pm 1.50$ , FRAP :  $312.44 \pm 2.54$  ;

*Stachys inflata* : DPPH :  $141.39 \pm 0.61$ , ABTS :  $325.78 \pm 3.24$ , FRAP :  $272.70 \pm 2.81$  ;

*Stachys lavandulifolia* : DPPH :  $130.44 \pm 1.13$ , ABTS :  $188.98 \pm 8.47$ , FRAP :  $270.26 \pm 0.49$ ).

Nous concluons que l'extrait hydro alcoolique de la plante étudiée *Stachys byzantina* renferment des activités antioxydantes plus importantes que celles des extraits des trois espèces étudiés par Bahadori *et al.*, (2020) et obtenus par la méthode de décoction.

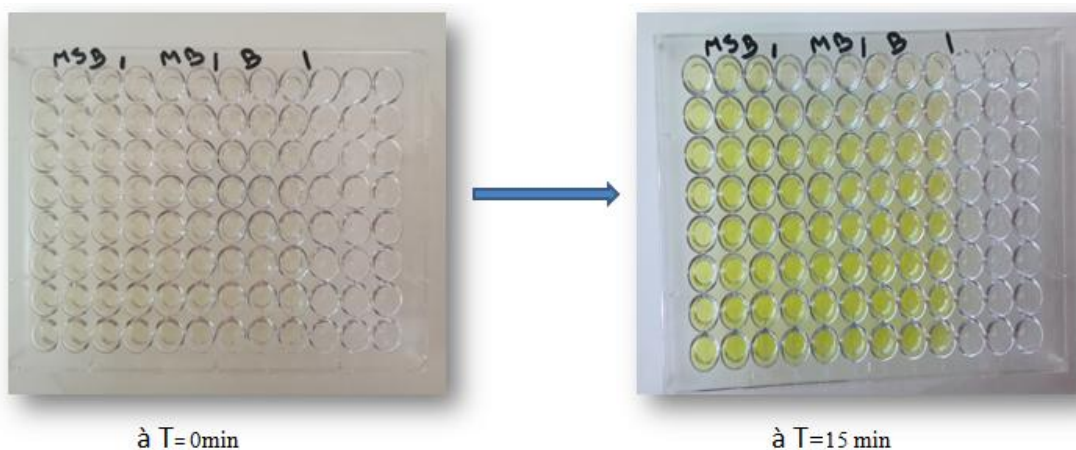
D'une autre part nous constatons que les trois extraits végétaux hydro alcooliques de *Stachys byzantina* et d'*Ocimum basilicum* possèdent une activité antioxydante modérée en utilisant les tests DPPH et ABTs. En générale, ces activités restent nettement inférieures à celles des standards BHA, BHT et  $\alpha$ -tocopherol. Ces activités peuvent être probablement améliorées et rapprochées des valeurs des standards par l'optimisation du rendement en utilisant d'autres méthodes d'extraction et aussi par la purification des molécules actives.

## II.3.2. Evaluation d'activité enzymatique

### II.3.2.1. Activité de l'acétylcholine estérase

L'évaluation de l'activité enzymatique des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* a été réalisée par l'inhibition de l'enzyme Acétylcholine estérase.

Dans ce test, le passage de la couleur transparent vers le jaune foncé issu de l'activité anti cholinestérase a été évalué par spectrophotométrie à 412 nm (figure 32).



**Figure 32 :** Plaque de dosage de l'acétylcholine estérase des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a un changement de la couleur du milieu réactionnel, ce qui montre la présence de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase pour les trois extraits de la partie aérienne (feuilles) d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* (tableau 14).

**Tableau 14:** Valeurs des  $CI_{50}$  des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* obtenus par le test d'acétylcholinestérase.

Extrait	Activité inhibitrice d'Acétylcholinestérase							
	3.125 $\mu$ g	6.25 $\mu$ g	12.5 $\mu$ g	25 $\mu$ g	50 $\mu$ g	100 $\mu$ g	200 $\mu$ g	$CI_{50}$ $\mu$ g/mL
HA SB	5,12 $\pm$ 0,18	13,57 $\pm$ 2,50	13,57 $\pm$ 2,50	32,20 $\pm$ 1,10	34,44 $\pm$ 0,88	39,94 $\pm$ 0,77	64,78 $\pm$ 0,18	<b>135,25<math>\pm</math></b> <b>1,08</b>
HA OB	4,41 $\pm$ 1,83	10,72 $\pm$ 0,64	18,05 $\pm$ 3,77	34,54 $\pm$ 0,47	49,61 $\pm$ 0,31	74,35 $\pm$ 2,00	92,47 $\pm$ 1,54	<b>52,97<math>\pm</math></b> <b>0,75</b>
Aq OB	9,60 $\pm$ 7,94	7,57 $\pm$ 0,77	12,45 $\pm$ 2,31	33,73 $\pm$ 0,81	37,60 $\pm$ 2,29	53,17 $\pm$ 0,98	77,71 $\pm$ 1,40	<b>99,64<math>\pm</math></b> <b>0,90</b>
Galantamine	35,93 $\pm$ 2,28	43,77 $\pm$ 0,00	68,50 $\pm$ 0,31	80,69 $\pm$ 0,41	85,78 $\pm$ 1,63	91,80 $\pm$ 0,20	94,77 $\pm$ 0,34	<b>6,27<math>\pm</math></b> <b>1,15</b>

D'après les résultats du **tableau 14**, l'extrait hydro alcoolique d'*Ocimum basilicum* exerce une bonne activité anti-acétylcholinestérase avec une  $CI_{50}$  de (**52,97± 0,75**µg/ml), qui est 8 fois plus faible à celle du standard galantamine (**6.27±1.15** µg/ml). Alors que l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* et l'extrait hydro alcoolique de *stachys byzantina* (**99,64± 0,90** µg/ml, **135,25±1,08** µg/ml respectivement) ont faiblement inhibé l'activité de l'AChE.

La maladie d'Alzheimer est l'une des maladies gériatriques les plus courantes troubles mentales. Selon le rapport de l'Association Alzheimer (2012), il existe une relation significative entre la pathogénicité de la maladie d'Alzheimer et la carence en acétylcholine dans le cerveau (**Kirkan et al., 2018**). Le résultat commun des études intensives dans ce domaine suggère que les médicaments anticholinergiques augmentent la fonction cognitive chez les patients d'Alzheimer.

En comparant ces résultats obtenus de plante *Stachys byzantina* avec les résultats d'une autre recherche réalisée sur trois extraits par la méthode de décoction de la même plante et deux plantes du même genre (*Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia* respectivement), on constate que nos résultat (135,25±1,08 µg/mL) est mieux par rapport à ceux rapporté par **Bahadori et al. (2020)** qui ont trouvé des valeurs à l'ordre ( $0.98 \pm 0.04$ mg GALE/g,  $1.16 \pm 0.11$  mg GALE/g,  $1.07 \pm 0.08$  mg GALE/g).

### II.3.3. Activité Antibactérienne

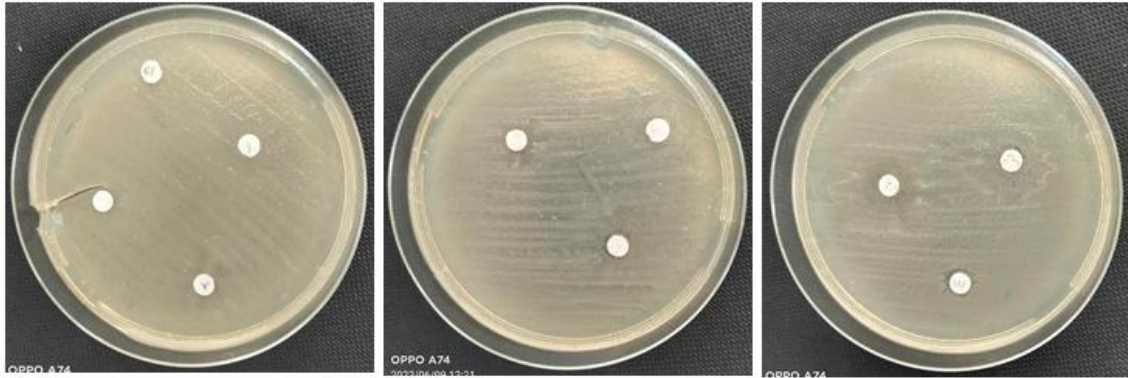
Au cours de cette étude, On choisit la méthode de diffusion des disques pour réaliser le test. Après de faire le test, La mesure des zones d'inhibition pour la lecture est effectuée à l'extérieur de la boîte fermée à l'aide d'une règle graduée. Elle est réalisée en prenant la moyenne de deux mesures différentes de diamètre. La lecture des résultats a été faite par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

La sensibilité aux différentes extraits a été classés par le diamètre des halos d'inhibition comme(**Ponce et al., 2003**) :

- (-) souche résistante ( $D < 8$  mm)
- (+) souche sensible ( $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$ )

- (+ +) souche très sensible ( $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{ mm}$ )
- (+ + +) souche excrément sensible ( $D > 20\text{ mm}$ ).

**A. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027**



**Figure 33 :** Test antibactérienne des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*

Sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

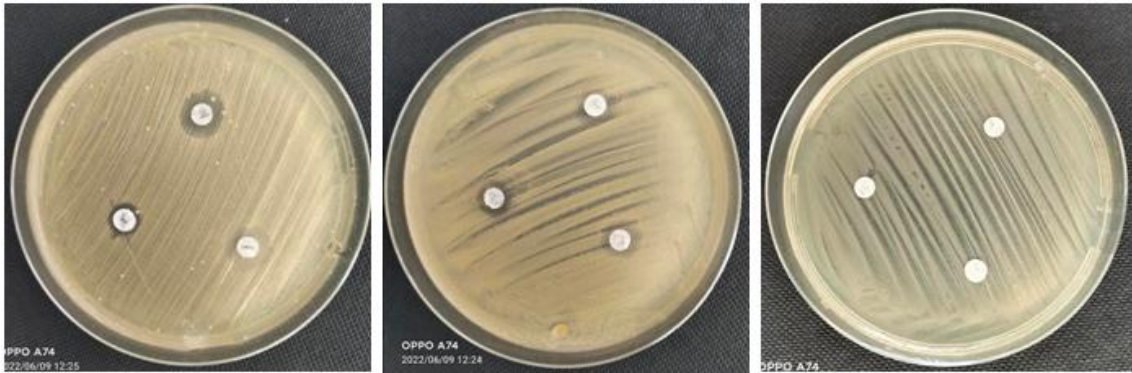
**Tableau 15 :** Effet inhibiteur des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sur la culture de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Les Extraits	Concentration (mg/ml)		Apparition de la zone d'inhibition	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
	1	0,5		
HA SB	1	0,5	+ + +	22
	1'	1	+ +	16
	1''	2	+	14,5
HA OB	2	0,5	+ +	16,5
	2'	1	+ +	17
	2''	2	+ + +	27,5
Aq OB	3	0,5	+	11
	3'	1	+ + +	22
	3''	2	+ +	18,5

(+) : Il ya une zone d'inhibition



**B. *Staphylococcus aureus* ATCC 5538**



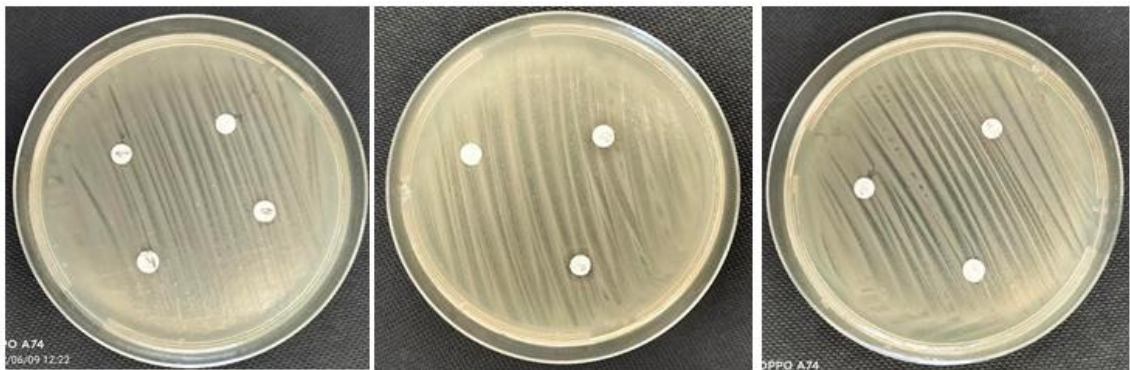
**Figure 34:** Test antibacterienne des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* Sur *Staphylococcus aureus* ATCC 5538

**Tableau 16** Effet inhibiteur des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sur la culture de *Staphylococcus aureus* ATCC 5538

Les Extraits	Concentration (mg/ml)		Apparition de la zone d'inhibition	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
	1	0,5		
HA SB	1	0,5	+	13
	1'	1	+	10,5
	1''	2	+	13
HA OB	2	0,5	+	11,5
	2'	1	+	11,5
	2''	2	+	10,5
Aq OB	3	0,5	++	16
	3'	1	++	15,5
	3''	2	+++	23

(-) : Ya pas d'une zone d'inhibition ., (+) :Il ya une zone d'inhibition

**C. *Escherichia coli* ATCC 8739**



**Figure 35 :** Test antibacterienne des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* Sur *Escherichia coli* ATCC 8739

**Tableau 17** : Effet inhibiteur des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sur la culture d'*Escherichia coli* ATCC 8739

Les Extraits	Concentration (mg/ml)		Apparition de la zone d'inhibition	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
<b>HA SB</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	-	<b>7,5</b>
	<b>1'</b>	<b>1</b>	+	<b>8</b>
	<b>1''</b>	<b>2</b>	+	<b>8,5</b>
<b>HA OB</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	-	<b>6,5</b>
	<b>2'</b>	<b>1</b>	+	<b>10,5</b>
	<b>2''</b>	<b>2</b>	+	<b>12,5</b>
<b>Aq OB</b>	<b>3</b>	<b>0,5</b>	-	<b>6</b>
	<b>3'</b>	<b>1</b>	-	<b>6</b>
	<b>3''</b>	<b>2</b>	-	<b>6,5</b>

(-) : Ya pas d'une zone d'inhibition ., (+) :Il ya une zone d'inhibition.

Au regard des résultats obtenus des tableaux et des figures nous avons observé pour :

*P. aeruginosa*, les 3 extraits (**HA SB**, **HA OB** et **Aq OB**) avaient une activité considérable avec une inhibition d'un diamètre (**14,5.**, **27,5.**, **18.5mm** respectivement) pour cette souche (**figure 35; tableau 15**).

*S.aureus*, l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* présente la meilleur activité inhibitrice avec un diamètre de **23mm** sur cette souche. Par ailleurs, les extraits hydro alcoolique de *Stachys byzantina* et *Ocimum basilicum* ont des activités un peu faibles contre la souche *S.aureus* avec des diamètres d'inhibition de (**13.**, **11,5** mm respectivement) (**figure 35; tableau 16**).

*E.coli*, les résultats du **tableau 17** et **figure 36** révèlent que l'*E.coli* est une souche sensible au extraits hydro alcoolique d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* avec des zones d'inhibition de **12,5.**, **8,5mm** respectivement, par contre cette souche s'avère résistante à l'extrait d'*Ocimum basilicum* avec une zone d'inhibition inferieur à 8mm.

On résume les résultats précédents de chaque souche dans le tableau suivant :



**Tableau 18** : Tableau résume tous les résultats des activités antibacterienne

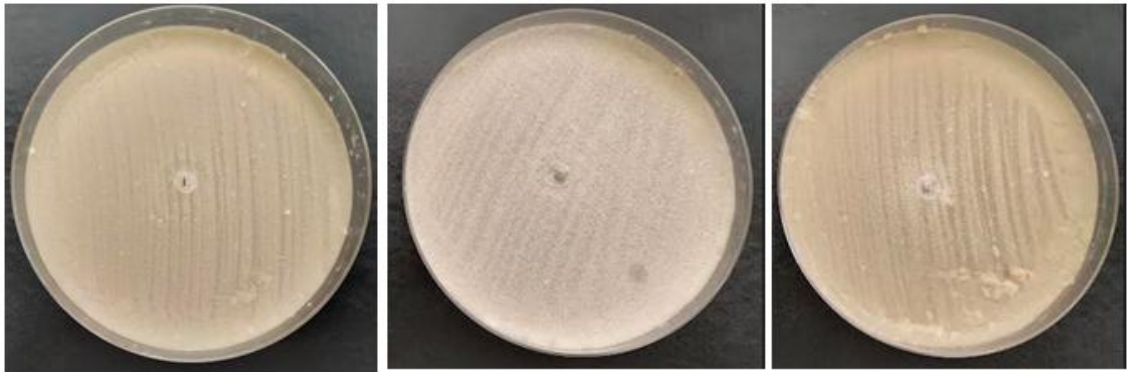
	HA SB	HA OB	Aq OB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Forte	Forte	Forte
<i>Staphylococcus aureus</i>	Moyenne	Moyenne	Forte
<i>Escherichia coli</i>	Faible	Faible	/

Dans l'étude de **ljiljana et al., 2018**, l'effet d'Huile essentiel sur la sensibilité de quelques microorganismes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) a été comparé avec nos résultats des deux extraits d'*Ocimum basilicum* évalués par la méthode des disques. D'après les résultats, il s'est avéré que l'huile essentielle d'*O basilicum* présente une forte activité antimicrobienne sur les trois bactéries. Par contre, l'extrait hydro-alcoolique d'*Ocimum basilicum* semble être plus efficace sur *Pseudomonas aeruginosa* que sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Quant à l'extrait aqueux, l'activité antibactérienne est plus importante sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* et elle est nul contre *Escherichia coli*.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **toplan et al., (2021)** qui ont étudié la même plante *Stachys byzantina*. L'extrait a donné une bonne activité antibactérienne sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* par rapport à la souche *Escherichia coli*.

### II.3.4. Activité antifongique

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité antifongique des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sur la croissance in-vitro du champignon *Fusarium oxysporium sp.albedinis*. Nos résultats obtenus sont représentés dans la figure et le tableau suivants :



**Figure 36 :** Résultats du test antifongique des extraits bruts d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sur *Fusarium oxysporium sp.albedinis*

**Tableau 18 :** Effet inhibiteur des extraits d'*Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina* sur la culture de *Fusarium oxysporium sp.albedinis*

Les Extraits	Concentration (mg/ml)		Apparition de la zone d'inhibition
<b>HA SB</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	-
	<b>1'</b>	<b>1</b>	-
	<b>1''</b>	<b>2</b>	-
<b>HA OB</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	-
	<b>2'</b>	<b>1</b>	-
	<b>2''</b>	<b>2</b>	-
<b>Aq OB</b>	<b>3</b>	<b>0,5</b>	-
	<b>3'</b>	<b>1</b>	-
	<b>3''</b>	<b>2</b>	-

(-) : Ya pas d'une zone d'inhibition

L'évaluation antifongique n'a révélé aucune activité. Les résultats obtenus montrent que le champignon testé (*Fusarium oxysporium sp.albedinis*) s'avère résistant aux trois extraits avec une zone d'inhibition inférieure à 8mm.

Conclusion

## Conclusion :

A la lumière des résultats obtenus dans ce mémoire nous avons conclu que :

Les plantes médicinales constituent une source riche et diversifiée de métabolites secondaires, qui ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux. Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux antioxydant, anti-enzymatique et antimicrobiens à partir des plantes de *Stachys byzantina* et *Ocimum basilicum*.

Les extraits bruts aqueux et hydro-alcoolique des feuilles des plantes *Stachys byzantina* et *Ocimum basilicum* récoltées dans la région Bouhalbes, Wilaya de Skikda (Algérie), sont riches en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux.

L'analyse quantitative des extraits préparés a montré que l'extrait aqueux d'*ocimum basilicum* s'est révélé plus riche en polyphénols totaux par rapport aux autres extraits ( $1382,59 \pm 0,052 \mu\text{g GAE/mg}$ ).

L'extrait hydro-alcoolique d'*ocimum basilicum* a présenté le taux le plus élevé en flavonoïdes totaux ( $46,084 \pm 0,05 \mu\text{g QE/mg}$ ).

L'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* a présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée avec  $\text{IC}_{50} = 21,49 \pm 2,04 \mu\text{g/ml}$  par rapport aux autres extraits et par rapport au standard  $\alpha$ -Tocophérol ( $\text{IC}_{50} = 13,02 \pm 5,17 \mu\text{g/ml}$ ), BHT ( $\text{IC}_{50} = 12,99 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ ) et BHA ( $\text{IC}_{50} = 6,14 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ ).

En ce qui concerne le test ABTS, on observe que l'extrait hydro-alcoolique d'*Ocimum basilicum* possède un pouvoir anti radicalaire le plus actif que avec une valeur d' $\text{IC}_{50}$  de  $4,28 \pm 0,47 \mu\text{g/ml}$

L'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum*, il montre que la réduction par la formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phenanthroline est plus importante avec une valeur d' $\text{A}_{0,5}$  de  $11,61 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$  par rapport à les autres extraits. Egalement une activité excellente de la réduction par la formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phénantroline.

Aussi, l'activité antioxydante a été évaluée par la technique de réduction du fer FRAP, qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des plantes. Les

résultats montrent que la capacité réductrice de l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum* ( $21,04 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ ) est plus élevée.

Les résultats des activités enzymatiques réalisées sur les différents extraits, ont révélé la présence d'un effet inhibitrice d'activité anti-cholinestérase. Mais l'extrait hydro alcoolique d'*Ocimum basilicum* exerce une bonne activité anti-acétylcholinestérase avec une  $\text{CI}_{50}$  de ( $52,97 \pm 0,75 \mu\text{g/ml}$ ).

Le criblage de l'activité antimicrobienne réalisé par la méthode de diffusion des disques sur trois souches bactériennes pathogènes: ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Staphylococcus aureus*** et ***Escherichia coli*** a révélé un profil d'inhibition contre ces différentes souches et L'évaluation antifongique n'a révélé aucune activité sur le champignon testé (*Fusarium oxysporium sp.albedinis*).

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer la richesse des feuilles d'*Ocimum basilicum* et de *Stachys byzantina* en substances chimiques et qui pourraient représenter une nouvelle source potentielle de molécules bioactives en thérapeutique.

Il est souhaitable de compléter et d'approfondir ce travail par :

- L'isolement et l'identification des principes actifs responsables à les activités biologiques par des techniques chromatographiques et spectrales.
- L'étude in vivo de l'activité antioxydante, enzymatique et microbienne.

Références  
bibliographiques

## Références bibliographiques

- **Abramovic**, H., Abram, V., Cuk, A., Ceh, B., Smole-mozina, S. o. n. j. a., Vidmar, M., ... & **ULRIH**, N. P. (2018). Antioxidative and antibacterial properties of organically grown thyme (*Thymus* sp.) and basil (*Ocimum basilicum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42(3), 185-194.
- **Amarowicz**, R., Estrella, I., Hernández, T., Robredo, S., Troszyńska, A., Kosińska, A., & Pegg, R. B. (2010). Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). *Food chemistry*, 121(3), 705-711.
- **Athamena**, S. (2009). Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- **Baba**, S. A., & Malik, S. A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah university for science*, 9(4), 449-454.
- **Bachelier**, G. (1973). Activité biologique des sols et techniques simples qui en permettent l'évaluation. *Cahiers de l'orstom*, 1.P: 65-77.
- **Bahadori**, M. B., Maggi, F., Zengin, G., Asghari, B., & Eskandani, M. (2020). Essential oils of hedgenettles (*Stachys inflata*, *S. lavandulifolia*, and *S. byzantina*) have antioxidant, anti-Alzheimer, antidiabetic, and anti-obesity potential: A comparative study. *Industrial Crops and Products*, 145, 112089.
- **Basha**, S. N., Rekha, R., Saleh, S., & Yemane, S. (2011). Evaluation of Invitro anthelmintic activities of *Brassica nigra*, *Ocimum basilicum* and *Rumex abyssinicus*. *Pharmacognosy Journal*, 3(20), 88-92.
- **Belkhiri**, F., & Baghiani, A. (2017). Plantes médicinales Activités antioxydantes et antibactériennes: Etude de cas : *Tamus communis* et *Carthamus caeruleus*. Éditions universitaires européennes. P : 22-24.
- **Benoit**, bock, et al. (2021). « *Stachys byzantina* K.Koch ». *Tela Botanica* (blog). 1848, *Linnaea*, 21. P: 686.
- **Blois**, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

- **Bohui**, P. S. G., Adima, A. A., Niamké, F. B., & N'Guessan, J. D. (2018). Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales: *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 46, 50-58.
- **Boligon**, A. A., Machado, M. M., & Athayde, M. L. (2014). Technical evaluation of antioxidant activity. *Med. Chem*, 4(7). P: 517-522.
- **Bouchenak**, o., Yahiaoui, k., Yenhabyles, n., Laoufi, r., Toubal, s., El haddad, d., ... & Arab, k. (2020). Criblage phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant des feuilles de *myrtus communis* l. et *rhamnus alaternus* l. *revue agrobiologia*, 10, 1749-1761.
- **Boutamina**, N. E. (2014). Les fondateurs de la pharmacologie. *BoD-Books on Demand*. P : 25.
- **Boutefnouchet**, S., Champy, P., Girard, C., Grovel, O., Hennebelle, T., Poupon, E., & Seguin, E. (2020). Pharmacognosie: Obtention et propriétés des substances actives médicamenteuses d'origine naturelle. *Elsevier Health Sciences*. P : 32- 33 et 439.
- **Causse**, C. (2005). Les secrets de santé des antioxydants. Édition Alpen, pastor center. P: 44.
- **Cellhay**, Clément. 2013. « Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante : procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi- vis et étude des conditions subcritiques », 320.
- **Dieng**, M., Fall, A. D., Diatta, K., Diatta, W., & Bassene, E. (2015). Dosage des polyphénols et activité anti-oxydante de feuilles et d'inflorescences mâles de *Borassus aethiopum*, Mart.(Arecaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(2).P: 1067-1071.
- **Djermane**, N., & Gherraf, N. (2013). Extraction des métabolites secondaires des plantes médicinales.
- **Do**, T. H., Truong, H. B., & Nguyen, H. C. (2020). Optimization of extraction of phenolic compounds from *Ocimum basilicum* leaves and evaluation of their antioxidant activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 54(2), 162-169.
- **Doat**, J. (1978). Les tanins dans les bois tropicaux. *Bois & Forêts des tropiques*, 182, 37-54.P: 39.



- **Ellman**, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Encyclopédie des plantes médicinales: [identification, préparations, soins. (2001). Larousse. P: 240
- **Fontanay**, S., Mougenot, M. E., & Duval, R. E. (2015). Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*, (2).P: 109-118.
- **Gang**, D. R. (Ed.). (2010). *The biological activity of phytochemicals* (Vol. 41). Springer Science & Business Media.
- **Garnier**, Y. (2022). Une surprenante hybridation de *Stachys byzantina*. Project: Observation on the flora of Haut Beaujolais (France).
- Gauthier, S., Rosa-Neto, P., Morais, J.A., et Webster, C. (2021). *World Alzheimer Report 2021: Journey through the Diagnosis of Dementia* .P: 314.
- **Hamdi-Ourfella**, A. et Soltani, N. (2013). Activité acétylcholinestérase et stress oxydatif chez *Helix aperta*: réponses sur divers sols et en laboratoire après contamination avec un insecticide (Actara). Project: Quality of ecosystems: Biomonitoring and physio-toxicological impacts of xenobiotics on organisms
- **Hamel** T., Sadou S., Seridi R., Boukhdir S., Boulemtafes A. (2018). Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'edough (nord-est algérien). *Ethnopharmacologia*, n°59.p :75.
- **Hawke**, R. G. (2005). *A Comparative Study of Cultivated Stachys*. The Plant Evaluation Program, Chicago botanic garden. Issue27.p:4.
- **Hmiri**, S., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M., & El Ajjouri, M. (2011). Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus Camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*.P :825.
- **Jadid**, N., Hidayati, D., Hartanti, S. R., Arraniry, B. A., Rachman, R. Y., & Wikanta, W. (2017, June). Antioxidant activities of different solvent extracts of *Piper retrofractum* Vahl. using dpph assay. In *aip conference proceedings* (Vol. 1854, No. 1, p. 020019). Aip Publishing llc.

- **Jarrige**, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., -H. Farce, M., Journet, M. (1995). Nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion. Édition intra. P : 57.
- **Jean**, B. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier.p : 938.
- **Jones**, A., Pravadali-Cekic, S., Dennis, G. R., Bashir, R., Mahon, P. J., & Shalliker, R. A. (2017). Ferric reducing antioxidant potential (frap) of antioxidants using reaction flow chromatography. *Analytica chimica acta*, 967, 93-101.
- **Jost**, J. P., & Jost-Tse, Y. C. (2016). L'automédication chez les animaux dans la nature: et ce que nous pourrions encore apprendre d'eux. *Connaissances et savoirs*.p :26.
- **Kaloustian**, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., & Vergnes, M. F. (2008). Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6(3).P: 160-164.
- **Kassi**, A. B. B., Ballo, D., Kabran, A. F., Sissouma, D., & Adjou, A. (2020). Evaluation du pouvoir antioxydant et de la teneur en polyphénols totaux de six plantes médicinales utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires. *Journal of Applied Biosciences*, 153, 15788-15797.
- **Kirkan**, B., Sarikurkcü, C., Ozer, M. S., Cengiz, M., Atilgan, N., Ceylan, O., & Tepe, B. (2018). Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of *Onosma tauricum* var. *tauricum*. *Industrial Crops and Products*, 125, 549-555.
- **Kouakou**, L. p. m. s., Coulibaly, K., Sanogo, R., & Koné-Bamba, D. (2017). Composition en sels minéraux et en métabolites secondaires de *Ziziphus mauritiana* Lam., une plante antihyperglycémiant. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 44, 30-35.
- **Krief**, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-mnhn paris).
- **Labidi**, A. (2020). Dosage d'ions Ferriques par absorptiométrie. Technical Report.
- **Li**, H. B., Wong, C. C., Cheng, K. W., & Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lwt-Food Science and Technology*, 41(3), 385-390.

- **Macheix, J. J.,** Fleuriot, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ppur presses polytechniques.p : 12 et 13.
- **Madoui, S.,** Charef, N., Arrar, L., Baghianni, A., & Khennouf, S. (2018). In vitro Antioxidant Activities of Various Extracts from Flowers-Leaves Mixture of Algerian *Cytisus triflorus*. Annual Research & Review in Biology, 26(3), 1-13.
- **Martysiak-Żurowska, D.,** & Wenta, W. (2012). A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. Acta scientiarum polonorum technologia alimentaria, 11(1).P: 83-89.
- **Massaux, C.** (2012). Polyphénols: des alliés pour la santé. Abeilles & Cie, 149, 4. P: 2.
- **Mehinagic, E.** (s. d.). Composés des fruits d'intérêt nutritionnel : Impact des procédés de transformation sur les polyphénols. 5.
- **Mehinagic, E.,** Bourles, E., & Jourjon, F. (2011). Composés des fruits d'intérêt nutritionnel: impact des procédés de transformation sur les polyphénols. Revue Suisse de Viticulture Arboriculture et Horticulture, 43(6), 364-368.
- **Menou.** (2007). Le jardin fleuri: Comment faire.... Editions France Agricole, Paris.P: 181.P: 499-505.
- **Müller, L.,** Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. LWT-Food Science and Technology, 43(6), 992-999.
- **Nicoletti, M.,** Toniolo, C., Venditti, A., Bruno, M., Ben Jemia, M. (2015) Antioxydant activity and chemical composition of three Tunisian *cistus libanotis*. Natural product research. 29(3), 223-230.
- **Nozière, P.,** sauvant, D., Delaby., L. (2018). Alimentation Des Ruminants. Éditions Quae, INRA. Versailles, France. P : 447.
- **Okkacha, H.,** Adli D.E.H., Halla, N., et Kahloulou, K. (2014). Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Chamaerops humilis* L. sur des souches isolées des silos de stockage PhytoChem & BioSub Journal. 8(3).P: 222-228.
- **Ouraïni, D.,** Agoumi, A., Ismaili-Alaoui, M., Alaoui, K., Cherrah, Y., Alaoui, M. A., & Belabbas, M. A. (2007). Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. Phytothérapie, 5(1).P: 6-14.

- **Oyaizu, M.** (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- **Paolini, V.,** Dorchies, P., & Hoste, H. (2003). Effets des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Revue Alter Agri*, 61, 17-19.
- **Pogam, P. L.,** Chollet-Krugler, M., & Boustie, J. (2015). Présentation des métabolites secondaires lichéniques : De leur biosynthèse à leur rôle au sein du thalle lichénique. 40, 10.
- **Ponce, A. G.,** & Frirz, R. D. CE and Roura, SI 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lwt-Food Science Technology*, 36, 679-684.
- **Re, R.,** Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- **Rebiere, C.** et Rebiere, O. s. d. 90+ tisanes pour se faire du bien: Petit guide digital pour apprendre les propriétés naturelles et curatives des plantes. *Nature passion*.
- **Sahi L.** (2016). La dynamique des plantes aromatiques et médicinales en Algérie [Troisième partie]. In : Ilbert H. (ed.), Hoxha V. (ed.), Sahi L. (ed.), Courivaud A. (ed.), Chailan C. (ed.). *Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie*. Montpellier : Ciheam / FranceAgriMer. P : 104 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 73).
- **Salem, J. H.** (2009). Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine). P: 271
- **Shahrajabian, M. H.,** Sun, W., et Cheng, Q. (2020). Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review. *International Journal of Food Properties*. 23(1).P: 1961-1970.
- **Simon, J. E.,** Morales, M. R., Phippen, W. B., Vieira, R. F., & Hao, Z. (1999). Basil: A Source of Aroma Compounds and a Popular Culinary and Ornamental Herb. Reprinted from: *Perspectives on new crops and new uses*. 16.

- **Singla, R. K.,** Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., ... & Al-Hiary, M. (2019). Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397-1400.
- **Soltani, Y.,** Ali-Bouzidi, M., Toumi, F., & Benyamina, A. (2017). Activités antioxydantes des extraits de trois organes de *Juniperus phoenicea* L. de l'Ouest algérien. *Phytothérapie*.P: 1-7.
- **Stanojevic, L. P.,** Marjanovic-Balaban, Z. R., Kalaba, V. D., Stanojevic, J. S., Cvetkovic, D. J., & Cakic, M. D. (2017). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(6), 1557-1569.
- **Szydłowska-Czerniak, A.,** Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szłyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899-905.
- **Tomou, E. M.,** Barda, C., & Skaltsa, H. (2020). Genus *Stachys*: A Review of Traditional Uses, Phytochemistry and Bioactivity. *Medicines* 7 (10).P: 63.
- **Topçu, G.,** Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food chemistry*, 103(3), 816-822.
- **Toplan, G. G.,** Taşkin, T., Kara, E. M., & Genç, G. E. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities of various extracts from *Stachys cretica* subsp. *bulgarica* Rech. f., *Stachys byzantina* K. Koch and *Stachys thirkei* K. Koch. *İstanbul Journal of Pharmacy*, 51(3), 341-347.
- **Tundis, R.,** Bonesi, M., Pugliese, A., Nadjafi, F., Menichini, F., & Loizzo, M. R. (2015). Tyrosinase, acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl (Lamiaceae) and its major constituents. *Records of Natural Products*, 9(1), 81.
- **Ulomskiy, E. N.,** Ivanova, A. V., Gorbunov, E. B., Esaulkova, I. L., Slita, A. V., Sinegubova, E. O., ... & Rusinov, V. L. (2020). Synthesis and biological evaluation of 6-nitro-1, 2, 4-triazoloazines containing polyphenol fragments possessing antioxidant and antiviral activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 30(13), 127216.
- **William G. Hopkins.** (2003). *Physiologie végétale*. 2<sup>o</sup> édition. Édition De Boeck Université. P : 270, 282.

- **Woodward, A., & Reed, J. D. (1989).** Influence des substances polyphénoliques sur la valeur nutritive des fourrages ligneux: synthèse des recherches menées par le Cipea. Bulletin du Cipea no, 35, 1-13.P:4.
- **Yahia, E. M. (Ed.). (2017).** Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry and human health, 2 Volumes. John Wiley & Sons.p :140.

### LISTE DES SITES

- **Site 01:** <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Basilic-plant.html> consulté le 19/06/2022 à 21:03.
- **Site 02:** [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/109797](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/109797). consulter le 07/06/2022 à 21:09.
- **Site 03:** <https://www.crstra.dz/plantes/ocimum-basilicum.php> consulter le 06/06/2022 à 16:15.
- **Site 04:** <https://www.aujardin.info/plantes/stachys-byzantina.php> consulter le 10/06/2022 à 17:50
- **Site 05:** <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>. Consulter le: 15/05/2022 à 10:01.
- **Site 06:** <https://libios.fr/solutions-analytiques/constituants-alimentaires-enzymes/dosage-activites-enzymatiques>. Consulter le: 24/05/2022 à 7:38.

# *Résumé*

## Résumé

Ce présent consiste à l'étude et à la comparaison des activités biologiques à savoir les tests phytochimiques, l'activité antioxydante, l'activité enzymatique et l'activité microbienne des extraits bruts aqueux et hydro-alcooliques des feuilles d'*Ocimum basilicum* (OB) et l'extrait hydro-alcoolique de *Stachys byzantina* (SB), récoltées dans la région de Bouhalbes, Wilaya de Skikda (Algérie). L'extraction est réalisée par la méthode de macération. : Le rendement des extraits bruts hydro-alcooliques de SB et OB sont de 23,85% et 19,88% respectivement. Quant à celui de l'extrait aqueux de l'espèce *Ocimum basilicum*, il est de (25,75%). Le rendement d'extraction le plus élevé est celui de l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum*. Les résultats de l'analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits a démontré que les taux les plus élevés ont été obtenus par l'extrait hydro-alcoolique d'*Ocimum basilicum* :  $1261,82 \pm 0,063$  µg GAE/ml de polyphénols et  $46,084 \pm 0,05$  µg QE/ml de flavonoïdes par rapport aux autres extraits. D'autre part, l'activité antioxydante a été évaluée par 04 techniques : DPPH, ABTS, FRAP et le test au Phénanthroline. Les résultats ont révélé une activité antioxydante modérée pour les deux plantes mais il a été noté que celle de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ocimum basilicum* est plus importante dans la majorité des tests. L'activité d'inhibition d'enzyme d'acétylcholinestérase (AChE), a montré que les trois extraits possèdent une forte activité inhibitrice de cet enzyme. Néanmoins, l'activité d'*Ocimum basilicum* est la meilleure que celle des standards avec un IC50 de  $52,97 \pm 0,75$  µg/ml par rapport aux autres extraits. L'activité antimicrobienne des extraits a été étudiée chez certaines souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 5538 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) et fongiques (*Fusarium oxysporium* sp. *Albedinis*). Tous les extraits ont montré un pouvoir antimicrobien sur les bactéries étudiées, par contre aucun effet antifongique sur *Fusarium oxysporium* sp. *Albedinis* n'a été observé.

**Mots clés :** *Ocimum basilicum* - *Stachys byzantina* - activité biologique - polyphénols, flavonoïdes.



## Abstract

This present consists of the study and comparison of the biological activities, namely the phytochemical tests, the antioxidant activity, the enzymatic activity and the microbial activity of the aqueous and hydro-alcoholic crude extracts of the leaves of *Ocimum basilicum* (OB ) and the hydro-alcoholic extract of *Stachys byzantina* (SB), collected in the region of Bouhalbes, Wilaya of Skikda (Algeria). The extraction is carried out by the method of maceration. : The yield of crude hydro-alcoholic extracts of SB and OB are 23.85% and 19.88% respectively. As for that of the aqueous extract of the species *Ocimum basilicum*, it is (25.75%). The highest extraction yield is that of the aqueous extract of *Ocimum basilicum*. The results of the quantitative analysis of the total polyphenols and flavonoids of the extracts showed that the highest levels were obtained by the hydro-alcoholic extract of *Ocimum basilicum*:  $1261.82 \pm 0.063 \mu\text{g GAE} / \text{ml}$  of polyphenols and  $46.084 \pm 0.05 \mu\text{g QE/ml}$  of flavonoids compared to other extracts. On the other hand, the antioxidant activity was evaluated by 04 techniques: DPPH, ABTS, FRAP and the Phenanthroline test. The results revealed a moderate antioxidant activity for the two plants but it was noted that that of the hydro-alcoholic extract of *Ocimum basilicum* is more important in the majority of the tests. The acetylcholinesterase (AChE) enzyme inhibition activity showed that the three extracts possess a strong inhibitory activity of this enzyme. Nevertheless, the activity of *Ocimum basilicum* is better than that of the standards with an  $\text{IC}_{50}$  of  $52.97 \pm 0.75 \mu\text{g/ml}$  compared to the other extracts. The antimicrobial activity of the extracts was studied in certain bacterial (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 5538 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) and fungal (*Fusarium oxysporium* sp. *Albedinis*) strains. All the extracts showed an antimicrobial power on the studied bacteria, on the other hand no antifungal effect on *Fusarium oxysporium* sp. *Albedinis* has not been observed.

**Keywords:** *Ocimum basilicum* - *Stachys byzantina* - biological activities - polyphénols - flavonoids.

## ملخص

يشتمل هذا الاخير على الدراسة وعلى المقارنة بين الأنشطة البيولوجية و التي تتمثل في الاختبارات الكيميائية النباتية ، النشاط المضاد لأكسدة ، النشاط الأنزيمي و النشاط الميكروبي للمستخلصات الخام المائي والكحولي لأوراق نبات *Ocimum basilicum* والمستخلص الكحولي لنبتة *Stachys byzantina* ، التي تم جمعها من منطقة بوحلبس في ولاية سكيكدة بالجزائر . هذا الاستخراج تم بطريقة النقع : إنتاج المستخلصات المائية الكحولية الخام لل *Ocimum basilicum* و *Stachys byzantina* هي على التوالي 23.85% و 19.88% . أما بالنسبة للمستخلص المائي لنوع *Ocimum basilicum* فهو 25.75% أعلى محصول من المستخلص المائي. أظهرت نتائج التحليل الكمي لمجموع البوليفينول والفلافونويد للمستخلصات أنه تم الحصول على أعلى المستويات من المستخلص الكحولي المائي من *Ocimum basilicum*:  $0.063 \pm 1261.82$  ميكروغرام / GAE مل من البوليفينول و  $46.084 \pm 0.05$  ميكروغرام / QE مل من مركبات الفلافونويد مقارنة بالمستخلصات الأخرى. من ناحية أخرى ، تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة من خلال أربع تقنيات DPPH و ABTS و FRAP واختبار الفينانثرولين. و قد أظهرت النتائج نشاطاً معتدلاً مضاداً للأكسدة للنباتين ، لكن لوحظ أن المستخلص المائي الكحولي لنبات *Ocimum basilicum* أكثر أهمية في غالبية الاختبارات. أظهر نشاط تثبيط إنزيم acetylcholinesterase (AChE) أن المستخلصات الثلاثة تمتلك نشاطاً مثبطاً قوياً لهذا الإنزيم. ومع ذلك ، فإن فعالية *Ocimum basilicum* أفضل من تلك الموجودة في المعايير مع IC50 بمقدار  $52.97 \pm 0.75$  ميكروغرام / مل مقارنة بالمستخلصات الأخرى . و تمت دراسة الفعالية المضادة للميكروبات للمستخلصات في سلالات بكتيرية معينة ( *Escherichia coli* ATCC 8739 و *Staphylococcus aureus* ATCC 5538 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ) وسلالات فطرية (*Fusarium oxysporium sp. Albedinis*) و قد أظهرت جميع المستخلصات قوة مضادة للميكروبات على البكتيريا المدروسة. و من ناحية أخرى، فقد أظهرت أنه لا يوجد تأثير مضاد للفطريات على *Fusarium oxysporium sp Albedinis*.

كلمات مفتاحية : *Ocimum basilicum* - *Stachys byzantina* - أنشطة بيولوجية - بوليفينول - فلافونويد.

**Année universitaire : 2021-2022**

**Présenté par : MESSAI Nesrine  
HADDADA Saloua**

Contribution à l'étude des activités biologiques de deux espèces végétales : *Ocimum basilicum* et *Stachys byzantina*

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie de Nutrition.**

### **Résumé**

Ce présent consiste à l'étude et à la comparaison des activités biologiques à savoir les tests phytochimiques, l'activité antioxydante, l'activité enzymatique et l'activité microbienne des extraits bruts aqueux et hydro-alcooliques des feuilles d'*Ocimum basilicum* (OB) et l'extrait hydro-alcoolique de *Stachys byzantina* (SB), récoltées dans la région de Bouhalbes, Wilaya de Skikda (Algérie). L'extraction est réalisée par la méthode de macération. : Le rendement des extraits bruts hydro-alcooliques de SB et OB sont de 23,85% et 19,88% respectivement. Quant à celui de l'extrait aqueux de l'espèce *Ocimum basilicum*, il est de (25,75%). Le rendement d'extraction le plus élevé est celui de l'extrait aqueux d'*Ocimum basilicum*. Les résultats de l'analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits a démontré que les taux les plus élevés ont été obtenus par l'extrait hydro-alcoolique d'*Ocimum basilicum* :  $1261,82 \pm 0,063$   $\mu\text{g GAE/ml}$  de polyphénols et  $46,084 \pm 0,05$   $\mu\text{g QE/ml}$  de flavonoïdes par rapport aux autres extraits. D'autre part, l'activité antioxydante a été évaluée par 04 techniques : DPPH, ABTS, FRAP et le test au Phénanthroline. Les résultats ont révélé une activité antioxydante modérée pour les deux plantes mais il a été noté que celle de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ocimum basilicum* est plus importante dans la majorité des tests. L'activité d'inhibition d'enzyme d'acétylcholinestérase (AChE), a montré que les trois extraits possèdent une forte activité inhibitrice de cet enzyme. Néanmoins, l'activité d'*Ocimum basilicum* est la meilleure que celle des standards avec un IC50 de  $52,97 \pm 0,75$   $\mu\text{g/ml}$  par rapport aux autres extraits. L'activité antimicrobienne des extraits a été étudiée chez certaines souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 5538 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) et fongiques (*Fusarium oxysporium* sp. *Albedinis*). Tous les extraits ont montré un pouvoir antimicrobien sur les bactéries étudiées, par contre aucun effet antifongique sur *Fusarium oxysporium* sp. *Albedinis* n'a été observé.

**Mots-clefs :** *Ocimum basilicum*, *Stachys byzantina*, activité biologique, polyphénols, flavonoïdes.

**Laboratoires de recherche :** de biochimie, faculté de Science de la Nature et de la Vie (Université des Frères Mentouri Constantine 1) et laboratoire de biochimie du Centre National de Recherche en Biotechnologie (CRBT) de Constantine

**Encadreur :** Mme DAKHMOUCHE Scheherazed (MCA, ENS Assia Djebbar, Constantine).

**Examineur 1 :** Mme BENNAMOUN Leila (MCB Université des frères Mentouri, Constantine1).

**Examineur 2 :** LAHNECHE Amina Maya (MCB. ENS Assia Djebbar, Constantine).