



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 الاخوة منتوري قسنطينة 1

UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département : Biochimie et Biologie Cellulaire
et Moléculaire

كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم : الكيمياء الحيوية و علم الاحياء
الخلوي و الجزيئي

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliqué

Intitulé :

***Evaluation in vitro des activités antioxydantes, enzymatique
et antibactérienne des extraits de Teucrium polium geyrii***

Présenté et soutenu par :

Le : 20 / 06 / 2023

- KHENFOUD Maria Nour el Imen.
- BOULAZREGUE Meissoune.

Jury d'évaluation :

- **Président du jury** : Pr. NECIB Brahim (Université des frères Mentouri-Constantine).
- **Rapporteur** : Dr. BOUDIAR Tarek (MRA-CRBt).
- **Examineur** : Dr. LEMOUI Redouane (MCA-ENS Constantine).

Remerciements

Tout d'abord On Remercie DIEU le tout puissant pour nous avoir donné la santé, la volonté, et la patience pour réaliser notre travail.

Nos remerciements les plus sincères vont à notre encadreur Dr Boudiar Tarek maître de recherche classe A qui a proposé ce thème et nous avoir guidé grâce à son suivie quotidien et ses conseils précieux ainsi que sa gentillesse et sa grande disponibilité tout au long de ce travail.

On remercie très chaleureusement le professeur Necib Brahim d'avoir accepté de présider le jury et nous honorer de leur présence. On remercie également Dr Lemoui Redouane d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse en tant qu'examineur.

Nos remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe du centre de recherche en biotechnologie (CRBt) de Constantine et surtout à Dr Chawki Benswici chef du laboratoire de biochimie pour nous avoir formé et suivie avec patience.

Par cette occasion, nous offrons nos remerciements aux ingénieurs, aux doctorants, et à toute personne qui nous avoir guidé à réaliser le travail pratique au sein de CRBt.

On remercie enfin tous ceux qui ont participé de près et de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à mes parents les plus chers à mon cœur, **hayet** et **Nacer** Pour tous les sacrifices qu'ils ont faits pour mes éducations et mes études, que DIEU les protège et les garde en bonne santé.*

*À ma grand-mère **Houria**, que Dieu lui fasse miséricorde, tu resteras toujours dans mon cœur.*

*À mes petits princes, mes neveux **Aous** et **Elyan***

*À mes très chères sœurs **Rabeb**, **Salima**, **Hiba** et **Insaf** pour leur appui, encouragements et pour leur aide incessante.*

*À mes chers frères **Babiche** et **Midou**.*

*À mon âme sœur **Marwa** merci pour ton écoute, ton soutien et ta motivation, merci d'être resté à mes côtés.*

*À mes chères cousines **Abir** et **Maya**.*

*À mes chères copines **Malak** et **Lina**.*

À toutes personnes qui m'a aidé d'un mot, d'une idée ou d'un encouragement.

MARIA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*À les plus chères de ma vie, Mes parents **Sonia** et **Hichem** pour leurs encouragements et leurs grands sacrifices. Que dieu les protège en espérant qu'ils seront toujours fières de moi.*

*À mes frères **Chouaib**, **Djad**, et le petit **Majd**.*

*À mes sœurs **Belkís**, **Yara**, et **Chahd**.*

*À mon cher fiancé **Abd Elaziz** pour sa patience, son encouragement, et sa présence à mes côtés durant les moments difficiles.*

*À mon très cher oncle **Yahia**.*

À tous les membres de ma famille et mes chères Cousines.

À mes chères amies.

À tous ceux qui m'aiment.

À tous ceux qui aiment la science.

Meïssoune

Table des matières :

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Généralités et données bibliographiques

1. Monographie de la plante	2
1.1 Famille des Lamiaceae	2
1.1.1 Intérêt pharmacologique, nutritionnel, et commercial	2
1.2 Genre <i>Teucrium</i>	3
1.2.1 <i>Teucrium polium geyrii</i>	3
1.2.1.1 Nomenclature de <i>Teucrium polium geyrii</i>	3
1.2.1.2 Position systématique de <i>Teucrium polium geyrii</i>	3
1.2.2 Description botanique	4
1.2.3 Propriétés pharmacologiques du genre <i>Teucrium</i>	4
2. Métabolites secondaires	5
2.1 Composés phénoliques	5
2.1.1 Les formes les plus simples	7
2.1.1.1 Acides phénoliques	7
2.1.1.2 Flavonoïdes.....	8
2.1.2 Les formes condensées (Tanins).....	8
2.2 Terpènes	9
3. Techniques d'analyse chromatographique	10
3.1 Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CPL / MS).....	10
3.1.1 Principe de l'analyse CPL / SM	10
3.1.2 Applications de la CPL / SM	10
4. Oxydation.....	10
4.1 Radicaux libres	11
4.2 Antioxydants	11
4.2.1 Antioxydants primaires.....	11

4.2.2 Antioxydants secondaires	12
4.3 Stress oxydatif.....	12
5. Activités biologiques.....	13
5.1 Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes et des tanins	13
5.1.1 Estimation du contenu total en polyphénols	13
5.1.2 Estimation du contenu total en flavonoïdes	13
5.2 Activités antioxydants	13
5.2.1 Activité anti radicalaire au DPPH	13
5.2.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS	13
5.2.3 Activité du pouvoir réducteur FRAP.....	14
5.2.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe ² phenanthroline	14
5.3 Activité enzymatique	15
5.3.1 Activité antidiabétique via l'inhibition de l'alpha-amylase	15
5.4 Activité microbiologique (antibactérienne).....	15

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Matériel végétal	17
2. Méthodes d'extraction et macération	17
2.1 Extraction avec le méthanol aqueux (extraction solide liquide).....	17
2.1.1 Macération classique	17
2.1.2 Extraction assistée par ultrasons	18
2.1.3 Extraction assistée par micro-ondes	18
2.2 Extraction avec le chloroforme (extraction solide liquide).....	18
3. Techniques d'analyse chromatographique	20
3.1 Analyse CPL / SM de l'extrait.....	20
4. Activités biologiques.....	21
4.1 Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes	21
4.1.1 Estimation du contenu total en polyphénols (TPC).....	21
4.1.2 Estimation du contenu total en flavonoïdes (TFC).....	22
4.2 Activités antioxydants	22
4.2.1 Activité anti radicalaire au DPPH	22
4.2.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS	23
4.2.3 Activité du pouvoir réducteur FRAP.....	23
4.2.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe ² phenanthroline	24
4.3 Activités enzymatiques	24

4.3.1 Evaluation de l'activité antidiabétique via l'inhibition de l'alpha-amylase	24
4.4 Activité microbiologique (anti bactérienne).....	24
5. Analyses statistiques.....	25

Chapitre III : Résultats et discussions

1. Composition chimique de l'extrait méthanolique de <i>Teucrium polium geyrii</i>	27
1.1 Résultats d'analyses CPL/SM	27
1.2 Identification des composées contenues dans l'extrait méthanolique.....	27
1.3 Discussion.....	34
2. Activités biologiques.....	35
2.1 Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes	35
2.2 Activités antioxydants	39
2.2.1 Activité antiradicalaire au DPPH	39
2.2.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS ⁺	41
2.2.4 Activité du pouvoir réducteur (FRAP).....	43
2.2.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² -phénantroline.....	45
2.3 Activité enzymatique	48
2.3.1 Activité antidiabétique via l'inhibition de l'alpha-amylase	48
2.4 Activité antibactérienne	49
Conclusion et perspectives.....	52
Références bibliographiques.....	53
Annexe.....	58
Résumés.....	62

Liste des abréviations

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

A0.5 : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

CPHL : Chromatographie liquide à haute performance.

CPL / MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

DPPH : 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl.

ECHL : Extrait chloroformique.

EHMC : Extrait hydro méthanolique classique.

EHMS : Extrait hydro méthanolique par Sonicateur.

EHMM : Extrait hydro méthanolique par micro-ondes.

EOA : Espèces oxygénées activités.

FCR : Folin-Ciocalteu.

Fe⁺² : Fer ferreux.

Fe⁺³ : Fer ferrique.

FRAP : Capacité de réduction ferrique du plasma.

IC50 : Concentration d'inhibition 50.

TFC : Contenu total en flavonoïdes.

TPC : Contenu total en polyphénols.

Trolox : Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique.

mg EQ/g : Milligrammes équivalents de quercétine par gramme.

GAE/g : Milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme.

m : Masse

M : Molaire

mg : Milligramme

min : Minute

ml : Millilitre

mM : Millimolaire

pH : Potentiel hydrogène

TR : Temps de rétention

µg : Microgramme

µl : Microlitre

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Chapitre 1		
Figure 1	Répartition géographique des Lamiacées.	2
Figure 2	<i>Teucrium polium geyrii</i> .	3
Figure 3	<i>Teucrium polium geyrii</i> .	4
Figure 4	Squelette moléculaire de base des flavonoïdes avec la numérotation classique.	8
Figure 5	Exemple de structure d'un tanin condensé.	9
Figure 6	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène.	11
Figure 7	Transformation du radical DPPH• en DPPHH.	13
Figure 8	Formation du radical cation ABTS+• à partir de l'ABTS.	14
Figure 9	Formation du complexe phenanthroline-Fe ²⁺ .	14
Chapitre 2		
Figure 10	Site de récolte et échantillonnage.	17
Figure 11	Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction.	19
Chapitre 3		
Figure 12	Chromatogramme de l'ionisation négative de l'extrait méthanolique de <i>Teucrium polium geyrii</i> .	27
Figure 13	Chromatogramme du produit 1.	28
Figure 14	Spectre de masse du produit 1.	28
Figure 15	Chromatogramme du produit 2.	29
Figure 16	Spectre de masse du produit 2.	29
Figure 17	Chromatogramme du produit 3.	30
Figure 18	Spectre de masse du produit 3.	30

Figure 19	Chromatogramme du produit 4.	31
Figure 20	Spectre de masse du produit 4.	31
Figure 21	Chromatogramme du produit 5.	32
Figure 22	Spectre de masse du produit 5.	32
Figure 23	Chromatogramme du produit 6.	33
Figure 24	Spectre de masse du produit 6.	33
Figure 25	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	36
Figure 26	Plaque de dosage TPC des extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	36
Figure 27	Evaluation des polyphénols totaux des extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	37
Figure 28	Courbe d'étalonnage de quercétine.	38
Figure 29	Plaque de dosage TFC des extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	38
Figure 30	Evaluation des flavonoïdes totaux des extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	39
Figure 31	Dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) des extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	40
Figure 32	Les valeurs des CI_{50} du test DPPH pour les standards et les extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	41
Figure 33	Activité du piégeage du cation radical $ABTS^{\bullet+}$ des extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	42
Figure 34	Les valeurs des CI_{50} du test ABTS pour les standards et les extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	43
Figure 35	Pouvoir réducteur (FRAP) des extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	44
Figure 36	Les valeurs des $A_{0,5}$ du test pouvoir réducteur pour les standards et les extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	45
Figure 37	Activité de réduction par la formation du complexe phénanthroline- Fe^{2+} par les extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	46
Figure 38	Les valeurs des $A_{0,5}$ du test Fe^{2+} -phénanthroline pour les standards et les extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	47

Figure 39	Activité inhibitrice d'alpha-amylase des extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	48
Figure 40	Les valeurs des CI50 du test d'inhibition de l' α -amylase pour le standard et les extraits de <i>T. polium geyrii</i> .	49
Figure 41	Effet inhibiteur de l'extrait EHMC sur la souche bactérienne <i>Escherichia coli</i> .	50
Figure 42	Effet inhibiteur de l'extrait EHMC sur la souche bactérienne <i>Staphylococcus aureus</i> .	50
Figure 43	Effet inhibiteur de l'antibiotique et le témoin négatif sur les deux souches bactériennes.	50

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Propriétés thérapeutiques des espèces du genre <i>Teucrium</i> .	5
Tableau 2	Les principales classes de composés phénoliques.	6
Tableau 3	Dérivés d'acide hydroxybenzoïque.	7
Tableau 4	Dérivés d'acide hydroxycinnamique.	8
Tableau 5	Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.	16
Tableau 6	Succession de dilution à différentes concentrations des extraits.	22
Tableau 7	différentes concentrations de l'extrait (EHMC).	25
Tableau 8	Composés de l'extrait hydro-méthanolique identifiés par CPL/SM.	34
Tableau 9	Le contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes des extraits de <i>T.polium geyrii</i> .	35
Tableau 10	Inhibition du radical DPPH par les extraits de <i>T.polium geyrii</i> .	40
Tableau 11	Inhibition de radical cation ABTS ⁺ par les extraits de <i>T.polium geyrii</i> .	42
Tableau 12	Absorbance du pouvoir réducteur par les extraits de <i>T.polium geyrii</i> .	44
Tableau 13	Absorbance du complexe Fe ⁺² - phénantroline des extraits de <i>T.polium geyrii</i> .	46
Tableau 14	Inhibition de l' α -amylase par les extraits de <i>T.polium geyrii</i> .	48

Introduction générale

Depuis les temps les plus anciens, les grandes civilisations (chinoise, égyptienne, babylonienne, grecque, romaine, etc.) ont eu recours aux plantes médicinales pour leurs propriétés thérapeutiques [1].

Les plantes sont une source importante de constituants bioactifs, notamment des phénols, des composants aromatiques, des terpénoïdes, des stéroïdes, des huiles essentielles, des alcaloïdes, des tanins et des anthocyanes qui jouent un rôle important dans le traitement de nombreuses maladies [2]. Les industries pharmaceutiques sont de plus en plus intéressées par l'étude des plantes médicinales et montrent que les médicaments à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments synthétiques [3].

L'oxydation représente un processus indispensable dans le métabolisme des cellules de l'organisme. Elle met en jeu la molécule d'oxygène dont la production par des voies métaboliques non contrôlées engendre la formation d'espèces réactives d'oxygène (ERO). En cas de surproduction dépassant les capacités d'élimination de l'organisme, ces radicaux s'attaquent à des composantes cellulaires ordinaires comme les lipides, les protéines, et les acides nucléiques. ERO sont à l'origine de nombreuses pathologies telles que l'obésité, le cancer, le diabète, l'inflammation, l'athérosclérose et les maladies dégénératives [4][5].

Les antioxydants constituent une famille de substances susceptibles de neutraliser les radicaux libres et prévenir ainsi la survenue des maladies associées au stress oxydant. Les plantes médicinales traditionnelles représentaient les principales sources d'antioxydants qui protégeaient nos ancêtres des lésions engendrées par les radicaux libres [4]. Leurs propriétés antimicrobiennes sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser [6].

L'Algérie avec sa diversité de climats et de sols, sa situation géographique et ses reliefs, présente une flore de 3510 espèces dont 450 espèces sont répertoriées dans les hauts plateaux et le grand sud du pays [7].

Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne on s'est intéressé à étudier le genre *Teucrium polium geyrii* qui appartient à la famille des Lamiaceae ou labiées et comprend plus de 300 espèces généralement aromatiques poussant à l'état spontané dans diverses régions du globe. Il est largement présent dans le bassin méditerranéen [6].

La présente étude a pour objectif l'analyse qualitative des métabolites secondaires de *Teucrium polium geyrii* en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CPL/SM) et l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante, enzymatique et antibactérienne des extraits de la plante.

Chapitre I

Généralités et données bibliographiques

1. Monographie de la plante

1.1 Famille des Lamiaceae

Lamiacées, aussi appelée labiées ou labiatées, sont une importante famille de plantes qui contiennent une grande variété de produits chimiques, tels que les terpénoïdes, les iridoïdes, les composés phénoliques et les flavonoïdes [8]. C'est la sixième plus grande famille d'Angiospermes comprenant 12 sous-familles, 236 genres, et plus de 7000 espèces [9].

En général, les espèces de Lamiacées se trouvent partout sur la planète, même si certaines espèces sont endémiques [9]. Et beaucoup d'entre eux sont largement réparties dans le bassin méditerranéen [10].

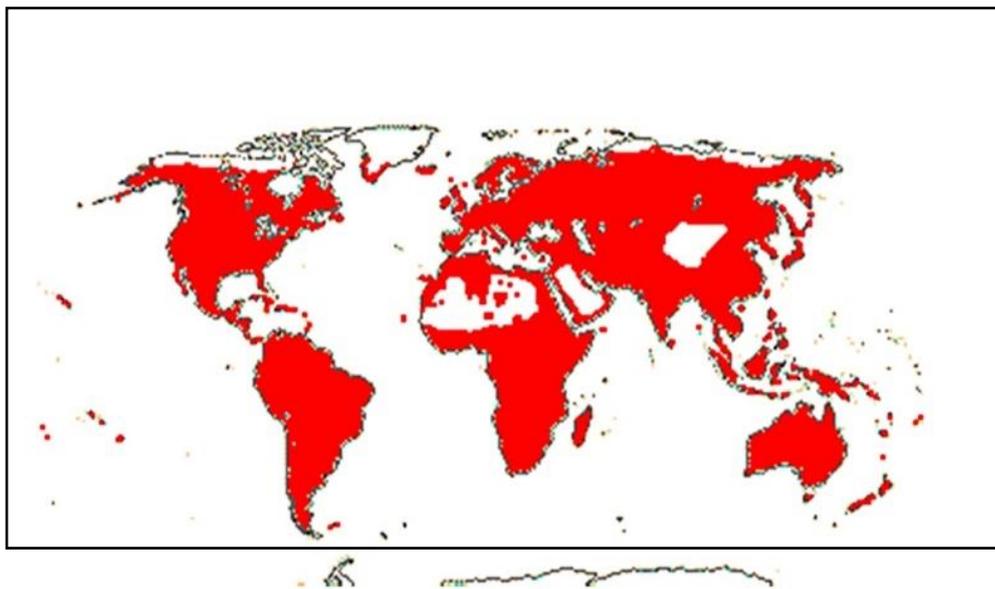


Figure 1 : Répartition géographique des Lamiacées [9].

Du point de vue botanique, les espèces appartenant à cette famille sont généralement des plantes herbacées, caractérisées par une tige quadrangulaire dépourvue d'épine. Les feuilles sont opposées, décussées ou rassemblées en verticilles le long de la tige. Les fleurs sont hermaphrodites, zygomorphes ou actinomorphes. Ce sont des tétramères ou des pentamères, généralement collectés dans des verticillasters. Chacune d'elle est constituée de nombreuses fleurs (allant de 2 à 20) et est disposée circulairement sur deux grandes bractées feuillées alternées [9].

1.1.1 Intérêt pharmacologique, nutritionnel, et commercial

Les lamiacées sont utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour les affections liées au système digestif et système respiratoire et possède également des propriétés antimicrobiennes, antivirales et antifongiques. Des parties aériennes sont avérées efficaces dans le traitement de patients souffrant de troubles anxieux, de fièvre et de rhumatismes.

De nombreuses espèces de Lamiaceae : *Mentha*, *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum*, sont des plantes spontanées et aromatiques. Elles sont utilisées dans diverses industries dont l'industrie alimentaire et parapharmaceutique [8].

1.2 Genre *Teucrium*

Le genre *Teucrium*, de la famille des lamiacées comprend 340 espèces, dont 20 ont été signalées en Algérie [11]. C'est un genre polymorphe et cosmopolite de plantes vivaces [12]. Ce genre se trouve en abondance au sud-ouest de l'Asie, de l'Europe et du nord de l'Afrique [13].

Du point de vue chimique, le genre *Teucrium* est l'une des sources les plus riches en diterpènes néoclérodanes [12].

1.2.1 *Teucrium polium geyrii*

Elle est commune dans l'Atlas saharien. Elle pousse principalement dans des lits rocheux d'altitude entre 1200 et 2600 mètres [14].



Figure 2 : *Teucrium polium geyrii*.

1.2.1.1 Nomenclature de *Teucrium polium geyrii*

- Nom Tamahaq : Takmazzut.
- Nom vernaculaire (arabe) : Chand goura.
- Nom vernaculaire (Français) : germandrée tomenteuse.

1.2.1.2 Position systématique de *Teucrium polium geyrii*

La plante *Teucrium polium geyrii* appartient à la systématique suivante [15] :

Embranchement : Spermatophytes (plantes à graine)

Sous embranchement : Angiospermes (Magnoliophyta : plantes à fleur)

Classe : Dicotylédones (Magnoliopsida)

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Teucrium*

Espèce : *Teucrium polium* geyrii

1.2.2 Description botanique

Teucrium polium est une plante vivace qui pousse en touffes de couleur gris bleuté, très rameuses, ne dépassant pas les 20 centimètres. Elle porte de petites feuilles allongées, aux bords dentelés un peu enroulés sur eux-mêmes. D'autres pieds sont beaucoup plus velus et les feuilles plus développées [16].



Figure 3 : *Teucrium polium* geyrii.

1.2.3 Propriétés pharmacologiques du genre *Teucrium*

Les espèces de *Teucrium* ont été utilisées depuis des siècles en médecine traditionnelle comme cholagogues, antispasmodiques, diurétiques, antidiabétiques, antiphlogistiques, antirhumatismales, antiseptiques, anthelminthiques et carminatives [17].

Tableau 1 : Propriétés thérapeutiques des espèces du genre *Teucrium*.

plantes	Propriétés thérapeutiques	références
<i>Teucrium montbretii</i>	Anti-inflammatoire et antioxydante.	[18]
<i>Teucrium marum</i>	Antimicrobiennes, spasmolytiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires et anti-insecticide.	[19] [20]
<i>Teucrium polium</i>	Antibactérienne, anti-inflammatoire, anti-ulcerogène, anti-nociceptive, antispasmodique, antidiabétique, diurétique, hypolipidémique, antifongique, antagoniste du calcium et cytotoxique.	[21] [22] [23]

2. Métabolites secondaires

Une des caractéristiques des végétaux est leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [69].

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...) [69].

2.1 Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont largement distribués dans le règne végétal. Ils sont les métabolites secondaires les plus abondants, avec plus de 8 000 structures phénoliques actuellement connues, possédant un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyle [24].

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (tableau 2) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation.), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques...) [69].

Les différentes classes de ces composés phénoliques, avec des exemples significatifs importants, sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Les principales classes de composés phénoliques [69].

Squelette carbone	classe	exemple	origine
C ₆	Phénols simples	Catéchol	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique Scopolétine, esculétine	Pomme de terre, pomme citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglon	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₅	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₂ -C ₆	Flavonoïdes		
	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones 	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus
	isoflavonoïdes	Naringenine Daidzéine	Soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyau des fruits

(C₁₅)_n

Tannins

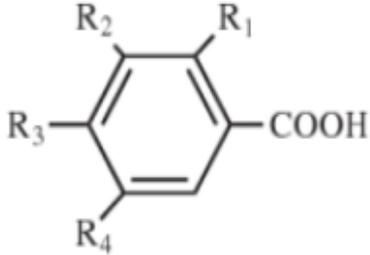
Raisin rouge, kaki

2.1.1 Les formes les plus simples

2.1.1.1 Acides phénoliques

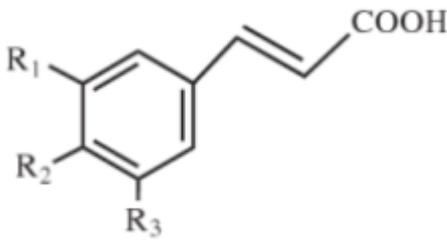
- **Les dérivés de l'acide hydroxy benzoïques** (Tableau 3) : sont des acides ont une formule de base de type (C₆-C₁) [69].

Tableau 3 : Dérivés d'acide hydroxybenzoïque [69].

	$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$	acide benzoïque (non phénolique)
	$R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OH$	acide p-hydroxy benzoïque
	$R_1 = R_4 = H, R_2 = R_3 = OH$	acide protocatéchinique
	$R_1 = R_4 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OH$	acide vanillique
	$R_1 = H, R_2 = R_3 = R_4 = OH$	acide gallique
	$R_1 = H, R_2 = R_4 = OCH_3, R_3 = OH$	acide syringique
	$R_1 = OH, R_2 = R_3 = R_4 = H$	acide salicylique
	$R_1 = R_4 = OH, R_2 = R_3 = H$	acide gentisique

- **Les dérivés de l'acide hydroxycinnamiques** (Tableau 4) : représentent une classe très importante dont la structure de base est (C₆-C₃) [69].

Tableau 4 : Dérivés d'acide hydroxycinnamiques [69].

	R ₁ = R ₂ = R ₃ =H	acide cinnamique (non phénolique)
	R ₁ = R ₃ =H, R ₂ =OH	acide p-coumarique
	R ₁ = R ₂ =OH, R ₃ =H	acide caféique
	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OH, R ₃ =H	acide férulique
	R ₁ = R ₃ =OCH ₃ , R ₂ =OH	acide sinapique

2.1.1.2 Flavonoïdes

Parmi les composés phénoliques naturels, les flavonoïdes occupent une place privilégiée et constituent une des familles de composés phénoliques la plus largement répandue. Certains ont une répartition générale dans le monde végétal et d'autres ne se retrouvent que dans un nombre plus limité d'espèces [25].

La structure de base des flavonoïdes est le noyau flavan, contenant 15 atomes de carbone disposés en trois cycles (C₆-C₃-C₆), qui sont étiquetés comme A, B et C [24].

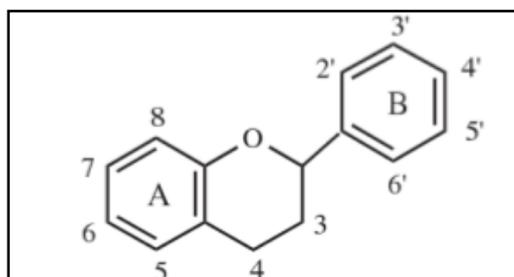


Figure 4 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes avec la numérotation classique [69].

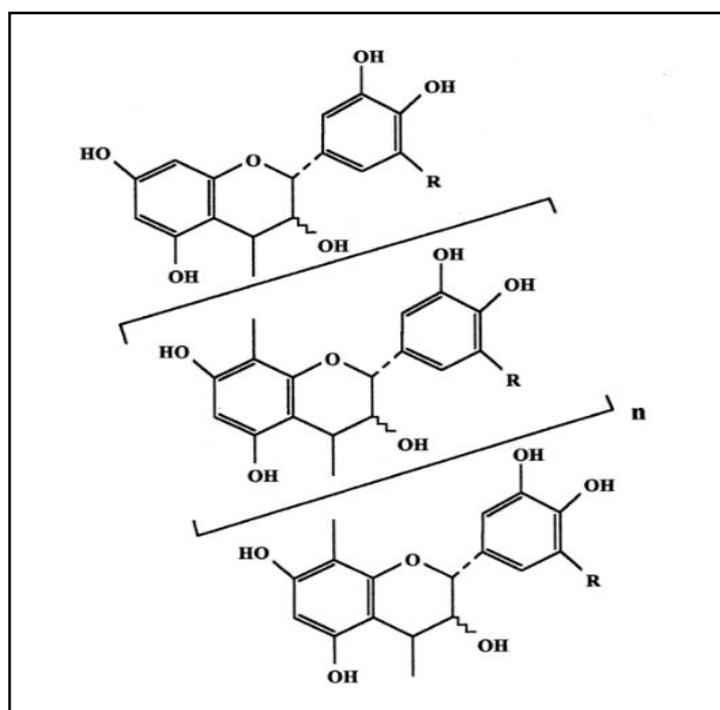
C'est d'abord la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes : les anthocyanes, pigments rouges ou bleus, les flavones et les flavonols, de couleur crème ou jaune clair, les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tannins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine. À l'intérieur de chacune des classes, les variations autour du squelette chimique de base en C₁₅ portent principalement sur le degré d'hydroxylation des différents cycles, le niveau de méthylation ou de glycosylation [69].

2.1.2 Les formes condensées (Tanins)

Les tanins sont des polyphénols ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 daltons [26]. Ils sont capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter [69]. Ces métabolites sont localisés (selon les espèces) dans les fruits, les écorces ou les feuilles [27].

Deux grands groupes de tannins différents se distinguent à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : Les tannins hydrolysables et les tanins condensés [69].

- **Les tannins hydrolysables** : caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique, souvent du glucose et une partie phénolique, qui peut être soit de l'acide gallique (cas des gallotannins), soit de l'acide ellagique (cas des ellagitannins) [69].
- **Les tanins condensés** : sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols. Contrairement aux tannins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse, et seuls des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader [69].



R= H : Unité procyanidine, dérivée de la catéchine.

R= OH : Unité prodelphinidine, dérivée de la gallocatéchine.

Figure 5 : Exemple de structure d'un tanin condensé [69].

2.2 Terpènes

Les terpènes constituent la plus grande classe de métabolites secondaires et sont unis par leur origine biosynthétique commune à partir d'acétyl-coA ou d'intermédiaires glycolytiques. Une grande majorité des différentes structures de terpènes produites par les plantes en tant que métabolites secondaires sont supposées être impliquées dans la défense en tant que toxines et dissuasifs alimentaires pour un grand nombre d'insectes et de mammifères herbivores [28].

3. Techniques d'analyse chromatographique

3.1 Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CPL / MS)

La spectrométrie de masse est une technique très sensible et largement considérée comme ayant une bonne sélectivité. C'est un instrument capable de générer des ions et peut différencier les composés que par leur rapport masse sur charge (m/z) ce qui est insuffisant dans la plupart des applications pratiques de la technique. Par conséquent, une technique de séparation supplémentaire est nécessaire avant de présenter l'échantillon au spectromètre de masse.

La chromatographie liquide-spectrométrie de masse (CPL/MS) est la combinaison de deux techniques sélectives qui permet d'isoler et de mesurer le ou les analytes d'intérêt dans des mélanges très complexes.

La CPL/SM utilise la chromatographie liquide comme système de séparation des composés selon leurs propriétés physico-chimiques et la spectrométrie de masse comme système de détection et présente donc les caractéristiques d'une séparation élevée en chromatographie liquide et d'une sensibilité élevée en spectrométrie de masse. Qui fait de la CPL/SM un outil analytique puissant [29].

3.1.1 Principe de l'analyse CPL / SM

Une fois l'échantillon est séparé par chromatographie liquide, les espèces d'échantillon séparées sont pulvérisées dans une source d'ions, où elles sont converties en ions en phase gazeuse avec une certaine charge et des nombres de masse différents. L'analyseur de masse est ensuite utilisé pour trier les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) et le détecteur compte les ions sortant de l'analyseur de masse et peut également amplifier le signal généré par chaque ion. En conséquence, un spectre de masse (un tracé du signal ionique en fonction du rapport masse sur charge) est créé, qui est utilisé pour déterminer la nature élémentaire ou isotopique d'un échantillon, les masses de particules et de molécules, et pour élucider les structures chimiques des molécules [30].

3.1.2 Applications de la CPL / SM

Dans tous les domaines d'application, le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (CPL/SM) fait actuellement appel dans la détermination du poids moléculaire et la détermination structurale de substances chimiques, de substances pharmaceutiques, de protéines. Dans les applications pharmaceutiques pour l'élucidation quantitative et structurale des médicaments et de ses métabolites dans les échantillons. Dans les applications cliniques, biochimiques, et les applications alimentaires et environnementales. Et enfin dans l'industrie agrochimique et des pesticides pour la détermination des différents composants présents dans les engrais et les pesticides [31].

4. Oxydation

L'oxygène, molécule pourtant indispensable à la vie, présente également une toxicité pour l'organisme [32] dans son état le plus stable, l'oxygène existe sous forme de dioxygène, O_2 . Lorsqu'il capte un électron, une première espèce réduite est alors formée, l'anion

superoxyde $O_2^{\bullet-}$ [33], qu'il peut déclencher une réaction en chaîne afin de produire des espèces oxygénées activées (EOA) et de nouveaux radicaux libres [34].

4.1 Radicaux libres

Les radicaux libres sont par définition des espèces chimiques possédant un électron libre non apparié sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité donc une demi vie courte et qui ne cherchent qu'à récupérer un électron dans leur environnement pour retourner à un état plus stable. Ils ont été longtemps considérés comme nuisibles, responsables de potentiels dommages de l'ADN, des protéines et des lipides [35].

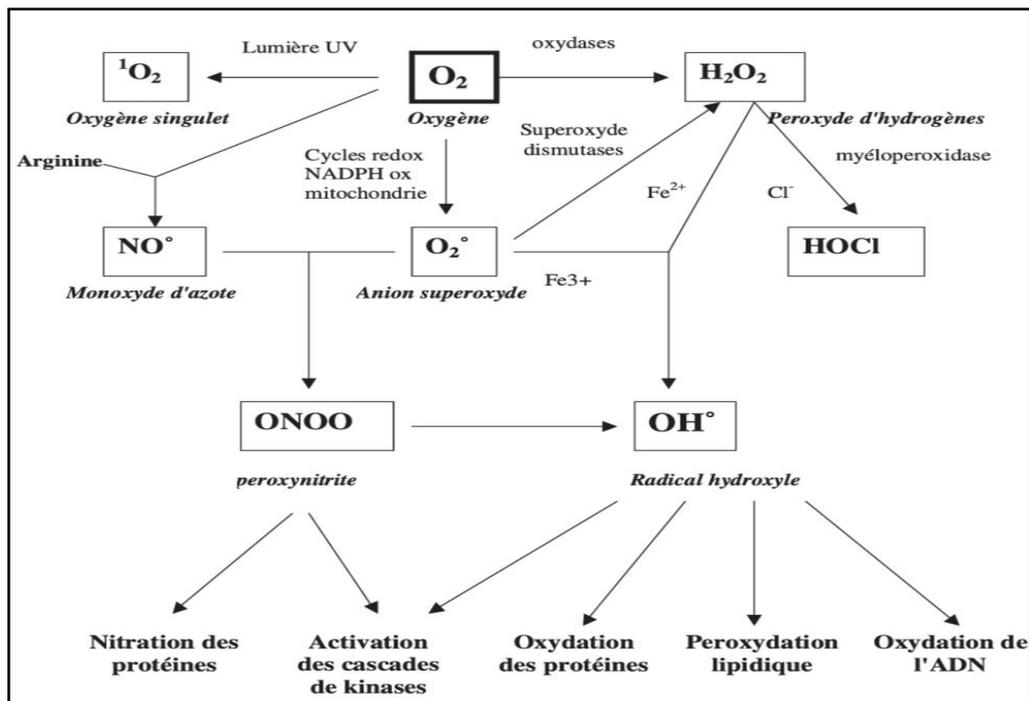


Figure 6 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie [36].

4.2 Antioxydants

Un antioxydant est une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydatif au sein de l'organisme. Un antioxydant peut donc prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles ou désactiver directement les ROS [35].

Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions en :

4.2.1 Antioxydants primaires

Proprement dits radicalaires ou vrais, qui permettent l'interruption de la chaîne auto-catalytique : $AH + R\bullet \rightarrow A\bullet + RH$. La molécule AH est antioxydant si le radical formé $A\bullet$ est plus stable [35].

Les antioxydants primaires sont des enzymes antioxydants essentielles, naturellement produites par l'organisme. Ces enzymes antioxydants endogènes sont de nature extrêmement complexes visant à détruire les super-oxydes et les peroxydes [36]. Ils constituent la plus puissante défense contre les radicaux libres et les réactions inflammatoires associées. Il existe seulement 3 antioxydants primaires : la Super Oxyde Dismutase (SOD), la Catalase (CAT), et la Glutathion Peroxydase (GPx) [37].

4.2.2 Antioxydants secondaires

Aussi appelés préventifs de nature non enzymatique, synthétisés par l'organisme ou le plus souvent apportés par l'alimentation qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres [35]. Comme la vitamine E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes, ainsi que d'autres composé endogènes synthétisés ; polyphénols, et les flavonoïdes, ce type d'antioxydants est appelé antioxydants piègeurs et agissent en piégeant les radicaux en captant l'électron libre et les transformant en molécules ou ions stables. La molécule piègeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système [36].

A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydants [35].

- **Vitamine E**

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer dans les membranes biologiques riches en acides gras polyinsaturés ou elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les espèces réactives de l'oxygène et réduit l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) le mauvais cholestérol [38].

- **Vitamine C**

L'acide ascorbique est un antioxydant puissant qui fait partie du système de protection anti-radicalaire des membranes biologiques par régénération du radical tocophéroxyde [39].

- **Les flavonoïdes**

En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques [40].

4.3 Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un syndrome résultant d'un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production de radicaux libres. Ce déséquilibre est peut-être dû à un déficit nutritionnel en antioxydants, à une surproduction endogène d'origine inflammatoire, ou à une exposition environnementale à des facteurs pro oxydants [37].

5. Activités biologiques

5.1 Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes et des tanins

5.1.1 Estimation du contenu total en polyphénols

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu [41].

Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [42].

5.1.2 Estimation du contenu total en flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes [43].

5.2 Activités antioxydants

5.2.1 Activité anti radicalaire au DPPH

Le DPPH (diphényl picryl-hydrazyl) est un radical libre relativement stable. Les antioxydants réduisent ce dernier ayant une couleur violette en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [44].

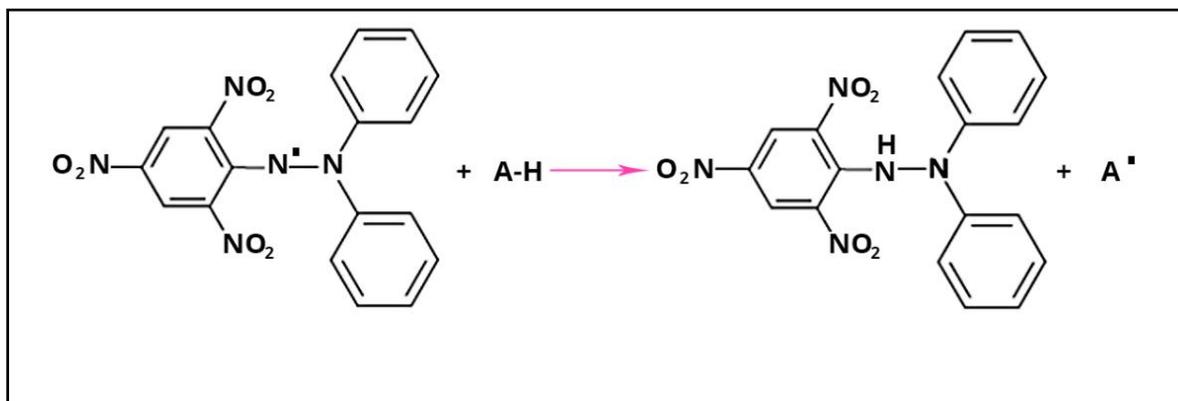


Figure 7: Transformation du radical DPPH[•] en DPPHH [44].

5.2.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS

L'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) est stable sous sa forme libre [2]. Lors de la mise en œuvre de ce test, l'ABTS incolore est préalablement oxydé avec du persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) pour former le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-vert par arrachement d'un électron e^- à un atome d'azote de l'ABTS. La

réduction du radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ en ABTS se traduit par une décoloration de la solution en présence d'un composé anti-radicalaire [4].

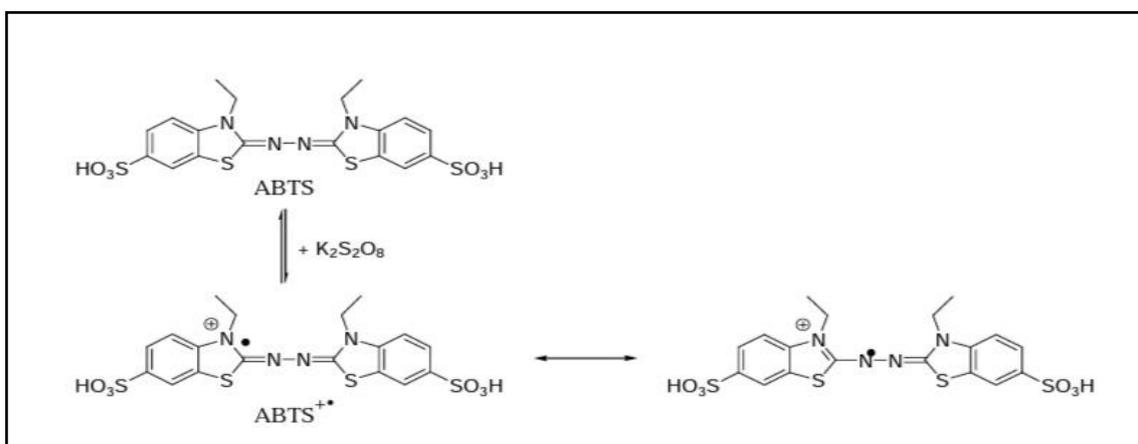


Figure 8 : Formation du radical cation $\text{ABTS}^{+\bullet}$ à partir de l'ABTS [4].

5.2.3 Activité du pouvoir réducteur FRAP

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique repose sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) [45].

La réaction est révélée par le changement de la couleur initiale jaune du fer ferrique en bleu ou vert après sa réduction en présence d'électron. Ce changement de la coloration est proportionnel à l'activité antioxydante [46].



5.2.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{2+} phénanthroline

La ferroïne, est l'indicateur d'oxydo-réduction le plus utilisé en chimie dans la détermination de Fe^{2+} dans les solutions aqueuses [47]. Elle résulte par interaction entre un composé hétérocyclique azoté tricyclique, la 1, 10-phénanthroline ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$, ortho-phénanthroline ou o-Phen) avec les ions ferreux (Fe^{2+}), pour former un complexe stable de couleur rouge orangé [48] en milieu acide (pH 3-4) selon la réaction suivante :

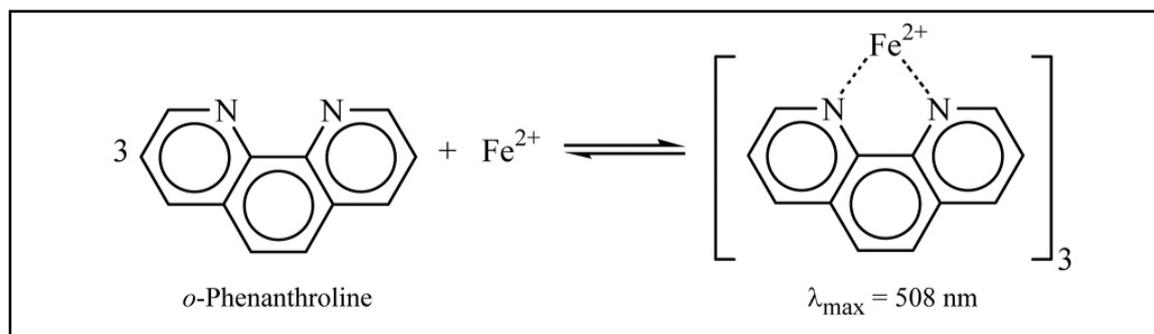


Figure 9 : formation du complexe phénanthroline- Fe^{2+} [49].

5.3 Activité enzymatique

5.3.1 Activité antidiabétique via l'inhibition de l'alpha-amylase

L' α -amylase est une enzyme digestive, produite par les glandes salivaires et les glandes pancréatiques, synthétisée également dans les fruits de plantes durant leur maturation. C'est l'une des endo-amylases les plus significatives qui hydrolyse les liaisons α (1-4) glycosidiques à l'intérieur des chaînes de l'amidon pour donner des molécules de maltose (disaccharides de α -glucose). Cette enzyme est principale pour l'absorption et la digestion de l'amidon et l'hydrate de carbone intégré dans la nourriture, ceci peut être une cible pour le traitement du diabète type 2.

L'Acarbose est un médicament bien connu, utilisé comme inhibiteur de l'enzyme α -amylase. Il retarde la digestion d'hydrate de carbone, et diminue le niveau postprandial de glucose plasmatique. Cependant, il possède des effets indésirables tels que la diarrhée, les hernies, l'ulcération...

Des inhibiteurs de l' α -amylase d'origine naturelle tels que les flavonoïdes et les composés phénoliques des plantes sont suggérés comme une approche alternative pour la prévention et le traitement de la maladie du diabète type 2 avec sans ou peu de risque d'effets secondaires [50].

5.4 Activité microbiologique (antibactérienne)

Les maladies infectieuses constituent un sérieux problème de santé et devenues la principale cause de taux de mortalité élevés, Cette situation engendre un besoin sans cesse croissant de trouver de nouveaux composés dotés de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Ou des inhibiteurs de mécanismes de résistances aux antibiotiques. Les plantes médicinales, notamment celles utilisées de façon traditionnelle, [5] constituent une source potentielle de ce type de composés qui peuvent être utilisées comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre toute altération [51].

▪ La méthode d'aromatogramme

Actuellement, cette méthode dérivée de la méthode des disques, est la plus connue et la plus utilisée, elle consiste à déposer des disques en papier imprégnés des extraits à tester sur un milieu gélosé préalablementensemencé par une suspension bactérienne.

Après l'incubation, l'activité antibactérienne, lorsqu'elle est observée, apparaît sous la forme d'un halo d'inhibition autour du disque. Le diamètre mesuré donne une donnée qualitative de l'inhibition, avec comme règle : « Plus le diamètre d'inhibition est important, plus l'échantillon testé présente une activité antibactérienne importante » [52].

Tableau 5 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition [7].

Sensibilité	Zone d'inhibition
Non sensible ou résistante (-)	Diamètre < 8mm
Sensible (+)	Diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	Diamètre compris entre 15 à 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	Diamètre > 20 mm

- **Les souches bactériennes utilisées**

Escherichia coli

Les *Escherichia coli* sont des hôtes normaux du tractus gastro-intestinal de l'animal et de l'homme. Certaines souches ont acquis le pouvoir très particulier de causer des diarrhées et de nombreuses affections extra-intestinales [53].

Ce sont des bactéries à Gram négatif et le cytoplasme est entouré par l'enveloppe cellulaire composée de deux membranes dont le compartiment situé entre eux appelé périplasma, contient la couche de peptidoglycane. L'enveloppe cellulaire protège à la fois la cellule et facilite le contact fondamental avec l'environnement [54].

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus est un commensal commun des humains et son habitat principal est l'épithélium squameux humide des narines antérieures [55].

Il s'agit des bactéries à gram positif [56] connues pour être un agent pathogène polyvalent causant une grande variété d'infections communautaires et nosocomiales associées à une morbidité et un taux de mortalité élevé [57].

Chapitre II

Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

Pour cette étude, La récolte du matériel végétal (*Teucrium polium geyrii*) a été effectuée durant le mois de janvier 2023 dans la région de Béchar sud-ouest algérien. Ce matériel a été mis à notre disposition sous la direction du Dr Tarek Boudiar.



Figure 10 : Site de récolte et échantillonnage.

La description botanique a été réalisée par Dr Bouyahmed Hani, botaniste au centre de recherche en biotechnologie de Constantine.

Après séchage dans un endroit bien aéré et sec, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 20 jours, la plante a été broyée entièrement à l'aide d'un broyeur électrique dans le but d'obtenir une poudre à utilisation immédiate.

2. Méthodes d'extraction et macération

L'extraction des composés a été réalisée selon deux méthodes : extraction avec le méthanol aqueux (extraction classique, par ultrasons, et par micro-ondes). Et extraction avec le chloroforme.

2.1 Extraction avec le méthanol aqueux (extraction solide liquide)

2.1.1 Macération classique

La macération est un phénomène lent et consiste à ressortir des substances présentes dans un solide (broyat) pour les faire passer dans un solvant liquide (méthanol aqueux).

➤ Protocole

- Peser 50g de la matière végétale (broyat).
- Mettre la matière végétale (50g) dans un récipient puis verser le méthanol aqueux avec le rapport (50 : 50).

- 250 ml méthanol.
- 250 ml H₂O.
- Agiter de temps en temps et laisser macérer pendant 72hr.
- Filtrer le macérât obtenu par filtration sous vide.
- Récupérer le filtrat dans un flacon.

2.1.2 Extraction assistée par ultrasons

L'extraction par ultrasons est la technique privilégiée pour libérer des composés bioactifs de la matière végétale en contact avec le solvant sous une action mécanique exercée par les ultrasons, ce qui augmente la diffusion du solvant dans les tissus et brise les parois cellulaires par cavitation et étirement [70].

➤ Protocole

- Peser 50g de la matière végétale (broyat).
- Mettre cette quantité dans un récipient puis verser le méthanol aqueux avec le rapport (50 :50).
 - 250 ml méthanol.
 - 250 ml H₂O.
- Agiter doucement.
- Placer le récipient à l'intérieur du Sonicateur (la sonde à ultrasons doit être immergée dans le récipient) Pendant 30 min.
- Récupérer le filtrat dans un flacon après filtration sous vide.

2.1.3 Extraction assistée par micro-ondes

Contrairement aux techniques classiques de chauffage par conduction ou convection, l'utilisation des micro-ondes implique une interaction directe entre un rayonnement électromagnétique et la matière dont l'énergie d'une onde électromagnétique est convertie en chaleur au sein de ce matériel [71].

➤ protocole

- Peser 50g de la matière végétale (broyat).
- Mettre la matière végétale dans un récipient puis verser le méthanol aqueux avec le rapport (50 :50).
 - 250 ml méthanol.
 - 250 ml H₂O.
- Agiter doucement.
- Placer à la micro-onde pendant 30s (répétée 3 fois).
- Filtrer sous vide l'extrait et récupérer le filtrat dans un flacon.

2.2 Extraction avec le chloroforme (extraction solide liquide)

➤ Protocole

- Peser 50g de la matière végétale (broyat).
- Ajouter 500 ml du chloroforme et agiter doucement.

- Fermer le flacon et laisser macérer pendant 72hr.
- Filtrer la solution par filtration sous vide.
- Récupérer le filtrat dans un flacon.
- ❖ Les quatre solutions obtenues ont été concentrées à pression réduite en utilisant un évaporateur rotatif, de marque BUCHI.

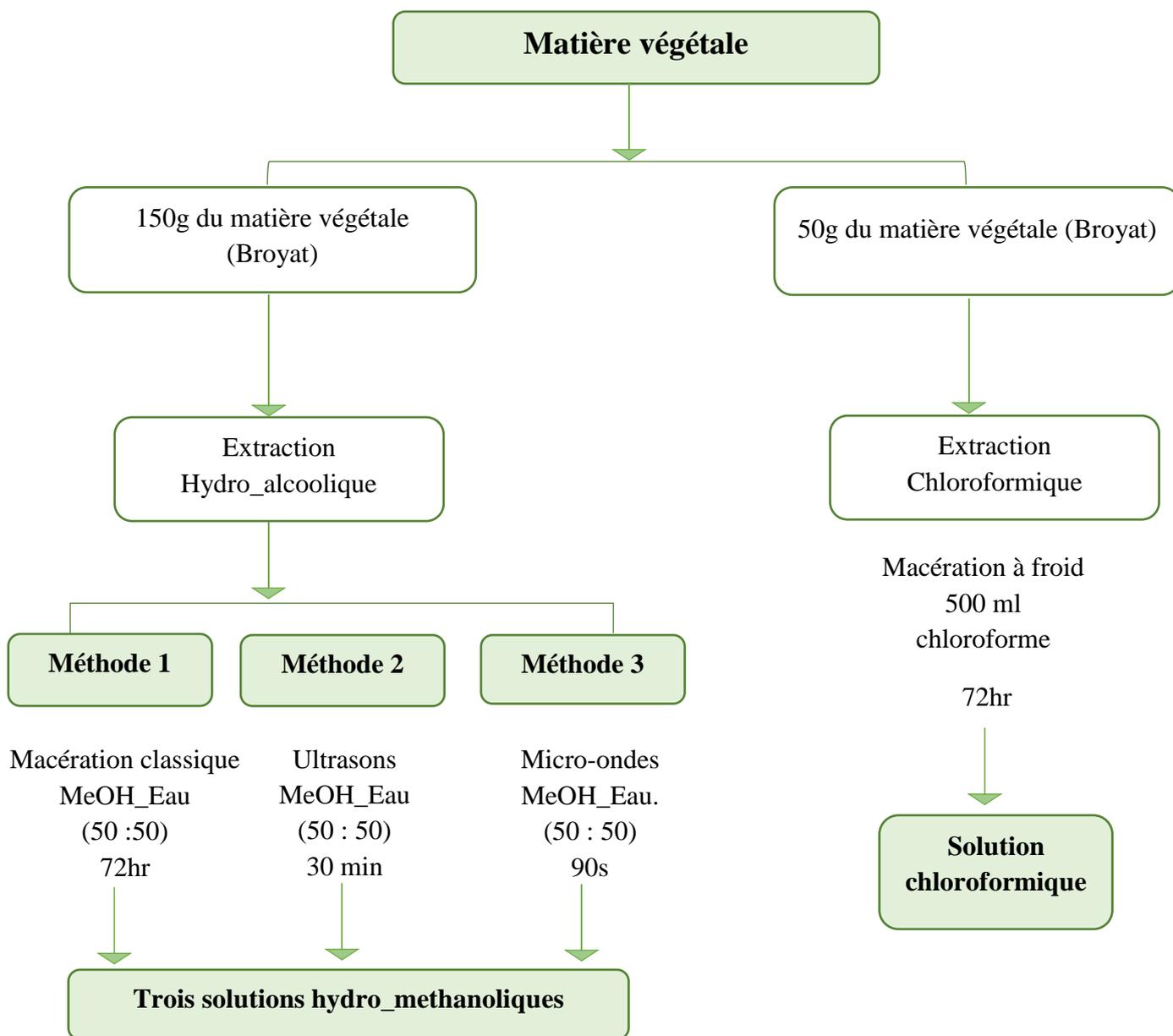


Figure 11 : Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction.

3. Techniques d'analyse chromatographique

3.1 Analyse CPL / SM de l'extrait

Les analyses ont été effectuées avec un Agilent série 1200 à résolution rapide (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) équipé d'une pompe binaire, d'un échantillonneur automatique et d'un détecteur à barrette de diodes (DAD). Le débit a été fixé à 0,80 mL/min tout au long du gradient. L'extrait a été préparé à une concentration de 20 000 mg/L et le volume d'injection était de 10 µL. La séparation a été effectuée avec une colonne Zorbax Eclipse Plus C18 de 150 × 4,6 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies) à température ambiante. L'élution par gradient a été réalisée en utilisant de l'eau avec 0,1 % d'acide formique comme éluant A et de l'acétonitrile comme éluant B. Le gradient linéaire en plusieurs étapes suivant a été appliqué : 0 min, 5 % B ; 45 min, 100 % B ; 55 min, 5% B et enfin un cycle de conditionnement de 5 min avec les mêmes conditions pour l'analyse suivante. Les composés séparés ont été suivis en séquence d'abord avec le DAD puis avec un détecteur de spectrométrie de masse.

L'analyse MS a été réalisée à l'aide d'un analyseur de spectrométrie de masse à temps de vol quadripolaire (QTOF, modèle 6540 Agilent Ultra-High-Definition Accurate-Mass QTOF) qui était équipé d'une interface d'ionisation electrospray (ESI, modèle Agilent Dual Jet Stream interface). Les spectres ont été acquis sur une plage de masse de m/z 70 à 1100 fonctionnant en modes d'ionisation négative. Les conditions opératoires avec les paramètres fixés comme polarité correspondante étaient les suivantes : flux d'azote de séchage à 12 L/min ; pression du gaz de nébulisation, 50 psi ; température du gaz gaine, 370 °C ; débit de gaz gaine, azote à 10 L/min ; tension capillaire, 3500 V ; écumoire, 45 V ; tension radiofréquence octapolaire, 750 V ; tension de focalisation, 500 V et m/z 70–1100, respectivement. Les données d'acquisition MS/MS ont été réalisées en utilisant les valeurs d'énergie de collision suivantes : m/z 100, 30 eV ; m/z 500, 35 eV ; m/z 1000, 40 eV ; et m/z 1500, 45 eV. L'étalonnage a été effectué avec une perfusion continue de solution d'étalonnage contenant du sel d'ammonium d'acide trifluoroacétique et de l'hexakis (1H,1H,3H-tétrafluoropropoxy) phosphazine en mode d'ionisation négative. Tous les spectres ont été calibrés avant l'identification phytochimique. La fenêtre de détection a été fixée à 100 ppm. Les données MS

et MS/MS ont été traitées à l'aide du logiciel Mass Hunter Qualitative Analysis B.06.00 (Agilent technologies), qui a fourni une liste de formules élémentaires possibles. Pour la caractérisation, le modèle isotopique sélectionné était des molécules organiques courantes avec une tolérance d'espacement des pics de m/z 0,0025 et 7 ppm. Le seuil de précision largement accepté pour la confirmation de la composition élémentaire a été établi à 5 ppm pour la plupart des composés et le score MS lié à la contribution à la précision de la masse, à l'abondance des isotopes et à l'espacement des isotopes pour la formule moléculaire générée a été fixé à ≥ 80 . Les composés proposés ont été provisoirement identifiés en comparant les temps de rétention, Données MS à partir d'échantillons et d'étalons de référence. Les composés restants pour lesquels aucune norme commerciale n'était disponible, ont été identifiés par l'interprétation des informations générées par l'analyseur QTOF (spectres MS et MS/MS) et les informations rapportées précédemment.

4. Activités biologiques

Les mesures des absorbances pour l'évaluation des activités biologiques ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits de marque Perkin Elmer USA avec son logiciel EnSpire au niveau du laboratoire de biochimie au centre de recherche en biotechnologie de Constantine.

4.1 Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes

Pour réaliser les dosages de polyphénols et flavonoïdes on a utilisé 1 mg de chaque extrait dissout dans 1 ml de méthanol.

4.1.1 Estimation du contenu total en polyphénols (TPC)

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [41] selon une méthode de dosage décrite par Muller et al., (2010) [58].

➤ *Protocol expérimental*

Un volume de 20 μ l de chaque extrait a été ajouté à 100 μ l de folin-Ciocalteu (FCR) dilué (1:10) (**Annexe III**) et 75 μ l de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (7,5%) (**Annexe III**). Ce mélange a été incubé à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 765 nm.

La quantification des polyphénols totaux a été déduite à partir d'une gamme d'étalonnage (**Annexe V**) établie avec l'acide gallique (**Annexe IV**) comme control positif.

4.1.2 Estimation du contenu total en flavonoïdes (TFC)

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits a été réalisé selon la méthode de Topçu et al., (2007) [59] avec quelques modifications.

➤ *Protocol expérimental*

Un volume de 50 µl de chaque extrait a été ajouté à un mélange de 130 µl de méthanol, 10 µl d'acétate de Potassium (CH₃COOK) (**Annexe III**) et 10 µl de Nitrate d'aluminium (AL(NO₃)₂) (**Annexe III**). L'absorbance de ce mélange réactionnel a été lue à une longueur d'onde de 415 nm, après incubation de 40 minutes à température ambiante.

L'estimation du contenu total en flavonoïdes a été déduite à partir d'une gamme d'étalonnage (**Annexe V**) établie avec la quercétine (**Annexe IV**) comme control positif.

4.2 Activités antioxydants

L'activité anti-oxydante est évaluée soit par le dosage des produits formés par des techniques photométriques plus ou moins directes, soit par la mesure de l'efficacité du composé à piéger des radicaux libres.

Afin de réaliser ce test une succession de dilution a été préparée à partir de 4 milligramme de chaque extrait dissout dans 1 ml du méthanol (solution mère) selon le tableau suivant :

Tableau 6 : Succession de dilution à différentes concentration des extraits.

Les extraits							
La dilution	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
	Solution mère						
La concentration des solutions (mg/ml).	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
La concentration dans le milieu réactionnel (µg/ml)	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125

4.2.1 Activité anti radicalaire au DPPH

L'activité anti radicalaire au DPPH a été mesurée par spectrophotométrie selon le protocole décrit par Blois (1958) [60].

➤ *Protocol expérimental*

Sur une microplaque de 96 puits, un volume de 40 µl de différentes concentrations de chaque extrait a été déposé dans chaque puits. Ensuite, un volume de 160 µl de la solution

méthanolique de DPPH (**Annexe II**) a été additionné. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm, après une incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Le trolox (**Annexe IV**) et l'acide ascorbique (**Annexe IV**) sont utilisés comme standards antioxydants.

L'activité anti radicalaire de chaque échantillon a été exprimée en pourcentage d'inhibition du DPPH selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = \frac{A \text{ controle} - A \text{ extrait}}{A \text{ control}} \times 100$$

A contrôle : Absorbance du contrôle négatif.

A extrait : Absorbance des solutions d'extrait.

4.2.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS

L'activité anti radicalaire du piégeage du cation radical ABTS^{•+} est déterminée selon la méthode de Re (1999) [61] avec une légère modification.

➤ *Protocol expérimental :*

Dans chaque puit d'une microplaque, un volume de 160 µL de la solution d'ABTS^{•+} (**Annexe II**) a été ajoutée à 40 µL de différentes concentrations de chaque extrait. Le trolox (**Annexe IV**) et l'acide ascorbique (**Annexe IV**) ont été utilisés comme standards. Après 10 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante l'absorbance a été mesurée à 734 nm.

Les différents pourcentages d'inhibition ont été calculés selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition du ABTS} = \frac{A \text{ controle} - A \text{ extrait}}{A \text{ control}} \times 100$$

4.2.3 Activité du pouvoir réducteur FRAP

Cette activité est déterminée par la méthode d'Oyzaiu (1986) [62] avec légères modifications.

➤ *Protocol expérimental :*

Dans une microplaque à 96 puis, 10 µl de différentes concentrations de chaque extrait ont été ajoutées à 40 µl d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) (**Annexe III**) et 50 µl d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1% (**Annexe III**). Ce mélange est incubé pendant 20 min dans une étuve à 50 C°. Après incubation, 50 µL de l'acide trichloracétique (TCA) à 10% (**Annexe III**), 40 µL d'eau distillée et 10 µL d'une solution aqueuse de chlorure ferrique FeCl₃ à 0,1% (**Annexe III**) ont été déposées dans chaque puits.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été réalisée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

Le contrôle positif est représenté par deux solutions des antioxydants standards ; l'acide ascorbique (**Annexe IV**) et le Trolox (**Annexe IV**).

4.2.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe² phenanthroline

Ce test est réalisé selon la méthode décrite par Szydłowska-Czerniaka (2008) [63].

➤ *Protocol expérimental :*

Des volumes de 10 µl de différentes concentrations des extraits ont été ajoutés dans chaque puits avec 50 µl FeCl₃ (0.2%) (**Annexe III**), 30 µl Phenanthroline (0.5%) (**Annexe II**) et 110 µl de méthanol. Le mélange est incubé dans une étuve à 30C° pendant 20 min. Après incubation l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Les résultats ont été calculés à titre d'A_{0,5} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

4.3 Activités enzymatiques

4.3.1 Evaluation de l'activité antidiabétique via l'inhibition de l'alpha-amylase

L'activité inhibitrice de l'α-amylase est déterminée selon la méthode de Zengin et al., (2014) [64] avec quelques modifications.

Sur une microplaque de 96 puits, un volume de 25 µl de différentes concentrations de chaque extrait a été mélangé avec 50 µl de la solution d'α-amylase (1U) (**Annexe III**), puis incubé pendant 10 minutes à 37°C. Ensuite, 50 µl d'amidon (0,1 %) (**Annexe III**) sont additionnés. Après une deuxième incubation pendant 10 minutes à 37°C, 25 µl d'acide hydrochlorique (HCL) (**Annexe III**) (1M) et 100 µl d'iodure de potassium iode (IKI) (**Annexe III**) sont ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 630nm. L'acarbose (**Annexe IV**) a été utilisée comme standard.

Le pourcentage d'inhibition de l'α-amylase a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l}'\alpha - \text{ amylase} = 1 - \frac{(Ac - Ae) - (As - Ab)}{(Ac - Ae)}$$

Ac = Absorbance [Amidon + IKI + HCL + VOL de solvant d'extrait + VOL tampon enzyme]

Ae = Absorbance [Enzyme + Amidon + IKI + HCL + VOL de solvant d'extrait]

As = Absorbance [Enzyme + extrait + Amidon + IKI + HCL]

Ab = Absorbance [Extrait + IKI + 125 de tampon]

4.4 Activité microbiologique (anti bactérienne)

L'activité antibactérienne est évaluée par la méthode d'aromatogramme ou de diffusion des disques sur milieu gélosé [65]. Elle permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis-à-vis de l'extrait hydro-méthanolique classique (EHMC).

La gélose de Mueller Hinton stérile est coulée dans des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte puis laissées refroidir. L'inoculum bactérien, est frotté sur la totalité de la surface de Mueller Hinton de haut en bas en stries serrées.

➤ Préparation de l'extrait

Afin de réaliser ce test, quatre solutions de différentes concentrations de l'extrait (EHMC) ont été préparées à l'aide du DMSO (diméthylsulfoxyde) qui est inerte sur l'activité antibactérienne [66] et l'eau distillée avec le rapport (10 / 90).

Tableau 7 : différentes concentrations de l'extrait (EHMC).

Extrait hydro méthanolique classique (EHMC)				
Solution	A	B	C	D
La concentration (mg/ml)	8	6	4	2

➤ Procédure

Des disques de 6 mm de diamètre ont été préparés à partir du papier Wathman N°3. A l'aide d'une pince stérile, ces disques imprégnés d'une quantité de chaque solution de l'extrait (EHMC), ont été déposés à la surface des boîtes de pétri préalablementensemencées avec les bactéries tests (*Escherichia coli* ATCC 25922, et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Dans chaque boîte de Pétriensemencée deux disques de la même solution ont été appliqués.

Les boîtes ont été ensuite fermées et laissées à la température ambiante pendant 30 min pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives, puis incubées à une température de 37°C pendant 24 heures. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque en mm.

5. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été réalisés en trois répétitions pour chaque essai, ils sont exprimés en moyenne \pm SD. Les valeurs de CI_{50} (Concentration d'inhibition à 50%) et de $A_{0.5}$ (la concentration indiquant 0,50 d'absorbance) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir des deux courbes : [% inhibition = f (concentrations)] pour la CI_{50} et [Absorbance = f (concentrations)] pour la $A_{0.5}$. Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2007.

Chapitre III

Résultats et discussion

1. Composition chimique de l'extrait méthanolique de *Teucrium polium geyrii*

1.1 Résultats d'analyses CPL/SM

Une solution de 1000 ppm a été préparée dans le méthanol puis injectée dans l'instrument LC-ESI-MS. Le chromatogramme de cette injection est représenté dans la figure ci-après.

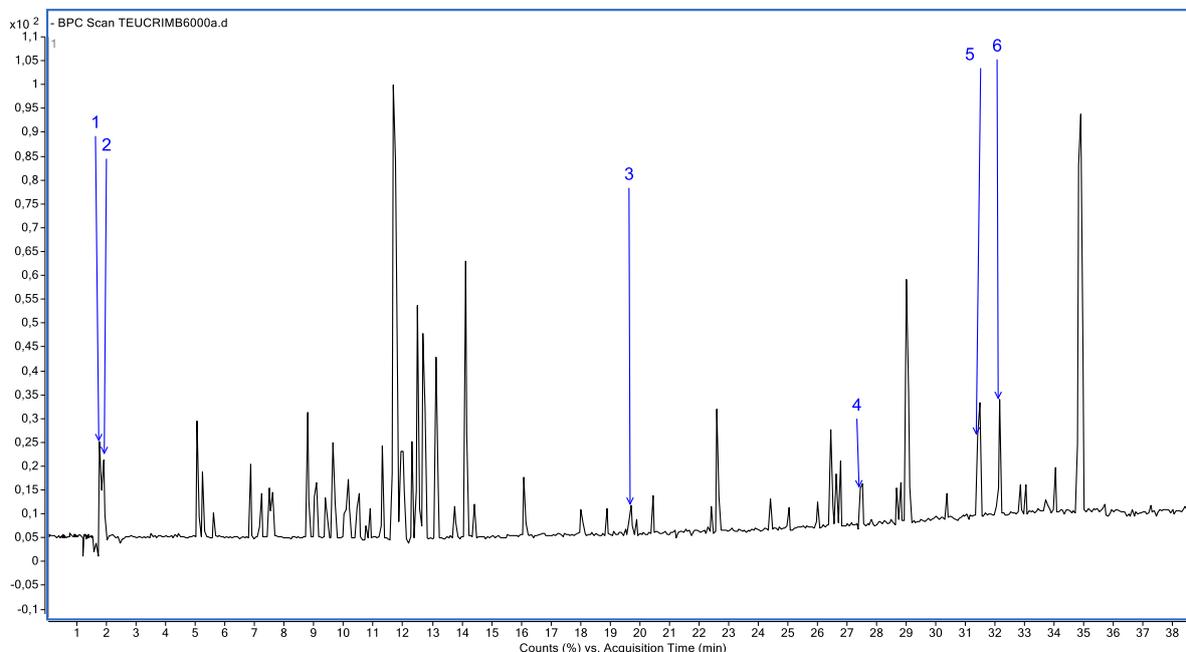


Figure 12 : Chromatogramme de l'ionisation négative de l'extrait méthanolique de *Teucrium polium geyrii*.

1.2 Identification des composés contenus dans l'extrait méthanolique

L'analyse des résultats par le logiciel *Qualitative Analysis B.06.00* de *Agilent Mass Hunter Workstation* de l'ionisation négative en comparaison avec les données de la littérature nous a permis d'identifier six composés.

▪ Identification de produit 1 :

Le pic qui apparaît à un temps de rétention de 1,749 min avec $m/z = 665,2152$ et les fragments majoritaires : 179,0561(59,44%) et 341,1087(22,41%) a été identifié au D-Stachyose de formule brute $C_{24}H_{42}O_{21}$.

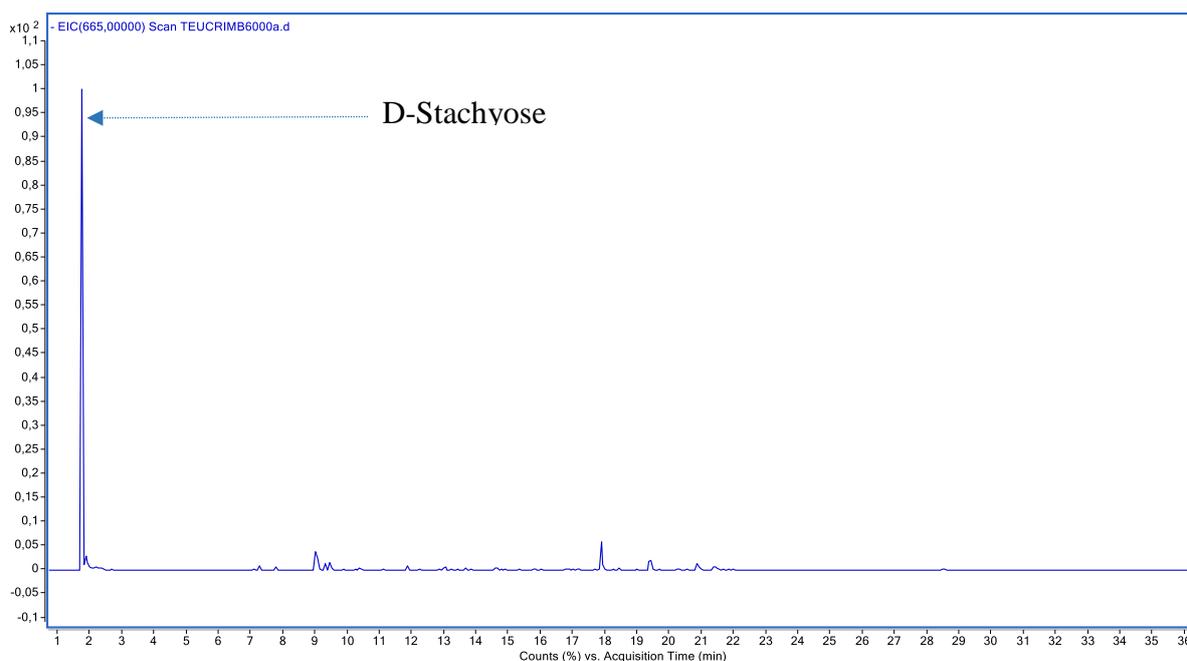


Figure 13 : Chromatogramme du produit 1.

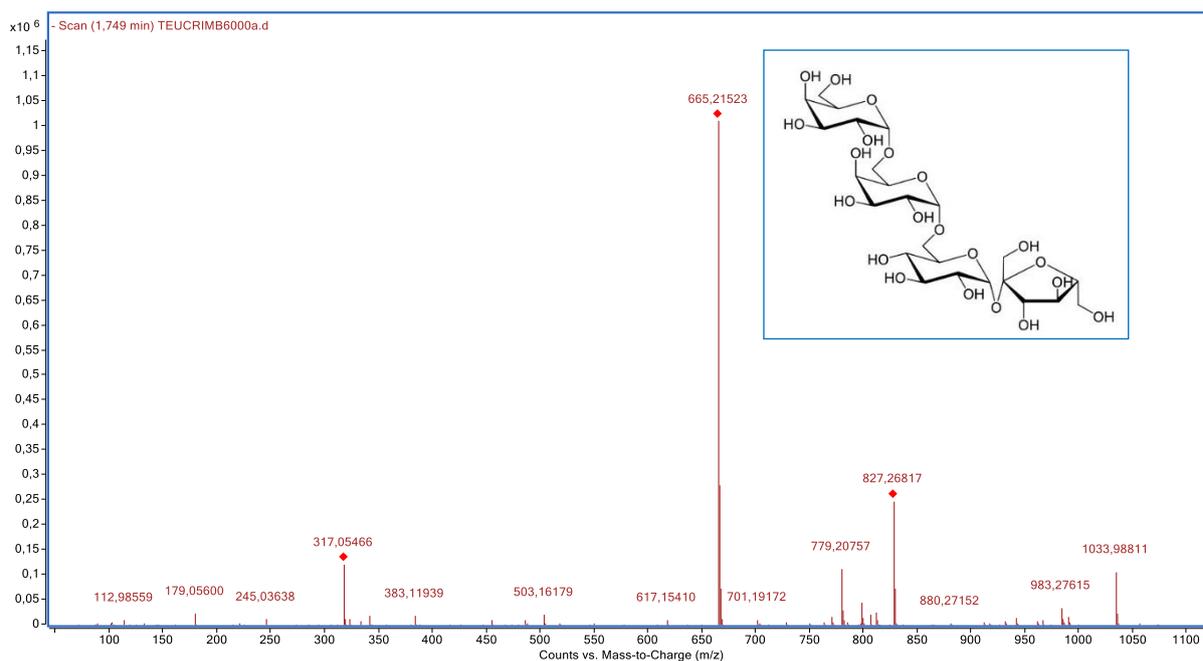


Figure 14 : Spectre de masse du produit 1.

■ **Identification de produit 2 :**

Le pic qui apparaît à un temps de rétention de 1,873 min avec $m/z = 191,0563$ et les fragments majoritaires : 85,0298 (100%) et 93,0349(44,44%) a été identifié au Quinic acid de formule brute $C_7H_{12}O_6$.

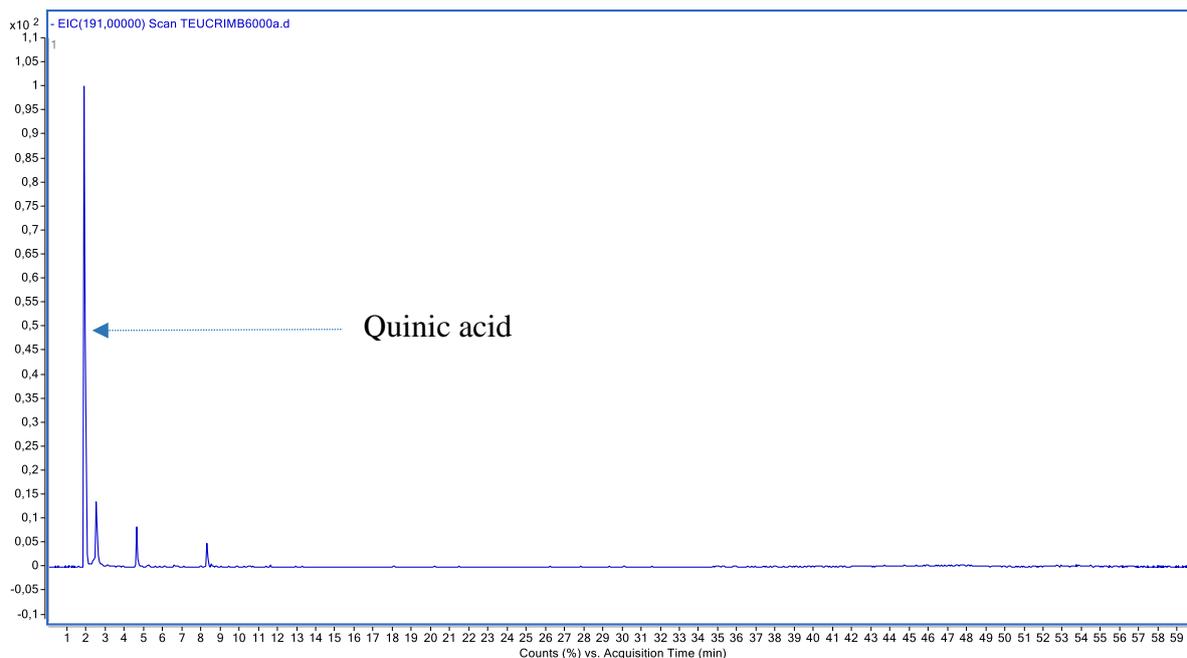


Figure 15 : Chromatogramme du produit 2.

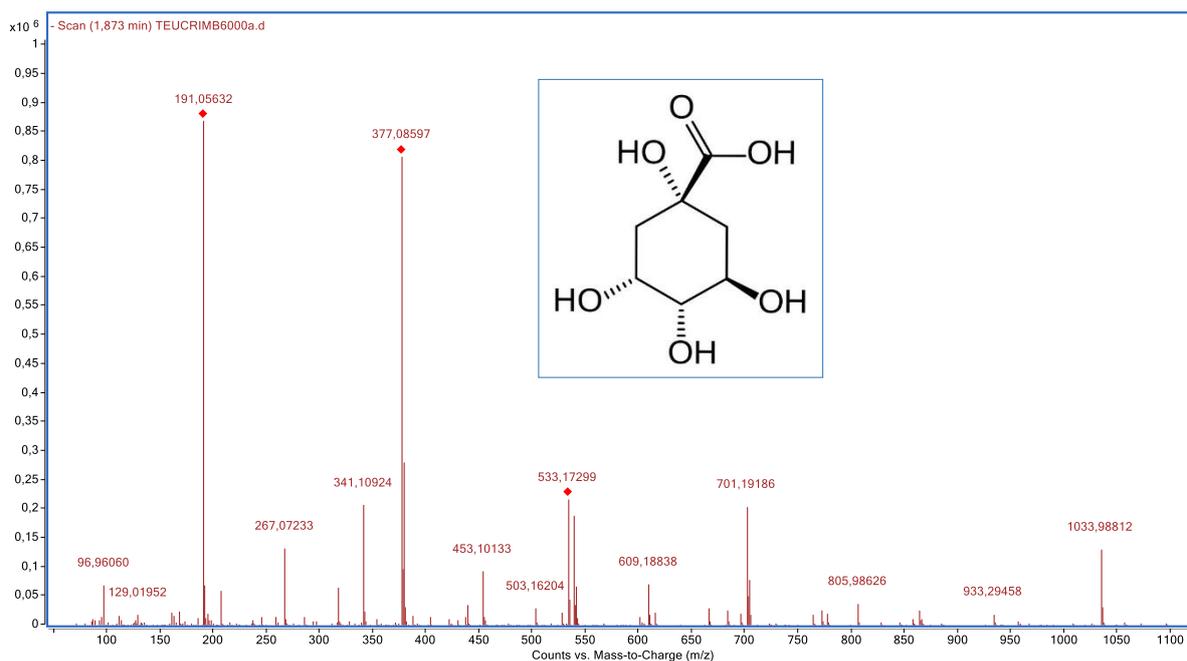
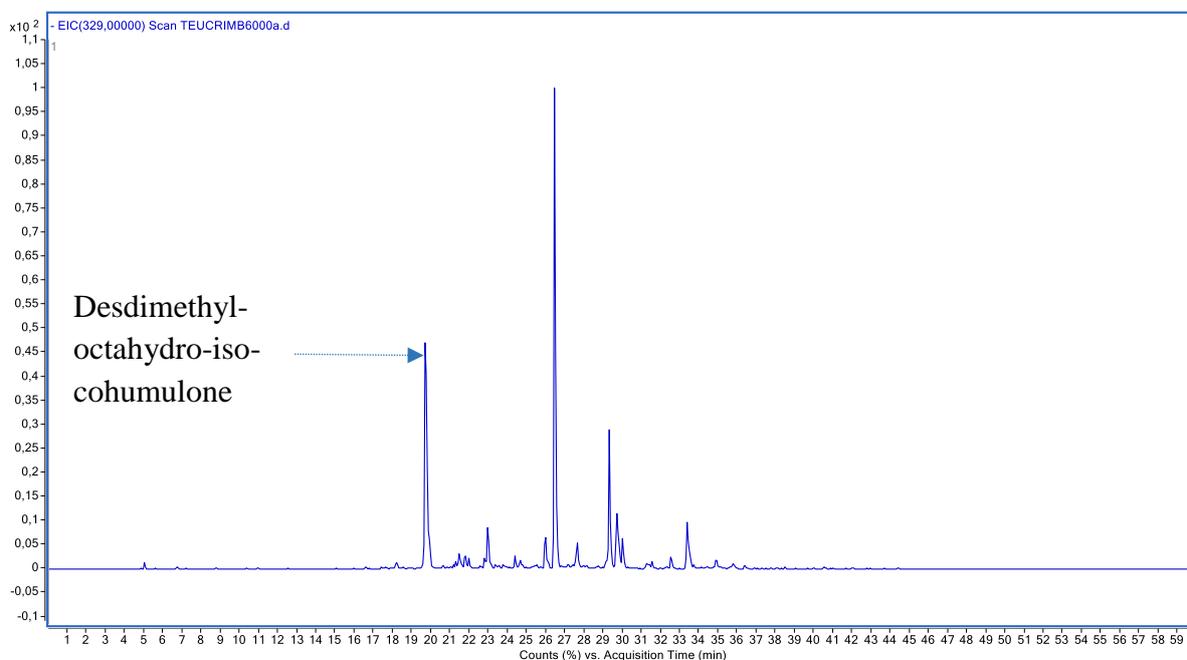
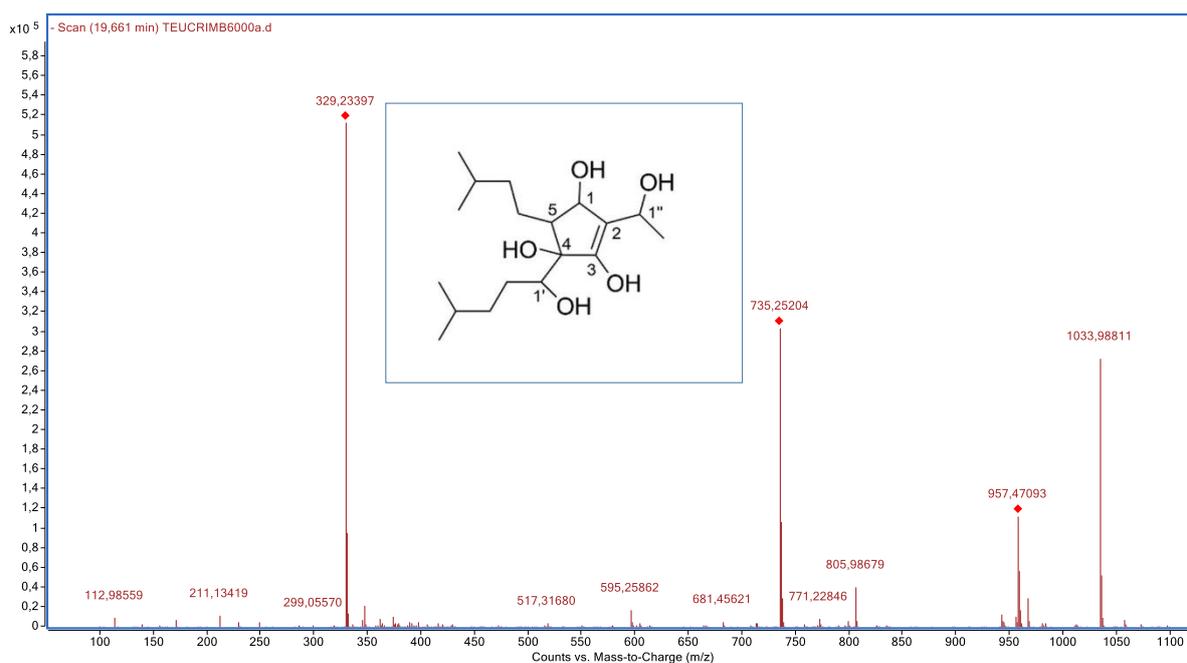


Figure 16 : Spectre de masse du produit 2.

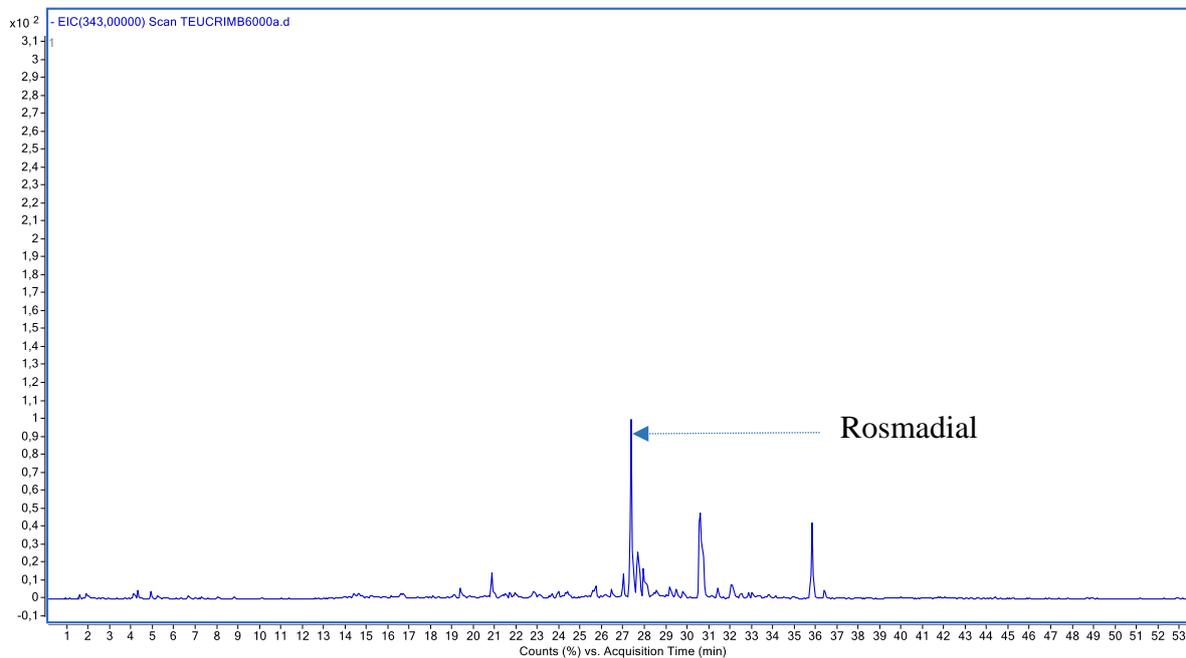
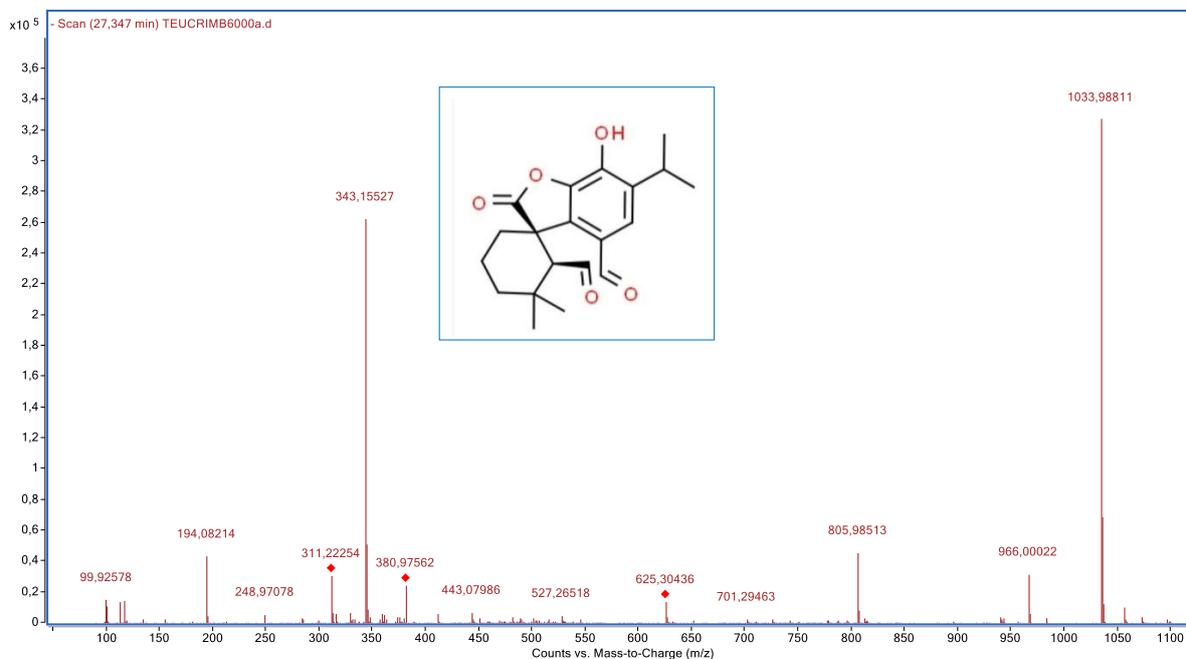
■ Identification de produit 3 :

Le pic qui apparaît à un temps de rétention de 19,661 min avec $m/z = 329,2340$ et les fragments majoritaires : 211,1342(100%) et 229,1449(40,58%), a été identifié au Desdimethyl-octahydro-iso-cohumulone de formule brute $C_{18}H_{34}O_5$.

**Figure 17 :** Chromatogramme du produit 3.**Figure 18 :** Spectre de masse du produit 3.

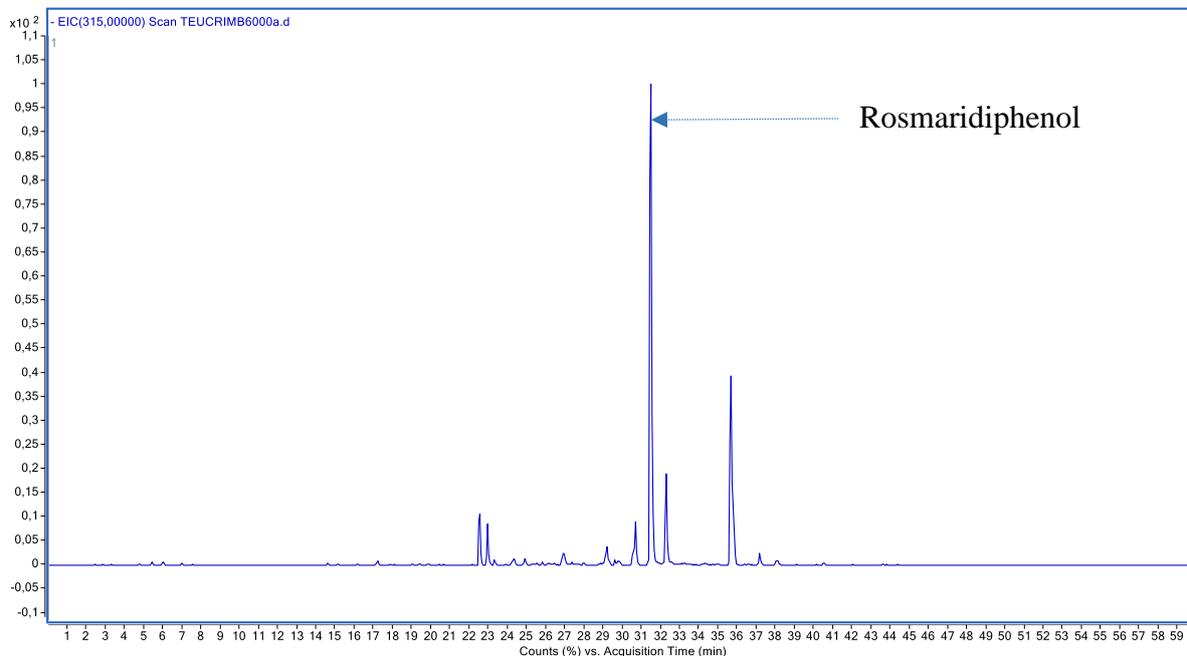
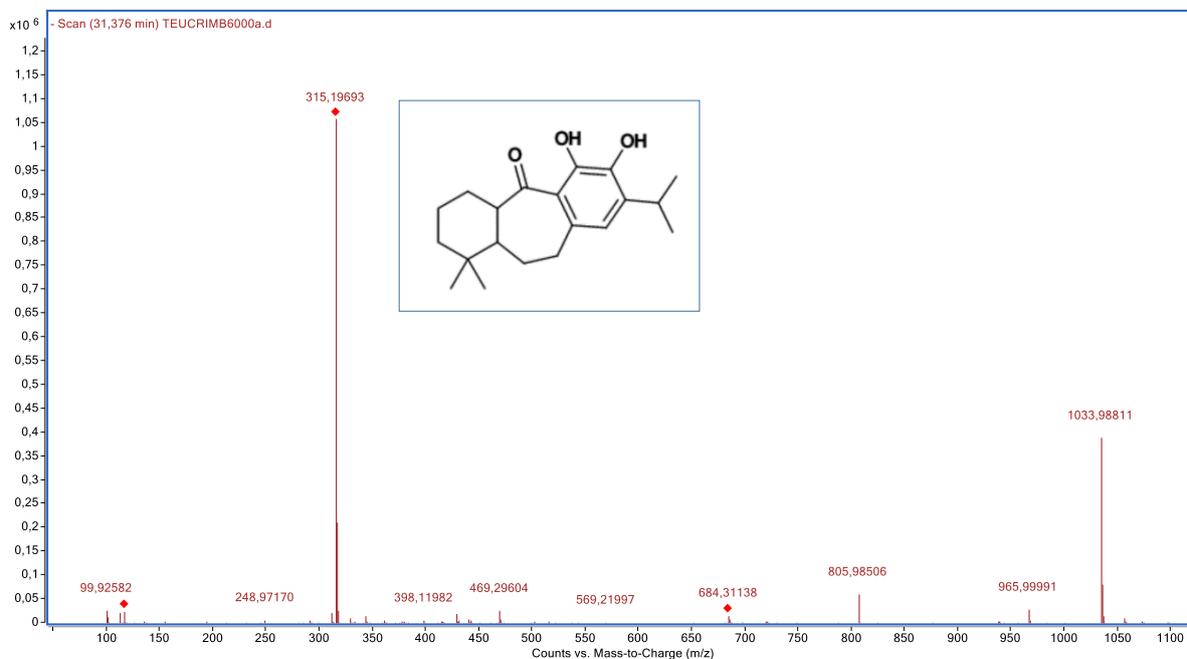
Identification de produit 4 :

Le pic qui apparaît à un temps de rétention de 27,347 min avec $m/z = 343,1552$ et les fragments majoritaires : 299,1667(27,67%) et 301,1815(100%) a été identifié au Rosmadiol de formule brute $C_{20}H_{24}O_5$.

**Figure 19 :** Chromatogramme du produit 4.**Figure 20 :** Spectre de masse du produit 4.

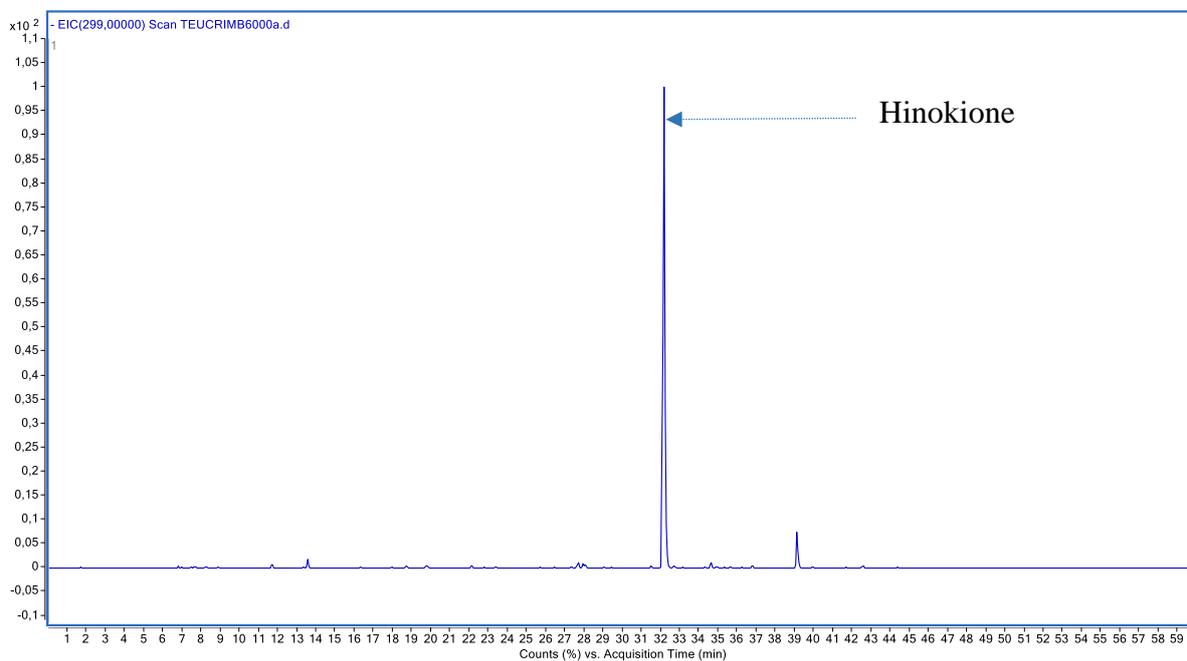
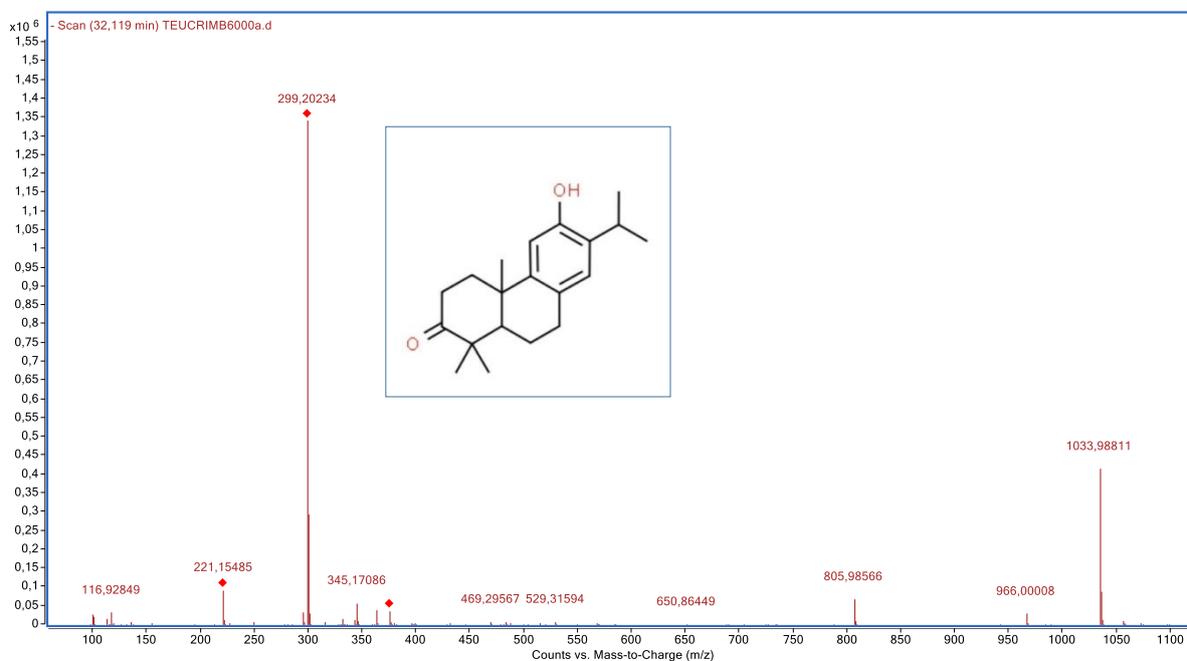
Identification de produit 5 :

Le pic qui apparaît à un temps de rétention 31,376 min avec $m/z = 315,1969$ et le fragment : 315,1966(100%), a été identifié au Rosmaridiphenol isomère 2 de formule brute $C_{20}H_{28}O_3$.

**Figure 21 :** Chromatogramme du produit 5.**Figure 22 :** Spectre de masse du produit 5.

Identification de produit 6 :

Le pic qui apparaît à un temps de rétention de 32,119 min avec $m/z = 299,2023$ et le fragment : 299,202(100%), a été identifié au Hinokione de formule brute $C_{20}H_{28}O_2$.

**Figure 23 :** Chromatogramme du produit 6.**Figure 24 :** Spectre de masse du produit 6.

1.3 Discussion

L'identification des composés contenus dans l'extrait analysé a été basée sur des comparaisons de masse précise [M -H] des ions pseudo moléculaire, de leurs fragmentations, et de leurs temps de rétention, avec ceux trouvés en accord dans la littérature.

L'analyse CPL/SM de l'EHMC de *Teucrium polium geyrii* a permis d'identifier six (6) composés dont :

- **un oligoside** : D-Stachyose.
- **un composé phénolique** : Quinic acid.
- **trois diterpènes** : Rosmadial – Rosmaridiphenol – Hinokione.
- **un composé** : Desdimethyl-octahydro-iso- cohumulone

Tableau 8 : Composés de l'extrait butanolique identifiés par CPL/SM.

composé	Rt (min)	Formule moléculaire	m/z expérimen- tale	m/z calculée	erreur	Fragments majeurs	Référence
D-Stachyose	1,749	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	665,2152	665,21	-0,71	179,0561(59,44%) 341,1087(22,41%)	[67]
Quinic acid	1,873	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0563	191,0561	-1,09	85,0298 (100%) 93,0349(44,44%)	[68]
Desdimethyl- octahydro-iso- cohumulone	19,661	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2340	329,2333	-1,69	211,1342(100%) 229,1449(40,58%)	[68]
Rosmadial	27,347	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	343,1552	343,1551	-1,32	299,1667(27,67%) 301,1815(100%)	[68]
Rosmaridiphen- ol isomère 1	31,376	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	315,1969	315,1966	-1,05	315,1966(100%)	[68]
Hinokione	32,119	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	299,2023	299,2017	-1,92	299,202(100%)	[68]

2. Activités biologiques

L'activité biologique de *Teucrium polium geyrii* a été réalisée par l'évaluation in vitro des activités antioxydantes, antidiabétique et antibactérienne.

2.1 Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes

Les résultats d'estimation du contenu phénolique et la teneur en flavonoïdes de la plante *Teucrium polium geyrii* sont présentés dans le tableau :

Tableau 9 : Le contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes des extraits de *T. polium geyrii*.

Extraits	Total Phenolique ($\mu\text{g GAE/mg}$)	Total Flavonoides ($\mu\text{g QE/mg}$)
EHMC	197,23 \pm 7,00	122,77 \pm 5,65
ECHL	38,60 \pm 5,42	45,33 \pm 7,77
EHMS	130,27 \pm 16,51	72,77 \pm 10,13
EHMM	68,60 \pm 8,34	47,22 \pm 13,19

▪ Teneur en composés phénoliques :

La détermination quantitative des polyphénols dans les extraits de *Teucrium polium geyrii* a été réalisée par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu. L'absorbance a été déterminée à une longueur d'onde de 765 nm. La teneur en polyphénols totaux est exprimée en μg équivalent d'acide gallique par mg du poids de l'extrait ($\mu\text{g EAG / mg}$ d'extrait), en utilisant l'équation suivante de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide gallique :

$$y = 0,0026x + 0,1824 \text{ avec } R^2 = 0,9738$$

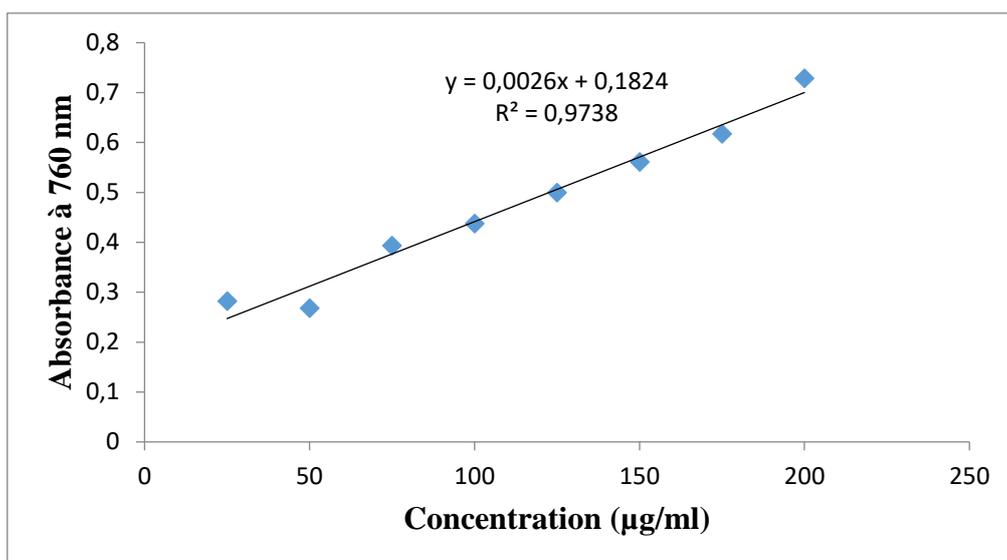


Figure 25 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Les résultats du dosage colorimétrique des composés phénoliques totaux sont présentés dans la (figure) et le (tableau).

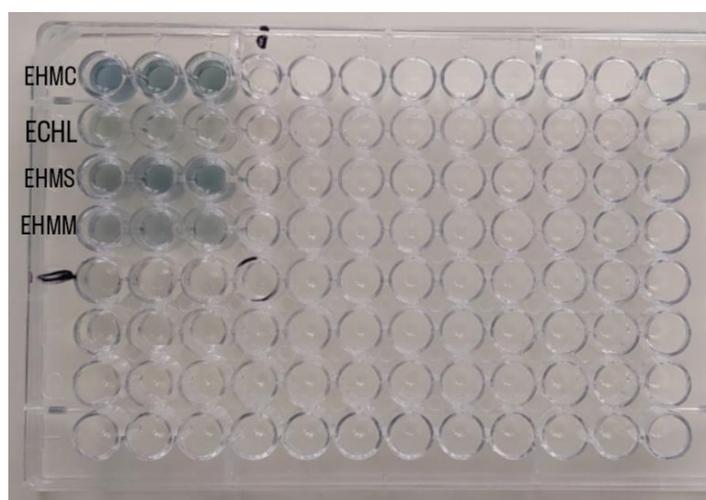


Figure 26 : Plaque de dosage TPC des extraits de *T. polium geyrii*.

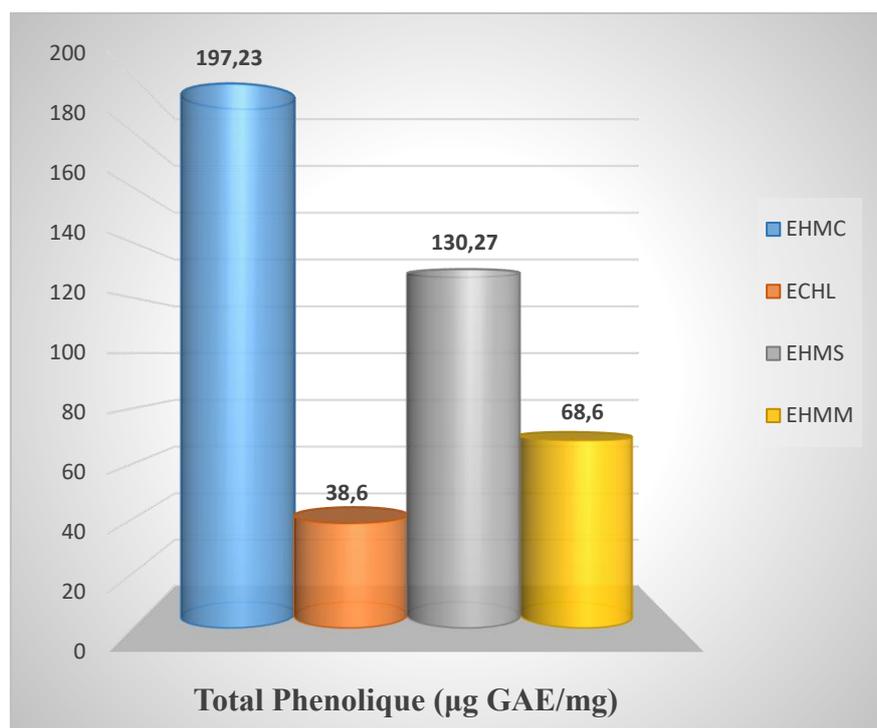


Figure 27 : Evaluation des polyphénols totaux des extraits de *T.polium geyrii*.

Les résultats montrent que l'EHMC et EHMS sont les extraits les plus riches en polyphénols avec une teneur de $197,23 \pm 7,00$ µg EAG/mg d'extrait et de $130,27 \pm 16,51$ µg EAG/mg, suivi par les extraits EHMM et ECHL ($68,60 \pm 8,34$ et $38,60 \pm 5,42$ µg EAG/mg d'extrait respectivement), ce dernier est le plus pauvre en polyphénols.

▪ **Teneur en flavonoïdes :**

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits de *Teucrium polium geyrii* a été réalisé par la méthode de nitrate d'aluminium $Al(NO_3)_2$. L'absorbance a été déterminée à une longueur d'onde de 415 nm. La teneur des flavonoïdes a été rapportée en µg équivalent de la quercétine par mg du poids de l'extrait (µg EQ / mg d'extrait), en utilisant l'équation suivante de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par la quercétine :

$$y = 0,003x \text{ avec } R^2 = 0,9316$$

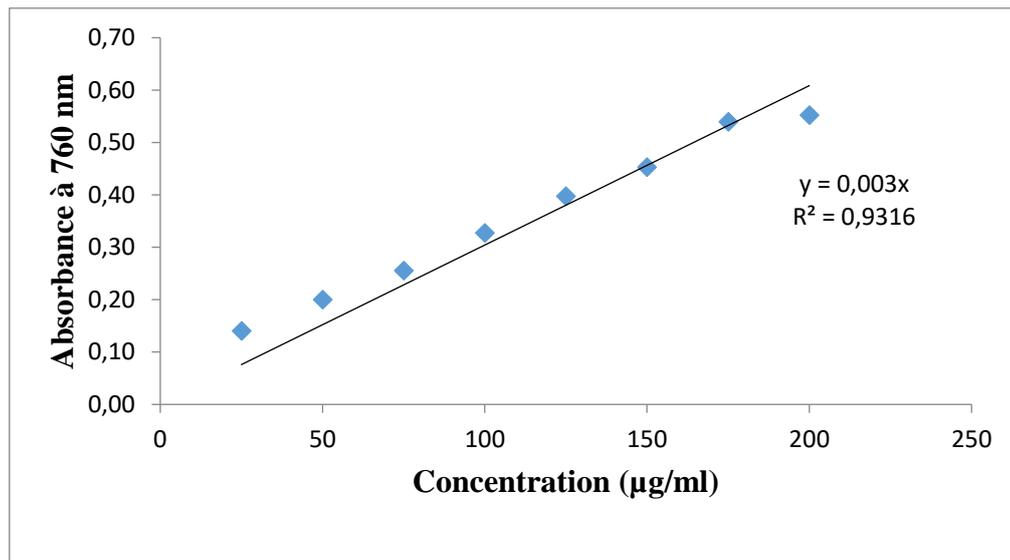


Figure 28 : Courbe d'étalonnage de quercétine.

Les résultats sont illustrés dans la (figure) et le (tableau).

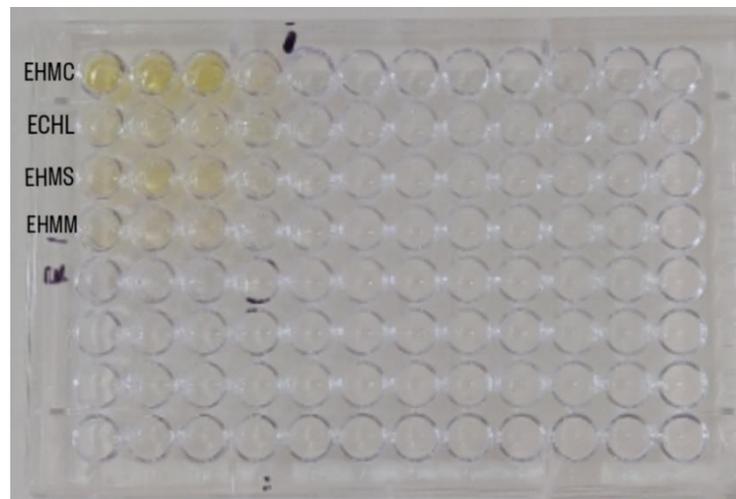


Figure 29 : Plaque de dosage TFC des extraits de *T.polium geyrii*.

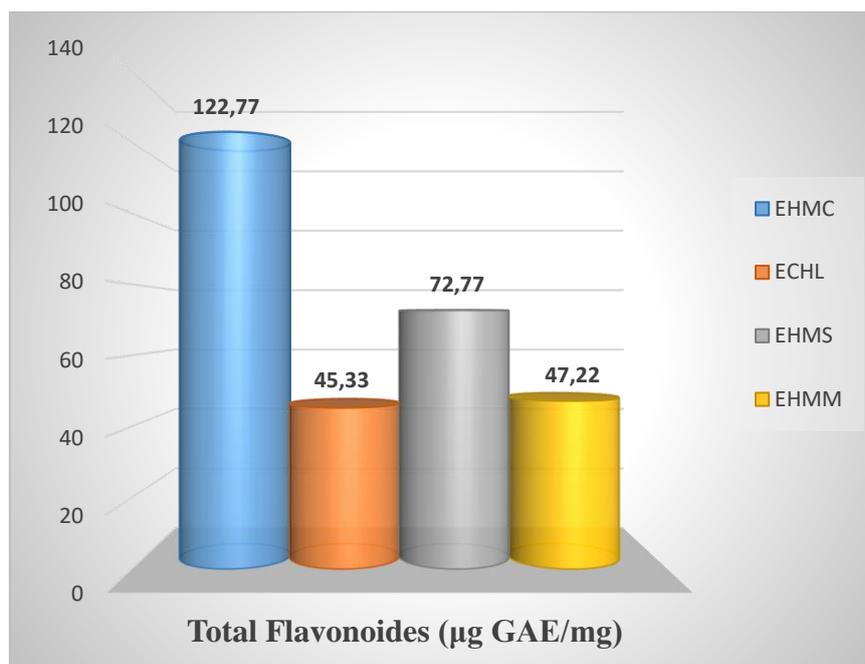


Figure 30 : Evaluation des flavonoïdes totaux des extraits de *T.polium geyrii*.

D'après les résultats, l'EHMC est le plus riche en flavonoïdes avec $122,77 \pm 5,65$, ensuite l'extrait EHMS avec une teneur de $72,77 \pm 10,13$ µg EQ/mg d'extrait, suivi par les extraits EHMM et ECHL qui ont montré les teneurs les plus faibles avec $47,22 \pm 13,19$ et $45,33 \pm 7,77$ µg EQ/mg d'extrait, respectivement.

2.2 Activités antioxydants

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la plante *teucrium polium geyrii* a été réalisée par l'utilisation de quatre méthodes différentes.

2.2.1 Activité antiradicalaire au DPPH

Dans ce test, l'activité antiradicalaire des différents extraits de *teucrium polium geyrii* a été évaluée par la mesure des concentrations inhibitrices à 50 % (CI_{50}) ; en se basant sur la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, par rapport à deux antioxydants standards (Trolox, Acide ascorbique).

Les résultats sont présentés ci-dessous :

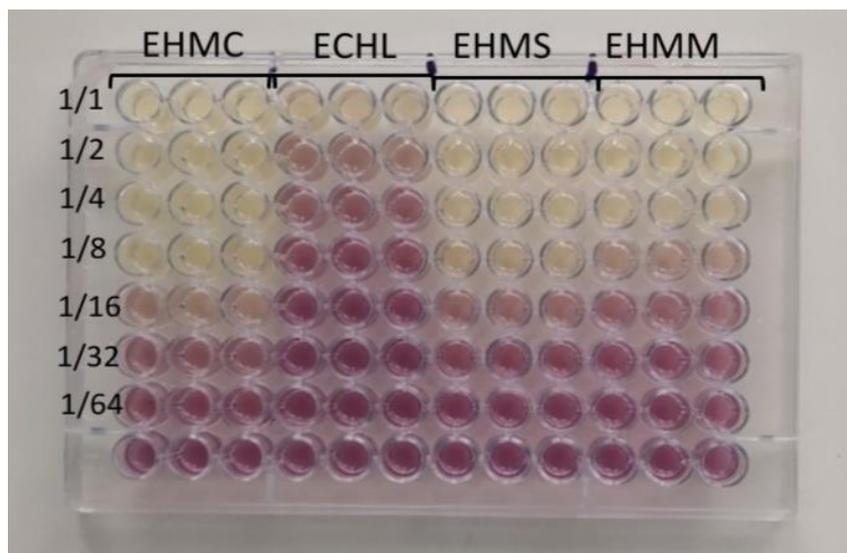


Figure 31 : dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) des extraits de *T.polium geyrii*.

Tableau 10 : Inhibition du radical DPPH par les extraits de *T.polium geyrii*.

	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400µg	800µg	IC ₅₀ (µ/ml)
EHMC	13,21±1,42	26,14±0,48	52,95±0,87	80,65±0,24	85,07±0,81	86,49±1,69	Sat	46,27±1,21
ECHL	NA	1,59±2,92	6,01±0,88	8,63±2,57	18,68±1,61	28,45±3,56	Sat	>800
EHMS	10,79±1,73	18,31±1,66	37,60±0,87	66,72±0,27	85,91±1,64	Sat	Sat	72,65±1,05
EHMM	9,95±0,83	15,26±0,51	30,82±1,05	51,90±1,67	85,33±2,65	85,81±0,69	Sat	94,61±2,78
	0.78125 µg	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	IC ₅₀ (µ/ml)
Trolox	6.42±0.91	13.33±2.14	30.19±0.67	61.48±2.98	87.16±0.28	88.46±0.11	87.72±0.47	5,12±0.21
Acide ascorbique	0.31±1.02	12.90±0.28	29.69±0.39	76.67±0.37	84.94±0.84	87.78±0.49	86.36±0.21	4,39±0.01

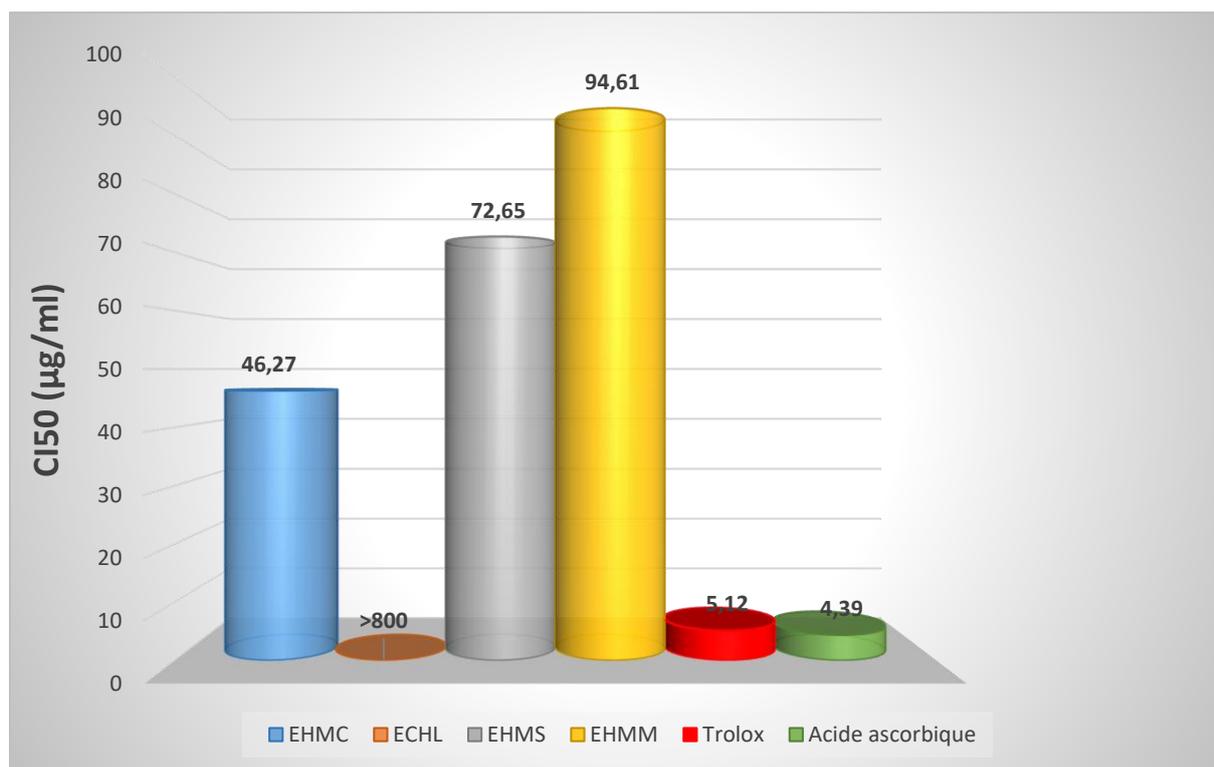


Figure 32 : Les valeurs des CI₅₀ du test DPPH pour les standards et les extraits de *T. polium geyrii*.

L'EHMC a présenté la meilleure activité antiradicalaire par rapport aux autres extraits (CI₅₀ : 46,27±1,21µg/ml), cette activité est neuf fois plus faible que le Trolox (CI₅₀ : 5,12±0,21µg/ml) et dix fois plus faible que l'acide ascorbique (CI₅₀ : 4,39±0,01µg/ml), suivi directement par les extraits EHMS et EHMM avec des valeurs de CI₅₀ égales aux (CI₅₀ : 72,65±1,05 et CI₅₀ : 94,61±2,78 respectivement), tandis que l'extrait ECHL a présenté la plus faible activité avec une CI₅₀ (>800 µg/ml).

Ces résultats sont en total accord avec la richesse d'extrait EHMC, en : TPC (197,23±7,00), TFC (122,77±5,65) respectivement.

2.2.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS^{•+}

Dans ce test, l'addition d'un antioxydant à une solution de radical cation ABTS^{•+} de couleur bleu/vert entraîne sa réduction et la décoloration de la solution. Cette activité est évaluée en mesurant l'absorbance à 734 nm et en déterminant la concentration inhibitrice à 50 % (CI₅₀) de différents extraits en comparaison avec les standards (Trolox, Acide ascorbique).

Les résultats sont les suivantes :

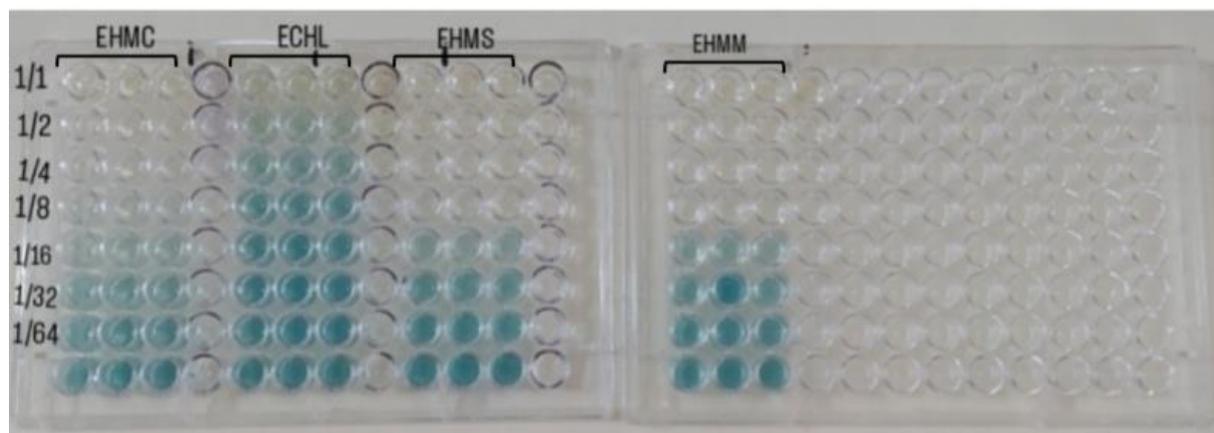


Figure 33 : Activité du piégeage du radical cation ABTS⁺ des extraits de *T. polium geyrii*.

Tableau 11 : Inhibition du cation radical ABTS⁺ par les extraits de *T. polium geyrii*.

	12.5	25	50	100	200	400	800	IC ₅₀ (µg/ml)
EHMC	26,08±0,62	43,54±1,08	66,08±1,24	77,35±1,53	84,25±0,94	86,37±1,23	90,74±0,62	33,75±0,62
ECHL	7,08±2,55	8,97±1,33	19,00±2,51	30,62±0,94	46,02±1,08	61,59±1,59	72,68±1,51	273,11±9,06
EHMS	18,88±0,80	38,11±1,51	63,66±3,32	89,79±0,80	92,21±0,18	Sat	Sat	37,41±3,04
EHMM	15,52±0,84	31,98±0,10	54,45±1,99	86,67±0,62	90,50±0,45	91,09±0,84	92,15±0,45	47,59±0,92
	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	IC ₅₀ (µg/ml)
Trolox	14.74±0.37	26.15±0.65	51.70±1.51	89.72±0.67	92.89±0.19	92.89±0.19	91.84±1.19	3,21±0.06
Acide ascorbique	13.43±0.82	28.76±0.67	52.94±0.94	93.21±0.11	93.08±0.19	92.40±0.88	92.96±0.11	3,04±0.05

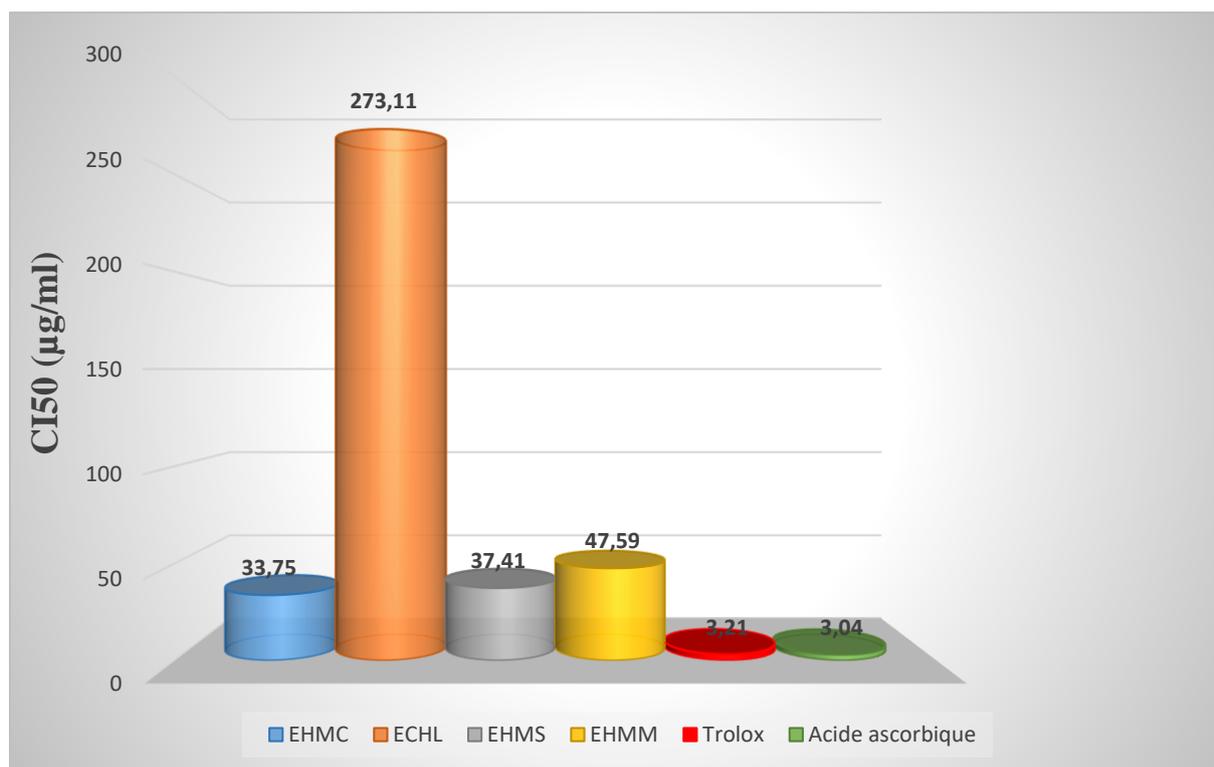


Figure 34 : Les valeurs des CI₅₀ du test ABTS pour les standards et les extraits de *T.polium geyrii*.

Les résultats de ce test ont montré que les valeurs d'IC₅₀ varient d'un extrait à un autre. Dont L'extrait EHMC (CI₅₀ : 33,75±0,62) représente la meilleure capacité de piégeage des radicaux libres ABTS+. Cette activité est suivie par l'extrait EHMS (CI₅₀ : 37,41±3,04). L'activité représentée par l'extrait EHMM (CI₅₀ : 47,59±0,92) est modérée en comparaison avec les deux standards utilisés (CI₅₀ : 3.21±0.06 et CI₅₀ : 3.04±0.05 respectivement). Tandis que L'extrait ECHL (CI₅₀ : 273,11±9,06) représente une activité d'environ sept fois plus faible par rapport aux autres extraits de la même plante et 17 fois plus faible par rapport aux standards.

Ce bon résultat est en total accord avec le test précédent et la richesse des deux extraits EHMC et EHMS en : TPC (197,23±7,00 et 130,27±16,51) et en TFC (122,77±5,65 et 72,77±10,13).

2.2.4 Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Le pouvoir antioxydant dans ce test est déterminé par la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe⁺³) de couleur initiale jaune en fer ferreux (Fe⁺²) de couleur bleu verte qui a un maximum d'absorbance à 700 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures et le tableau ci-dessous :



Figure 35 : pouvoir réducteur (FRAP) des extraits de *T.polium geyrii*.

Tableau 12 : Absorbance du pouvoir réducteur par les extraits de *T.polium geyrii*.

	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	A_{0,5} (µg/ml)
EHMC	0,12±0,03	0,18±0,01	0,26±0,03	0,39±0,02	0,48±0,00	0,55±0,03	0,78±0,17	77,37±3,32
ECHL	0,09±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,11±0,02	0,15±0,00	0,25±0,02	0,34±0,02	>200
EHMS	0,12±0,00	0,15±0,01	0,21±0,01	0,33±0,04	0,42±0,08	0,42±0,07	0,92±0,07	116,71±10,39
EHMM	0,13±0,01	0,14±0,04	0,22±0,00	0,34±0,01	0,45±0,03	0,79±0,02	1,34±0,25	59,42±1,73
	0.0976	0.195	0.390	0.781	1.562	3.125	6.25	A_{0,5} (µg/ml)
Trolox	0.07±0.00	0.08±0.00	0.09±0.01	0.13±0.00	0.19±0.02	0.28±0.05	0.60±0.04	5,25±0.20
Acide ascorbique	0.07±0.00	0.09±0.01	0.12±0.01	0.17±0.01	0.25±0.02	0.47±0.03	0.79±0.09	3,62±0.29

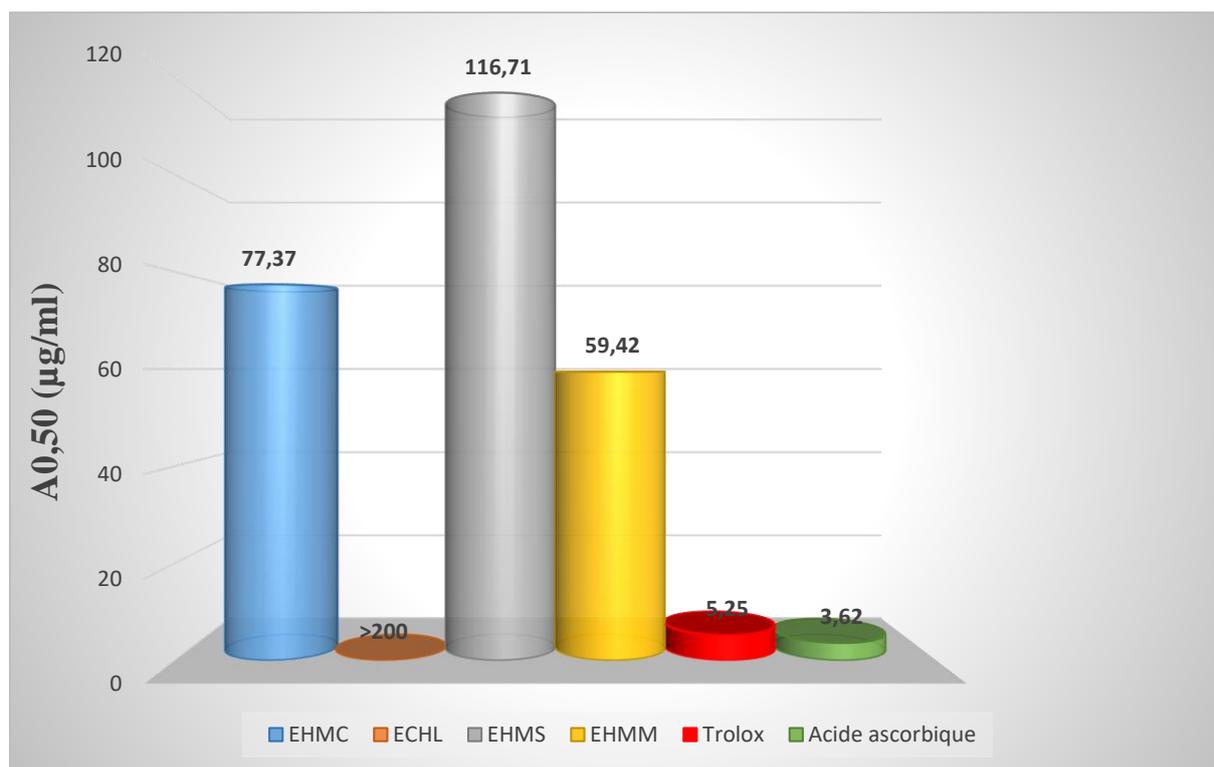


Figure 36 : Les valeurs des $A_{0,50}$ du test pouvoir réducteur pour les standards et les extraits de *T.polium geyrii*.

Les résultats de ce test ont montré que l'extrait EHMM ($A_{0,50}$: $59,42 \pm 1,73$) représente l'effet antioxydant le plus important par rapport à l'ensemble des extraits de la même plante, suivie par l'extrait EHMC ($A_{0,50}$: $77,37 \pm 3,32$) qui représente un faible Effet. L'activité représentée par l'extrait EHMS ($A_{0,50}$: $116,71 \pm 10,39$) est loin d'être comparée avec les standards le Trolox et l'acide ascorbique ($A_{0,50}$: $5,25 \pm 0,20$ et $A_{0,50}$: $3,62 \pm 0,29$ respectivement), tandis que l'extrait ECHL représente la plus faible activité ($A_{0,50}$: >200).

2.2.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phénantroline

La réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} par un composé antioxydant conduit à la formation d'un complexe stable Fe^{+2} - phénantroline de couleur rouge-orangé. La capacité de réduction est déterminée par la mesure des valeurs de $A_{0,50}$ des extraits et celles des standards (Trolox, Acide ascorbique).

Les résultats sont les suivantes :



Figure 37 : Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} - phénantroline par les extraits de *T.polium geyrii*.

Tableau 13 : Absorbance du complexe Fe^{+2} - phénantroline des extraits de *T.polium geyrii*.

	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	$A_{0,5}$ ($\mu\text{g/ml}$)
EHMC	0,17±0,00	0,17±0,01	0,18±0,01	0,19±0,01	0,22±0,01	0,26±0,01	0,35±0,00	>200
ECHL	0,18±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01	0,19±0,00	0,21±0,00	0,25±0,00	>200
EHMS	NA	NA	NA	0,18±0,00	0,19±0,00	0,21±0,01	0,24±0,00	>200
EHMM	NA	NA	NA	0,18±0,01	0,19±0,01	0,21±0,01	0,24±0,03	>200
	0.0976	0.195	0.390	0.781	1.562	3.125	6.25	$A_{0,5}$ ($\mu\text{g/ml}$)
Trolox	0.25±0.01	0.24±0.01	0.26±0.01	0.26±0.00	0.32±0.01	0.38±0.01	0.56±0.02	5,21±0.27
Acide ascorbique	0.26±0.01	0.29±0.00	0.29±0.02	0.31±0.01	0.37±0.01	0.50±0.00	0.80±0.00	3,08±0.02

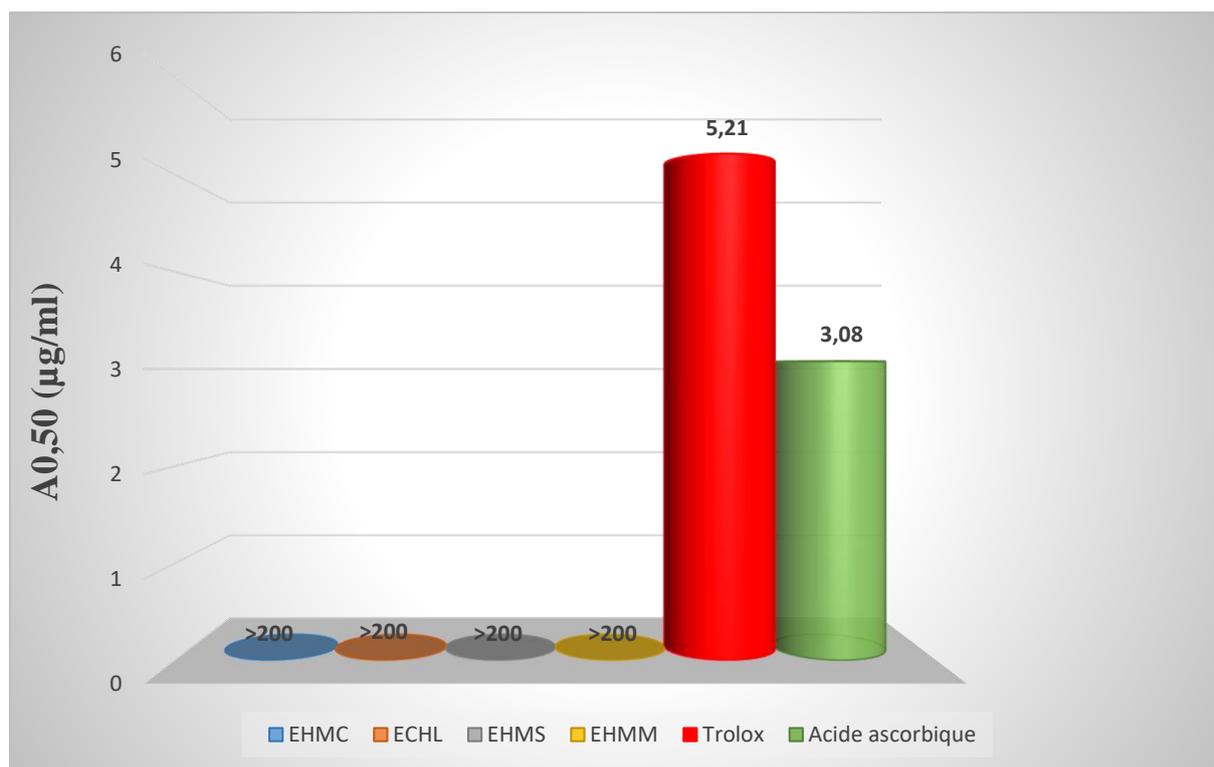


Figure 38 : Les valeurs des $A_{0,50}$ du test Fe^{2+} -phénantroline pour les standards et les extraits de *T.polium geyrii*.

Ce test a révélé que tous les extraits testés présentent une très faible activité donc un très faible pouvoir réducteur du fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} en comparaison avec les standards Trolox et l'acide ascorbique ($A_{0,50}$: 5.21 ± 0.27 et $A_{0,50}$: 3.08 ± 0.02 respectivement).

Les capacités antioxydantes des extraits végétaux dépendent non seulement de la composition de l'extrait mais aussi des conditions du test utilisé. Donc les résultats de ce test pourraient être justifiés par l'absence des composés donneurs d'électrons, puisque la méthode du pouvoir réducteur est basée sur le transfert d'électrons (ET) qui mesure la capacité d'un antioxydant à réduire un oxydant, qui change de couleur lorsqu'il est réduit.

2.3 Activité enzymatique

2.3.1 Activité antidiabétique via l'inhibition de l'alpha-amylase



Figure 39 : Activité inhibitrice d'alpha-amylase des extraits de *T. polium geyrii*.

Tableau 14 : Inhibition de l'α-amylase par les extraits de *T. polium geyrii*.

Extraits	% d'inhibition							IC ₅₀ (µg/ml)
	6.25	12.5	25	50	100	200	400	
EHMC	NA	2,47±0,15	3,21±0,13	3,69±0,08	6,34±0,53	8,16±0,99	16,79±2,25	>400
ECHL	NA	NA	NA	NA	NA	7,45±1,56	11,94±2,78	>400
EHMS	NA	NA	NA	NA	2,28±0,80	2,77±0,21	4,87±0,24	>400
EHMM	NA	NA	NA	3,57±0,60	4,00±1,03	5,59±0,35	7,69±1,81	>400
	62,5	125	250	500	1000	2000	4000	IC ₅₀ (µg/ml)
Acarbose	7,76±0,17	8,08±0,30	9,46±0,11	10,70±0,96	31,81±2,89	37,21±3,54	53,05±1,59	3650,93±10,70

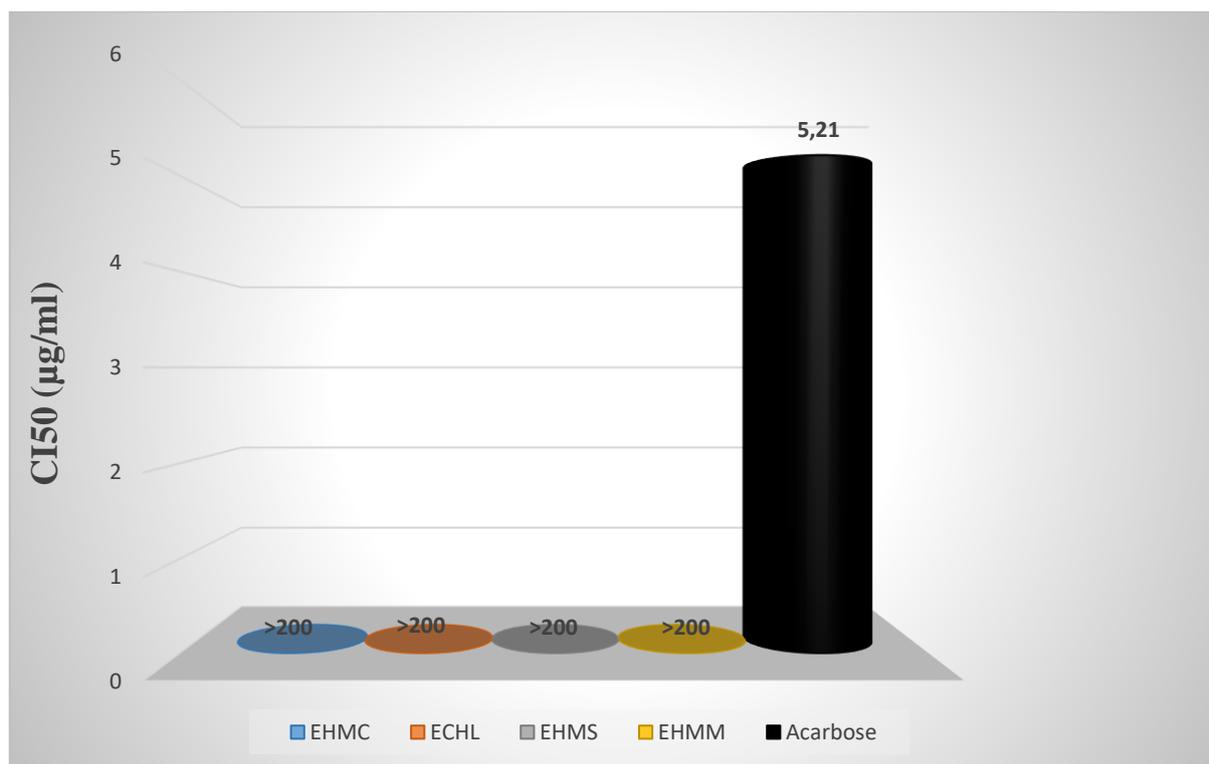


Figure 40 : Les valeurs des CI₅₀ du test d'inhibition de l' α -amylase pour le standard et les extraits de *T.polium geyrii*.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, on constate que tous les extraits de *teucrium polium geyrii* ont manifesté une activité inhibitrice d'alpha amylase très faible (CI₅₀ >400 µg/ml) comparé à celui du standard l'acarbose (CI₅₀ = 3650,93±10,70µg/ml).

2.4 Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait EHMC sur les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Escherichia coli* (ATCC 25922) a été réalisée par la technique d'aromatogramme. Les volumes des extraits déposés sur les disques furent de 1 à 10 µl, Le témoin négatif utilisé fut l'eau distillée stérile et le DMSO avec la portion 10 :90. Ainsi que l'antibiotique utilisé est Cefotaxime.

Les figures suivantes regroupent les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait EHMC :

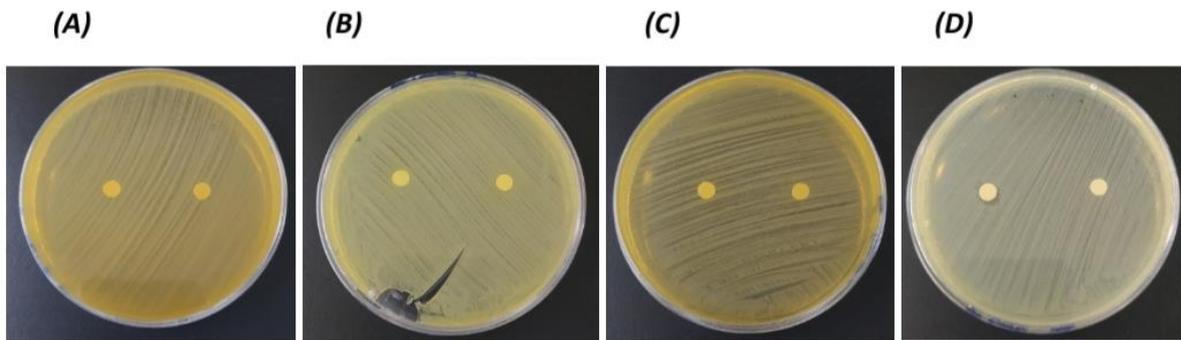


Figure 41 : Effet inhibiteur de l'extrait EHMC sur la souche bactérienne *Escherichia coli*.

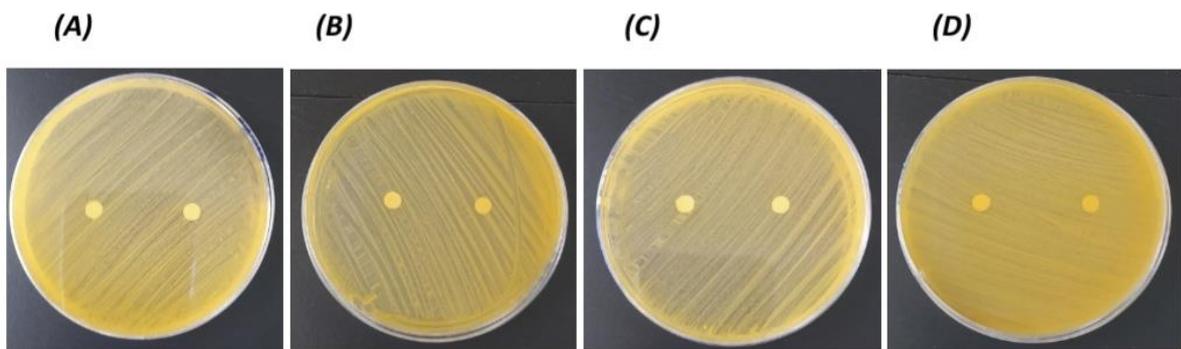


Figure 42 : Effet inhibiteur de l'extrait EHMC sur la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*.

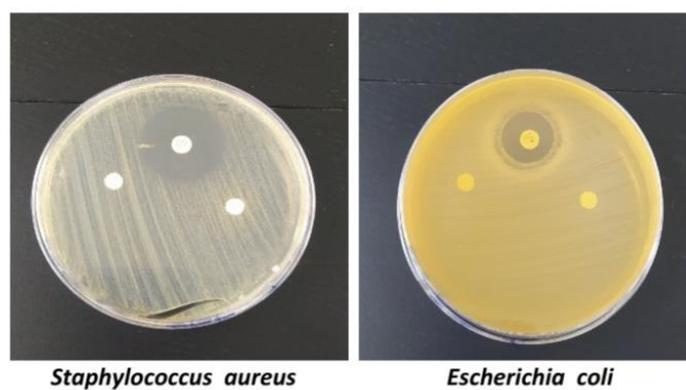


Figure 43 : Effet inhibiteur de l'antibiotique et le témoin négatif utilisé sur les deux souches bactériennes.

D'après les résultats obtenus, les souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli* n'ont montré aucune sensibilité vis-à-vis de toutes les solutions de différentes concentrations de l'extrait testé et le témoin négatif et aucune zone d'inhibition n'a été détectée. Seul l'antibiotique Cefotaxime a pu avoir un effet remarquable sur *S.aureus* et *E.coli* représenté par une zone d'inhibition (25 mm et 19 mm respectivement).

Conclusion
&
Perspectives

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à étudier une plante endémique à l'Algérie « *Teucrium polium gerri* » très rarement étudiée ce qui donne à notre travail de la nouveauté et de l'originalité.

Afin de Confirmer l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle dans certaines régions algériennes, une estimation qualitative des métabolites secondaires (polyphénols et flavonoïdes) et Des tests biologiques in vitro pour l'évaluation de l'activité antioxydante, enzymatique, et antimicrobienne ont été réalisés.

L'analyse CPL/SM de l'extrait hydro-méthanolique de *Teucrium polium gerri* nous a permis d'identifier six composés :

- **un oligoside** : D-Stachyose.
- **un composé phénolique** : Quinic acid.
- **trois diterpènes** : Rosmadial – Rosmaridiphenol – Hinokione.
- **un composé** : Desdimethyl-octahydro-iso- cohumulone

L'utilisation de plusieurs méthodes d'extraction a montré clairement des teneurs différentes en molécules bioactives. Dont l'extrait EHMC représente une richesse en polyphénols et flavonoïdes.

En parallèle, l'activité antioxydantes a été testée par quatre méthodes : Activité anti radicalaire au DPPH, Activité du piégeage du cation radical ABTS, Activité du pouvoir réducteur FRAP, et activité de réduction par la formation du complexe Fe² phenanthroline.

Les résultats obtenus démontrent que l'activité antiradicalaire de l'extrait EHMC est la plus intéressante en comparaison avec les autres extraits.

L'activité enzymatique, des extraits de la même plante représente un très faible Effet inhibiteur de l'enzyme alpha amylase.

Concernant l'activité antibactérienne de l'extrait EHMC sur les deux souches bactériennes *Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*, aucune zone d'inhibition n'a été observée. Ce qui montre une absence d'activité antibactérienne de nos extraits vis-à-vis des deux souches bactériennes testées.

Comme perspectives, nous envisageons d'utiliser ces résultats comme un point de départ de recherche de nouvelles molécules biologiquement actives. Il serait intéressant de mener :

- l'identification par la CPL/SM aux modes d'ionisation négative et positive de tous les pics de l'extrait hydro-méthanolique.
- la quantification et la caractérisation des métabolites secondaires de la plante.
- l'identification des substances responsables des activités biologiques étudiées.
- la réalisation d'autres activités biologiques.

Références bibliographiques

- [1] H. Lahsissene, A. Kahouadji, M. Tijane, and S. Hseini, "Catalogue Des Plantes Medicinales Utilisées Dans La Région De Zaër (Maroc Occidental)," *Lejeunia, Rev. Bot.*, vol. 186, pp. 1–27, 2009.
- [2] M. Sharifi-Rad, P. Pohl, F. Epifano, G. Zengin, N. Jaradat, and M. Messaoudi, "Teucrium polium (L.): Phytochemical Screening and Biological Activities at Different Phenological Stages," *Molecules*, vol. 27, no. 5, 2022.
- [3] S. D. Dibong, E. Mpondo Mpondo, A. Ngoye, M. F. Kwin, and J. L. Betti, "Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun," *J. Appl. Biosci.*, vol. 37, pp. 2496–2507, 2011.
- [4] S. Sarr, A. Fall, R. Gueye, A. Diop, K. Diatta, N. Diop, B. Ndiaye, and Y. Diop, "Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenaceae)," *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, vol. 9, no. 3, p. 1263, 2015.
- [5] S. O. Sarr, A. D. Fall, R. Gueye, A. Diop, B. Sene, K. Diatta, B. Ndiaye, and Y. M. Diop, "Evaluation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Aphania senegalensis* (Sapindaceae) et de *Saba senegalensis* (Apocynaceae)," *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, vol. 9, no. 6, p. 2676, 2016.
- [6] N. Fertout-Mouri, A. Latreche, Z. Mehdadi, and Z. Bengherraz, "Activité antibactérienne de quatre extraits de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale)," *Bull. la Société R. des Sci. Liège*, pp. 253–262, 2016.
- [7] M. Yamina, B. Fatma Zohra, and C. Cherifa, "Évaluation De L'Activité Antibacterienne De L'Huile Essentielle Et De L'Extrait Méthanolique Du Romarin *Rosmarinus Officinalis* L. Evaluation of the Antibacterial Activity of the Essential Oil and the Methanolic Extract of the Rosemary *Rosmarinus Officinalis*," *Rev. Agrobiol.*, vol. 7, no. 1, pp. 363–370, 2017.
- [8] F. Naghibi, M. Mosaddegh, S. M. Motamed, and A. Ghorbani, "Labiatae family in folk medicine in Iran: From ethnobotany to pharmacology," *Iran. J. Pharm. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 63–79, 2005.
- [9] C. Frezza, A. Venditti, M. Serafini, and A. Bianco, *Phytochemistry, Chemotaxonomy, Ethnopharmacology, and Nutraceuticals of Lamiaceae*, 1st ed., vol. 62. Elsevier B.V., 2019.
- [10] A. Carrubba, R. La Torre, and G. Zafiuto, "Exploitation of native Labiatae in Sicily," *Acta Hort.*, vol. 723, pp. 111–116, 2006.
- [11] Y. Maizi, B. Meddah, A. T. T. Meddah, and J. A. G. Hernandez, "Seasonal variation in essential oil content, chemical composition and antioxidant activity of *teucrium polium* L. Growing in mascara (North West of Algeria)," *J. Appl. Biotechnol. Reports*, vol. 6, no. 4, pp. 151–157, 2019.
- [12] N. Djabou, A. Muselli, H. Allali, M. E. A. Dib, B. Tabti, L. Varesi, and J. Costa, "Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L.," *Phytochemistry*, vol. 83, pp. 51–62, 2012.
- [13] M. Amraei, A. Ghorbani, Y. Seifinejad, S. F. Mousavi, M. Mohamadpour, and E. Shirzadpour, "The effect of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* L. On the inflammatory markers and lipid profile in hypercholesterolemic rats," *J. Inflamm. Res.*, vol. 11, pp. 265–272, 2018.

- [14] H. Roukia, H. M. Mahfoud, R. Farah, and O. M. Didi, "Antimicrobial activity of phenolic extract from *Teucrium*," vol. 3, no. 3, pp. 35–38, 2013.
- [15] O. El, H. M. Didi, and H. M. M, "Spécialité : Biochimie Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plante *Teucrium polium geyrii* provenant de la région Tamanrasset," 2009.
- [16] A.-C. Benchelah, H. Bouziane, and M. Maka, "Fleurs du Sahara, arbres et arbustes, voyage au cœur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili," *Phytothérapie*, vol. 2, no. 6, pp. 191–197, 2004.
- [17] M. El Beyrouthy, N. Arnold, and A. Delelis-dusollier, "Morphology of the trichome of *Teucrium* from Lebanon Morphologie du trichome des *Teucrium* du Liban," no. January, 2008.
- [18] G. Özkan, H. Kuleşan, S. Çelik, R. S. Göktürk, and O. Ünal, "Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities," *Food Control*, vol. 18, no. 5, pp. 509–512, 2007.
- [19] D. Ricci, D. Fraternali, L. Giamperi, A. Bucchini, F. Epifano, G. Burini, and M. Curini, "Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae)," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 98, no. 1–2, pp. 195–200, 2005.
- [20] T. Eisner, M. Eisner, D. J. Aneshansley, C. L. Wu, and J. Meinwald, "Chemical defense of the mint plant, *Teucrium marum* (Labiatae)," *Chemoecology*, vol. 10, no. 4, pp. 211–216, 2000.
- [21] F. Sperimentale, F. Farmacia, C. Igiene, F. Scienze, and I. Interfacolta, "ANTIPYRETIC AND ANTIBACTERIAL ACTIONS OF *Teucrium polium* (L.) Autore G.°, Capasso F.°, De Fusco R.°, Fasulo M.P.°, Lembo M.°, Mascolo N.°, Menghini," vol. 16, no. 1, 1984.
- [22] M. A. Esmaili and R. Yazdanparast, "Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: Studies with rat pancreatic islets," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 95, no. 1, pp. 27–30, 2004.
- [23] M. Abdollahi, H. Karimpour, and H. R. Monsef-Esfehani, "Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test," *Pharmacol. Res.*, vol. 48, no. 1, pp. 31–35, 2003.
- [24] J. Dai and R. J. Mumper, "Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties," *Molecules*, vol. 15, no. 10, pp. 7313–7352, 2010.
- [25] E. Guanabara, K. Ltda, E. Guanabara, and K. Ltda, "No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title."
- [26] "Le Tanins Dans Les Bois Tropicaux.Pdf."
- [27] A. Permal, "Validation d'une méthode de dosage des tanins condensés dans les matières végétales Audrina Permal To cite this version : HAL Id : hal-02785070 Bioanalyses et contrôles Validation d'une méthode de dosage des tanins condensés dans les matières végétale," 2020.
- [28] M. Mazid, T. A. Khan, and F. Mohammad, "Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants," *Biol. Med.*, vol. 3, no. 2 SPECIALISSUE, pp. 232–249, 2011.

- [29] *Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements.* .
- [30] S. Parasuraman, R. Anish, S. Balamurugan, and S. Muralidharan, “An Overview of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Instrumentation,” pp. 47–55.
- [31] N. A. Pratima and R. Gadikar, “L UPINE PUBLISHERS Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications : A Brief Review,” vol. 1, no. 1, pp. 26–34, 2018.
- [32] J. O. Defraigne and J. Pincemail, “Stress oxydant et antioxydants: Mythes et réalités,” *Rev. Med. Liege*, vol. 63, no. SPEC. ISS., pp. 10–19, 2008.
- [33] L. Les and G. Alpes, “Les espèces réactives de l’oxygène,” pp. 1–2, 2023.
- [34] G. Deby-Dupont, C. Deby, and M. Lamy, “Données actuelles sur la toxicité de l’oxygène,” *Reanimation*, vol. 11, no. 1, pp. 28–39, 2002.
- [35] Y. Rolland, “Plant natural antioxidants,” *OCL - Ol. Corps Gras Lipides*, vol. 11, no. 6, pp. 419–424, 2004.
- [36] A. Favier, “Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique,” *Actual. Chim.*, no. 11–12, pp. 108–115, 2003.
- [37] J. COLLARD, “Les systèmes de défense antioxydants,” pp. 1–2, 2010.
- [38] J.-F. Landrier, “Vitamine E et physiologie du tissu adipeux,” *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, vol. 18, no. 2, pp. 83–87, 2011.
- [39] C. L. Léger, “Anti-oxydants d’origine alimentaire : diversité , modes d’action anti-oxydante , interactions,” vol. 13, pp. 59–69, 2006.
- [40] K. Ghedira, “Les flavonoïdes: Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique,” *Phytotherapie*, vol. 3, no. 4, pp. 162–169, 2005.
- [41] V. L. Singleton and J. A. J. Rossi, “Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents,” *Am. J. Enol. Vinic.*, vol. 16, no. 48, pp. 144–58, 1965.
- [42] N. Boizot and J.-P. Charpentier, “Méthode rapide d’évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d’un arbre forestier,” *Le Cah. Tech. l’Inra*, pp. 79–82, 2006.
- [43] F. Ali-Rachedi, S. Meraghni, N. Touaibia, and M. Sabrina, “Analyse quantitative des composés phénoliques d’une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L.,” *Bull. la Soc. R. des Sci. Liege*, vol. 87, no. 3, pp. 13–21, 2018.
- [44] H. Talbi, A. Boumaza, K. El-Mostafa, J. Talbi, and A. Hilali, “Evaluation de l’activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L.,” *J. Mater. Environ. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 1111–1117, 2015.
- [45] A. Jones, S. Pravadali-Cekic, G. R. Dennis, R. Bashir, P. J. Mahon, and R. A. Shalliker, “Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 967, pp. 93–101, 2017.
- [46] H. H. Habibou, M. Idrissa, I. Khalid, O. Benjamin, and A. Rabani, “Activité Antioxydante des Extraits Méthanoliques de Différents Organes de *Detarium microcarpum* Guill. & Perr.,” *Eur. Sci. J. ESJ*, vol. 15, no. 12, pp. 159–171, 2019.

- [47] A. Perosa, M. Selva, V. Lucchini, M. Fabris, and M. Noè, “Kinetic parameter estimation of solvent-free reactions monitored by ^{13}C NMR spectroscopy, a case study: Mono- and di-(hydroxy)ethylation of aniline with ethylene carbonate,” *Int. J. Chem. Kinet.*, vol. 43, no. 3, pp. 154–160, 2011.
- [48] S. Provided, “EXPT. 1 SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF Fe^{2+} IONS USING 1, 10-PHENANTHROLINE Structure,” pp. 7–13.
- [49] M. Pipettes and V. Flask, “CHEM 334 Quantitative Analysis Laboratory,” vol. 9, no. 1, pp. 1–6, 2014.
- [50] M. Khan, A. Alam, K. M. Khan, U. Salar, S. Chigurupati, A. Wadood, F. Ali, J. I. Mohammad, M. Riaz, and S. Perveen, “Flurbiprofen derivatives as novel α -amylase inhibitors: Biology-oriented drug synthesis (BIODS), in vitro, and in silico evaluation,” *Bioorg. Chem.*, vol. 81, no. April, pp. 157–167, 2018.
- [51] E. O. A. Lalam, F. El-akhal, W. Ouedrhiri, F. Ouazzani Chahdi, and H. Greche, “Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *Thymus vulagris* et *Thymus saureioïdis* .,” *Les Biotechnol. Lab.*, vol. 8, pp. 27–33, 2013.
- [52] S. Fontanay, M.-E. Mougnot, and R. E. Duval, “Évaluation Des Activités Antibactériennes Des Huiles Essentielles Et/Ou De Leurs Composants Majoritaires,” *Hegel*, vol. N° 2, no. 2, pp. 109–118, 2015.
- [53] M. Fishbein, I. Ajzen, R. J. Hill, M. Fishbein, I. Ajzen, T. Peltier, L. Strobel, I. Ajzen, T. J. Madden, M. Fishbein, T. Hall, H. Way, and I. Ajzen, “No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title,” *Contemp. Sociol.*, vol. 22, no. 2, pp. 31–53, 1977.
- [54] T. Akerlund, R. Bernander, and K. Nordström, *Cell division in Escherichia coli minB mutants*, vol. 6, no. 15. 1992.
- [55] T. J. Foster, “The *Staphylococcus aureus* ‘superbug,’” *J. Clin. Invest.*, vol. 114, no. 12, pp. 1693–1696, 2004.
- [56] Y. Le Loir, F. Baron, M. Gautier, Y. Le Loir, F. Baron, M. Gautier, Y. Le Loir, F. Baron, and M. Gautier, “[i] *Staphylococcus aureus* [/ i] and food poisoning . To cite this version : HAL Id : hal-01123026 *Staphylococcus aureus* and food poisoning,” *Genet. Mol. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 63–76, 2003.
- [57] L. C. Braga, A. A. M. Leite, K. G. S. Xavier, J. A. Takahashi, M. P. Bemquerer, E. Chartone-Souza, and A. M. A. Nascimento, “Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 51, no. 7, pp. 541–547, 2005.
- [58] L. Müller, S. Gnoyke, A. M. Popken, and V. Böhm, “Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations,” *Lwt*, vol. 43, no. 6, pp. 992–999, 2010.
- [59] G. Topçu, M. Ay, A. Bilici, C. Sarikürkcü, M. Öztürk, and A. Ulubelen, “A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*,” *Food Chem.*, vol. 103, no. 3, pp. 816–822, 2007.
- [60] R. Riley and V. Chapman, “© 1958 Nature Publishing Group,” 1958.
- [61] R. Stämpfli, P. Brühwiler, S. Mourad, R. Verdejo, and M. Shaffer, “Development and

- characterisation of carbon nanotube-reinforced polyurethane foams,” *EMPA Act.*, vol. 26, no. 2007, p. 51, 2007.
- [62] M. Oyaizu, “Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine,” *Japanese J. Nutr. Diet.*, vol. 44, no. 6, pp. 307–315, 1986.
- [63] A. Szydłowska-Czerniak, C. Dianoczki, K. Recseg, G. Karlovits, and E. Szłyk, “Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods,” *Talanta*, vol. 76, no. 4, pp. 899–905, 2008.
- [64] G. Zengin, C. Sarikurkcu, A. Aktumsek, R. Ceylan, and O. Ceylan, “A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 53, pp. 244–251, 2014.
- [65] L. Bachiri, G. Echchegadda, J. Ibjibjen, and L. Nassiri, “Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc : «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.»,” *Eur. Sci. Journal, ESJ*, vol. 12, no. 30, p. 313, 2016.
- [66] L. Boutabia, S. Telailia, I. Bouguetof, F. Guenadil, and A. Chefrour, “Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. De la région de Hammamet (Tébessa-Algérie),” *Bull. la Soc. R. des Sci. Liege*, vol. 85, pp. 174–189, 2016.
- [67] I. M. Abu-reidah, D. Arráez-román, M. Al-nuri, I. Warad, and A. Segura-carretero, “Untargeted metabolite profiling and phytochemical analysis of *Micromeria fruticosa* L. (Lamiaceae) leaves,” *Food Chem.*, vol. 279, no. December 2018, pp. 128–143, 2019.
- [68] T. Boudiar, J. Lozano-Sánchez, B. Harfi, M. del Mar Contreras, and A. Segura-Carretero, “Phytochemical characterization of bioactive compounds composition of *Rosmarinus eriocalyx* by RP–HPLC–ESI–QTOF–MS,” *Nat. Prod. Res.*, vol. 33, no. 15, pp. 2208–2214, 2019.
- [69] J.J. Macheix, A. Fleuriet, C. Jay-Allemand, “Les composés phénoliques des végétaux,” Un exemple de métabolites secondaires d’importance économique, Presses Polytechniques et universitaires romandes, Vol. 1, pp. 192, 2005.
- [70] <https://aloevonderweid.com/>
- [71] <https://www.techniques-ingenieur.fr/>

Annexes

Annexe I : matériels et instruments utilisés**1) Matériel du laboratoire :**

- Micropipettes de volumes différents.
- Microplaques à 96 puits.
- Ballons.
- Béchers.
- Erlenmeyers.
- Eprouvettes.
- Flacons.
- Eppendorf.
- Spatules.
- Verres de montres.
- Portoirs.

2) Instruments :

- Balance de précision (KERN).
- Rotavap (BUCHI).
- Etuve (Memmert).
- Broyeur électrique.
- Sonicateur.
- Appareil de filtration sous vide avec pompe.
- Micro-onde.
- Ph mètre (METTLER TOLEDO).
- Lecteur de microplaque (PerkinElmer).

Annexe II : Réactifs des activités antioxydantes

<u>Réactif</u>	<u>Composition</u>	<u>Quantité</u>
DPPH	DPPH	4 mg
	Méthanol	100 ml
ABTS+	ABTS	19.2 mg
	H ₂ O	5 ml
	K ₂ S ₂ O ₈ (2.45mM)	3.3 mg
	H ₂ O	5 ml
phenanthroline (0.5%)	1-10 phenanthroline	0.05 g
	Méthanol	10 ml

Annexe III : Solutions chimiques et enzymatiques

<u>Solution</u>	<u>Composition</u>	<u>Quantité</u>
Reactif de folin ciocalteu (FCR)	FCR concentré (2M)	1ml
	H ₂ O	9 ml
carbonate de sodium (Na₂CO₃)	Na ₂ CO ₃	7,5 g
	H ₂ O	100 ml
Acétate de potassium (1M)	CH ₃ COOK	9,80 g
	H ₂ O	100 ml
Nitrate d'aluminium	Al(NO ₃) ₃ , 9H ₂ O	10g
	H ₂ O	100ml
Ferricyanide de potassium (1%)	K ₃ Fe(CN) ₆	1 g
	H ₂ O	100 ml
tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6)	NaH ₂ PO ₄	62,5 ml
	Na ₂ HPO ₄	37,5 ml
Acide trichloracétique (10%)	TCA	10 g
	H ₂ O	100 ml
Chlorure de fer III anhydre (0.1%)	FeCl ₃	0.1 g
	H ₂ O	100 ml
Chlorure de fer III anhydre (0.2%)	FeCl ₃	0.02 g
	H ₂ O	10 ml
Tampon phosphate (0,2 mM) (PH 6,9)	NaH ₂ PO ₄	51 ml
	Na ₂ HPO ₄	

		49 ml
Acide hydrochlorique 1M	HCl	4.17 ml
	H ₂ O	45.83 ml
Iodure de potassium iode	KI	3 g
	H ₂ O	100 ml
	Iodine (5mM)	127 mg
Enzyme α-amylase (1U)	Enzyme α -amylase	1 mg
	tampon phosphate (PH 6,9)	9 ml
Amidon (0,1 %)	Amidon	0,1 g
	H ₂ O	100 ml

Annexe IV : Standards

<u>Standard</u>	<u>Composition</u>	<u>Quantité</u>
Acide gallique	Acide gallique	
	Méthanol	
Quercétine	Quercétine	
	Méthanol	
Acide ascorbique	Acide ascorbique	
	Méthanol	
Trolox	Trolox	
	Méthanol	
Acarbose	Acarbose	
	Méthanol	

Annexe V : gammes d'étalonnage

1) Gamme d'étalonnage d'acide gallique :

25 µg/ml → 25 µl de SM + 175 µl de méthanol.

50 µg/ml → 50 µl de SM + 150 µl de méthanol.

75 µg/ml → 75 µl de SM + 125 µl de méthanol.

100 µg/ml → 100 µl de SM + 100 µl de méthanol.

125 µg/ml → 125 µl de SM + 75 µl de méthanol.

150 µg/ml → 150 µl de SM + 50 µl de méthanol.

175 µg/ml → 175 µl de SM + 25 µl de méthanol.

200 µg/ml → 200 µl de la SM.

2) Gamme d'étalonnage de la quercétine :

Quercetin (25) 25 µl SM + 175 µl MeOH

Quercetin (50) 50 µl SM + 150 µl MeOH

Quercetin (75) 75 µl SM + 125 µl MeOH

Quercetin (100) 100 µl SM + 100 µl MeOH

Quercetin (125) 125 µl SM + 75 µl MeOH

Quercetin (150) 150 µl SM + 50 µl MeOH

Quercétine (175) 175 µl SM + 25 µl MeOH

Quercetin (200) 200 µl SM

Résumés

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de la plante *Teucrium polium geyrii* de la famille des lamiacées.

L'analyse CPL/SM de l'extrait hydro-méthanolique de *Teucrium polium geyrii* a permis l'identification de six composés dont un composé phénolique (Quinic acid), un oligoside (D-Stachyose), trois diterpènes (Rosmadiol, Rosmaridiphenol et Hinokione) et un dernier composé (Desdimethyl-octahydro-iso-cohumulone).

Le potentiel antioxydant de la plante a été évalué *in vitro* en utilisant quatre méthodes. L'EHMC et l'EHMS ont montré les meilleures valeurs de la CI_{50} pour l'activité anti radicalaire au DPPH et l'activité du piégeage du cation radical ABTS, cela est justifié par leurs richesses en composés phénoliques et en flavonoïdes.

EHMC : (CI_{50} : $46,27 \pm 1,21 \mu\text{g/ml}$; CI_{50} : $33,75 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$ respectivement).

EHMS : (CI_{50} : $72,65 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$; CI_{50} : $37,41 \pm 3,04 \mu\text{g/ml}$ respectivement).

L'extrait EHMM représente le pouvoir réducteur (FRAP) le plus important ($A_{0,50}$: $59,42 \pm 1,73$).

Tous les extraits de *Teucrium polium geyrii* ont manifesté une activité inhibitrice d'alpha amylase très faible ($CI_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$).

L'extrait EHMC a montré une absence d'activité antibactérienne vis-à-vis les deux souches bactériennes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : *Teucrium polium geyrii*, CPL/SM, flavonoïdes, diterpènes, antioxydante, antibactérienne.

Abstract

The present study aimed the phytochemical and biological study of the *Teucrium polium geyrii* plant of the Lamiaceae family.

The LC/MS analysis of the hydro-methanolic extract of *Teucrium polium geyrii* permitted the identification of six compounds including a phenolic compound (Quinic acid), an oligoside (D-Stachyose), three diterpenes (Rosmadial, Rosmaridiphenol and Hinokione) and a last compound (Desdimethyl-octahydro-isocohumulone).

The antioxidant potential of the plant was evaluated in vitro using four methods. EHMC and EHMS showed the best IC₅₀ values for DPPH anti-radical activity and ABTS radical cation scavenging activity; this is justified by their richness in phenolic compounds and flavonoids.

EHMC : (CI₅₀ : 46,27±1,21µg/ml ; CI₅₀ : 33,75±0,62 µg /ml respectively).

EHMS : (CI₅₀ : 72,65±1,05 µg/ml ; CI₅₀ : 37,41±3,04 µg /ml respectively).

The EHMM extract represents the most important reducing power (FRAP) (A_{0,50} : 59,42±1,73).

All *Teucrium polium geyrii* extracts showed very weak alpha amylase inhibitory activity (IC₅₀ >400 µg/ml).

The EHMC extract showed an absence of antibacterial activity against the two bacterial strains *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords : *Teucrium polium geyrii*, CPL/MS, flavonoids, diterpenes, antioxidant, antibacterial.

الملخص

تهدف هذه الدراسة الى دراسة البنية الكيميائية للنبتة *Teucrium polium geyrii* التي تنتمي الى عائلة Lamiaceae.

سمح لنا تحليل CPL / SM للمستخلص الهيدروميثانولي لنبتة *Teucrium polium geyrii* بتحديد ستة مركبات منها: سكر قليل التعدد (Stachyose-D)، مركب فينولي (Quinic acid)، ثلاثة diterpènes (Rosmadial, Rosmaridiphenol isomère 2, et Hinokione)، و مركب آخر (Desdimethyl-cohumulone -iso-octahydro).

تمت دراسة مضادات الاكسدة باستعمال اربعة طرق. أظهر المستخلصين EHMC و EHMS افضل قيم IC_{50} في كل من اختبار DPPH، واختبار ABTS والتي تبرر وجود كمية كبيرة من المركبات الفينولية والفلافونويد

EHMC : (بالترتيب Cl_{50} : $Cl_{50} \pm 46,27$; $1,21 \mu g/ml$; $0,62 \pm 33,75 \mu g/ml$).

EHMS : (بالترتيب Cl_{50} : $Cl_{50} \pm 72,65$; $1,05 \mu g/ml$; $3,04 \pm 37,41 \mu g/ml$).

اظهر المستخلص EHMM أعلى قيمة ($A_{0,5}$: $1,73 \pm 59,42$) في اختبار $A_{0,5}$ le pouvoir réducteur (FRAP).

أظهرت جميع المستخلصات النباتية نشاطاً مثبطاً ضعيفاً جداً لانزيم α amylase ($Cl_{50} < 400 \mu g/ml$).

أظهر المستخلص الهيدروميثانولي غياباً في النشاط المضاد للبكتيريا ضد السلالات البكتيرية *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*.

الكلمات المفتاحية : CPL / SM ، *Teucrium polium geyrii* ، المركبات الفينولية ، الفلافونويد ، مضاد للأكسدة ، مضاد للبكتيريا.

Evaluation in vitro des activités antioxydantes, enzymatique et antibactérienne des extraits de *Teucrium polium geyrii*

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du diplôme de master en Biochimie Appliquée

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de la plante *Teucrium polium geyrii* de la famille des lamiacées.

L'analyse CPL/SM de l'extrait hydro-méthanolique de *Teucrium polium geyrii* a permis l'identification de six composés dont un composé phénolique (Quinic acid), un oligoside (D-Stachyose), trois diterpènes (Rosmadiol, Rosmaridiphenol isomère et Hinokione) et un dernier composé (Desdimethyl-octahydro-iso-cohumulone).

Le potentiel antioxydant de la plante a été évalué *in vitro* en utilisant quatre méthodes. L'EHMC et l'EHMS ont montré les meilleures valeurs de la CI_{50} pour l'activité anti radicalaire au DPPH et l'activité du piégeage du cation radical ABTS, cela est justifié par leurs richesses en composés phénoliques et en flavonoïdes.

EHMC : (CI_{50} : $46,27 \pm 1,21 \mu\text{g/ml}$; CI_{50} : $33,75 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$ respectivement).

EHMS : (CI_{50} : $72,65 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$; CI_{50} : $37,41 \pm 3,04 \mu\text{g/ml}$ respectivement).

L'extrait EHMM représente le pouvoir réducteur (FRAP) le plus important ($A_{0,50}$: $59,42 \pm 1,73$).

Tous les extraits de *Teucrium polium geyrii* ont manifesté une activité inhibitrice d'alpha amylase très faible ($CI_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$).

L'extrait EHMC a montré une absence d'activité antibactérienne vis-à-vis les deux souches bactériennes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : *Teucrium polium geyrii*, CPL/SM, flavonoïdes, diterpènes, antioxydante, antibactérienne.**Date de soutenance :** 20/06/2023