



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biodiversité et Production Végétale

Spécialité : Biologie et Physiologie Végétale

Option : Métabolisme Secondaire et Molécules Bioactives

Intitulé :

Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante de l'espèce

***Phlomis purpurea* L.**

Présenté et soutenu par : Zaarour Nesrine

Le : 24/06/2015

Lahlah Esma

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. BOUDOUR Leila (PR - UFM Constantine 1).

Rapporteur : Mr. CHIBANI Salih (M.C.B - UFM Constantine 1).

Examineurs : Mme. HAMOUDA_ BOUSBAA Dounia (M.C.B - UFM Constantine 1).

Année universitaire
2014 – 2015

Remerciements

Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens a fin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous tenons tout d'abord à remercier notre directeur de mémoire, Monsieur **Chibani Salih**,
Maître de Conférence « B » à l'université Constantine 1.

Recevez nos sincères remerciements pour les conseils que vous avez accordés tout le long de ce travail. Merci également pour votre encadrement.

Nos remerciements vont aussi aux membres de jury:

M^{me} Boudour Leila, Professeur à l'université Constantine 1

M^{me} Hamouda_Bousabaa Dounia, Docteur à l'université Constantine 1

Recevez nos plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Notre profonde reconnaissance va à M^{lle} **Abdelaziz Widad**, Maître Assistante «A» à
l'université Constantine 1.

On n'oublie pas votre soutien qui nous a aidés à réaliser la partie microbiologique du mémoire.

Nos remerciements vont aussi à M^{me} **Boudchiche Razika**, ingénieur de labo microbiologie
à l'université Constantine 1

A tous ceux qui ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de ce travail.

Dédicace

Nous dédions ce travail à :

Nos mères, sources de tendresse et d'amours pour leurs soutiens tout le long de
notre vie scolaire.

Nos pères, qui nous ont toujours soutenus et qui ont fait tout possible pour nous
aider.

Nos frères et nos sœurs, que nous aimons beaucoup.

Notre grande famille.

Nos chers ami (e) s, et enseignants.

Tout qu'on collaboré de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Que dieu leur accorde santé et prospérité.

Nesrine et Esma

ملخص :

يستند عملنا أساسا على دراسة كيمياء النبات وتقييم النشاط المضاد للأكسدة لنبات الأذينة الأرجوانية *Phlomis purpurea* L. المنتمي للعائلة الشفوية، و المتحصل عليه من منطقة توزلين (أم البواقي – الجزائر) وكشفت اختبارات كيمياء النبات أن هذا النبات غني بمركبات الفلافونويد، الانثوسيانين، الكينونات، الانثراكينونات، والتانينات، الستيرويدات والتربينات. مجموع المركبات الفينولية في أوراق وسيقان هذا النبات قدر ب: 346 ± 168.9 و 45.96 ± 213 أظهرت نتائج تقييم نشاط مضادات الأكسدة من الأوراق من خلال استعمال طريقة الاختبارات DPPH أن النبات المدروس له قدرة جيدة مضادة للأكسدة . المستخلصات الميثانولية من الأوراق والسيقان لها تأثير مضاد للجراثيم تجاه السلالتان البكتيريتان : E.كولاي، المكورات العنقودية الذهبية.

كلمات مفتاحية :

Phlomis purpurea L.، العائلة الشفوية، الانثوسيانين، التانينات، الانثراكينونات، النشاط المضاد للأكسدة.

Résumé :

Nos travaux sont basés principalement sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de la plante *Phlomis purpurea* L. appartenant à la famille des lamiaceae, récolté de touzline (oum el bouaghi)

Les tests phytochimiques ont révélé que cette plante est riche en flavonoïdes, anthocyanes, quinones, anthraquinone, tanins, stéroïdes, et les terpènes.

Le dosage des composés phénoliques totaux dans les feuilles et les tiges est estimé de $346\pm 168,99$, $213\pm 45,96$.

L'évaluation de l'activité antioxydante des feuilles par la méthode des tests de DPPH à montré que les feuilles ont un pouvoir antioxydant puissant.

Les extraits méthanoliques des feuilles et tiges ont un effet antibactérien vis-à-vis des souches *E. coli*, *Staphylococcus aureus*

Mots clés :

Phlomis purpurea L., Lamiaceae, Anthocyanes, Tanins, Anthraquinones, Activité antioxydante.

Abstract

Our works are mainly based on the phytochemical study and evaluation of the antioxidizing activity of the plant *Phlomis purpurea* L. belonging to the family of lamiaceae, collected from Touzline (Oum el bouaghi).

The phytochemical tests reveals that this plant is rich in flavonoids, anthocyanins, quinines, anthraquinones, tannins, steroids and terpenes.

The dosage of the total phenolic compounds in sheets and stems is considered of $346 \pm 168,99$, $213 \pm 45,96$.

The evaluation of the antioxidizing activity of sheets by the method of the tests of DPPH shown that sheets have a powerful antioxidant power.

Extracts methanolic of the sheets and stems have an antibacterial effect towards strains *E. coli*, *Staphylococcus aureus*.

Key words

Phlomis purpurea L., Anthocyanes, Tannins, Anthraquinones, Antioxydant activity.

Liste des abréviations

Fig. : Figure.

G : Gramme.

Mg : Milligramme.

Mm: Millilitres.

µl : Microlitre.

H : Heure.

Mn : Minutes.

Nm : Nanomètre.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

G : Grossissement.

DPPH : (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

CI 50 : Concentration inhibitrice à 50%

EM : Extrait méthanolique

Liste des figures

Figure. 1 : Répartition géographique de la famille des lamiaceae dans le monde entier.....	3
Figure. 2 : Photo de l'espèce <i>Phlomis Edward bowles</i>	8
Figure. 3 : Photo de l'espèce <i>Phlomis tuberosa</i>	9
Figure. 4 : Photo de l'espèce <i>Phlomis leucophracta</i>	10
Figure. 5 : Photo de l'espèce <i>Phlomis samia</i>	10
Figure. 6 : Planche botanique de l'espèce <i>Phlomis purpurea</i> L.....	12
Figure. 7 : Port de la plante adulte <i>Phlomis purpurea</i> L.....	13
Figure. 8 : Répartition géographique de l'espèce <i>Phlomis purpurea</i> L.....	14
Figure. 9 : Les pays d'origine du <i>Phlomis purpurea</i> L.....	15
Figure. 10 : Photo présente les tiges du <i>Phlomis purpurea</i> L.....	15
Figure. 11 : Photo des feuilles du <i>Phlomis purpurea</i> L.....	16
Figure. 12 : Photo présente la fleur du <i>Phlomis purpurea</i> L.	17
Figure. 13 : Les différentes parties de la fleur du <i>Phlomis purpurea</i> L.....	17
Figure. 14 : Photo de capsules du <i>Phlomis purpurea</i> L.....	18
Figure. 15 : Les semences du <i>Phlomis purpurea</i> L.....	18
Figure. 16 : Optium écologiques du <i>Phlomis purpurea</i> L.....	19
Figure. 17 : Les différentes classes des composés phénoliques.....	25
Figure. 18 : Structure du 2-phényle chromane	26
Figure. 19 : Structure générale des flavonoïdes.....	26
Figure. 20 : Structure chimique d'anthocyanes.....	30
Figure. 21 : Structure chimique d'anthocyanes.....	31
Figure. 22 : Bactérie d' <i>Escherichia coli</i>	35
Figure. 23 : Culture de bactérie d' <i>Escherichia coli</i>	36
Figure. 24 : Bactérie de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Figure. 25 : La plante <i>Phlomis purpurea</i> L.....	43
Figure. 26 : Carte géographique qui indique la région de la plante étudiée.....	44

Figure. 27 : Le matériel végétal broyé (Tige).....	45
Figure. 28 : Les extraits méthanolique préparés.....	46
Figure. 29 : Les extraits étherique préparés.....	48
Figure. 30 : Les extraits Chloroformique préparés.....	48
Figure. 31 : a- Macération feuilles	51
b- Macération tiges	
c-Extrait hydro-alcoolique feuilles	
d- Extrait hydro-alcoolique tiges	
Figure. 32 : Evaporateur rotatif.....	52
Figure. 33 : Extraits obtenus par le rotavap des feuilles et tiges.....	52
Figure. 34 : Photo de l'affrontement des tiges	53
a-Ether de petrole	
b- Chloroforme	
c- Acétate d'éthyle	
d- Butanol	
figure. 35 : Extraits récupérés (tiges).....	54
Figure. 36 : Photo de l'affrontement des feuilles	55
1-Ether de pétrole	
2-Chloroforme	
3- Acétate d'éthyle	
Figure. 37 : Extraits récupérés (feuilles).....	55
Figure. 38 : Dépôt de l'échantillon.....	59
Figure. 39 : Lumière UV.....	60
Figure. 40 : L'activité antibactérienne.....	61
Figure. 41 : Les différentes étapes de l'activité antibactérienne.....	62
Figure. 42 : Photographie des résultats des Flavonoïdes.....	66
Figure. 43 : Photographie des résultats des Anthraquinones.....	67
Figure. 44 : Photographie des résultats des quinones.....	68

Figure. 45 : Photographie des résultats d'anthocyanes.....	69
Figure. 46 : Photographie des résultats des tanins.....	70
Figure. 47 : photographie des résultats des stérols	71
Figure. 48 : Photographie des résultats des stéroïdes	71
Figure. 49 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique des feuilles, des fleurs et des tiges chez <i>Phlomis purpurea</i> L.....	73
Figure.50 : Diamètre des zones d'inhibition des fractions de l'extrait contre différentes bactéries.....	75
Figure. 51 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations d'extraits méthanolique Feuille de <i>Phlomis purpurea</i> L.....	76

Liste des tableaux

Tableau. 1 : Principales classes des flavonoïdes.....	27
Tableau. 2 : Liste des principaux radicaux libres.....	38
Tableau. 3 : Résultats du criblage des flavonoïdes dans les feuilles et tiges chez <i>Phlomis purpurea</i> L.	65
Tableau. 4 : Résultats du criblage d'anthraquinones dans les feuilles et tiges chez <i>Phlomis purpurea</i> L.....	66
Tableau. 5 : Résultats du criblage des quinones dans les feuilles et tiges chez <i>Phlomis purpurea</i> L....	67
Tableau. 6 : Résultats du criblage d'anthocyanes dans les feuilles et tiges chez <i>Phlomis purpurea</i> L.	68
Tableau.7 : Résultats du criblage des tanins dans les feuilles et tiges chez <i>Phlomis purpurea</i> L.....	69
Tableau. 8 : Résultats du criblage des stérols et stéroïdes dans les feuilles et tiges chez <i>Phlomis</i> <i>purpurea</i> L..	71
Tableau. 9 : Taux de polyphénols existant dans les extraits méthanolique feuilles et tiges.....	74
Tableau. 10 : Activité antibactérienne de l'extrait de <i>Phlomis purpurea</i> L.....	74

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Sommaire

Introduction

Partie I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Aperçu sur la plante étudiée *Phlomis purpurea* L.

1. Etude botanique de la famille Lamiaceae.....	3
1.1. Description générale de la famille Lamiaceae.....	3
1.2. Étymologie.....	5
1.3. Intérêt économique.....	5
1.4. Statut de protection.....	6
1.5. Ecologie.....	6
1.6. Classification de la famille Lamiaceae.....	6
1.7. Sous-famille Lamioïdées.....	7
1.8. Genre <i>Phlomis</i>	7
1.9. L'espèce <i>Phlomis purpurea</i> L.....	12
1.10. Position systématique de l'espèce <i>Phlomis purpurea</i> L.....	20
1.11. Utilisation du <i>Phlomis purpurea</i> L.....	21

Chapitre 2. Métabolites primaires et secondaires

1. Définition générale.....	22
1.1. Les métabolites primaires.....	22
1.2. Les métabolites secondaires.....	22

1.2.1. Classification des métabolites secondaires.....	22
1.2.2. Les composés phénoliques.....	23
1.2.2.1 Biosynthèse.....	25
1.2.2.2. Les flavonoïdes.....	25
1.2.2.3. Les tanins.....	29
1.2.2.4. Les anthocyanidines.....	31
1.2.2.5. Les saponosides.....	31
1.2.2.6. Les alcaloïdes.....	32
1.2.2.7. Les coumarines.....	33

Chapitre 3. Les activités biologiques

1. L'activité antibactérienne.....	34
1.1. Quelques bactéries.....	35
2. Les antioxydants.....	38
➤ Evaporateur rotatif.....	40
➤ Dosages des phénols totaux.....	41
➤ Spectrophotomètre.....	41

Partie 2. Partie expérimentale

Chapitre 1. Matériels et méthodes

1. Matériel végétal.....	43
1.1. Récolte du matériel végétal.....	44
1.2. Conservation de la plante.....	44
1.3. Broyage.....	44
2. Les tests phytochimiques.....	45
2.1. Epuisement de l'extrait végétal hydro-alcoolique.....	45
2.1.1. Criblage des Flavonoïdes.....	46

2.1.2. Criblage des Tanins.....	47
2.1.3. Criblage des Stérols et Stéroïdes.....	47
2.2. Epuisement du l'extrait végétal Chloroformique et Etherique.....	48
2.2.1. Criblage des anthraquinones.....	49
2.2.2. Criblage des quinones.....	49
2.2.3. Criblage des coumarines.....	49
2.2.4. Criblage des stérols et stéroïdes et triterpènes.....	49
3. Extraction des Métabolites Secondaires.....	50
3.1. L'objectif.....	50
3.2. Protocole général d'extraction.....	50
3.3. L'évaporateur rotatif.....	51
3.4. Les Fractionnement des extraits bruts par extraction Liquide-Liquide (ELL).....	52
3.4.1 Fractionnement de l'extrait méthanolique (MeOH).....	55
4. La Chromatographie Analytique sur Couche Mince (CCM).....	57
4.1. Principe.....	57
4.2. Mode opératoire.....	57
4.2.1. Préparation de la phase stationnaire (fixe).....	57
4.2.2. Préparation de la phase mobile (éluant).....	58
4.2.3. L'extrait méthanolique.....	58
4.3. Le dépôt.....	58
4.4. Le développement des plaques.....	59
4.5. Migration et séchage.....	59
5. Dosage des polyphénols.....	60

6. Etude de l'activité antibactérienne.....	61
6. 1. Identification et isolement des souches	61
6.2. Stérilisation du matériel.....	61
6. 3. Protocole d'évaluation de l'activité antibactérienne (test de sensibilité).....	63
6. 4. Préparation des boîtes.....	63
6.5. Etalement des souches.....	63
6.6. Lecture des boîtes.....	63
7. Le pouvoir antioxydant.....	63

Chapitre 2. Résultats et discussion

1. Screening phytochimique.....	65
1.1. Métabolites secondaires.....	65
1.1.1. Criblage des Flavonoïdes.....	65
1.1.2. Criblage d'Anthraquinones.....	66
1.1.3. Criblage des Quinones	67
1.1.4. Criblage d'Anthocyanes	68
1.1.5. Criblage des Tanins.....	69
1.1.6. Criblage des Stérols et Stéroïdes.....	70
1.1.7. Criblage des coumarines.....	72
2. Séparation de l'extrait méthanolique par chromatographie sur couche mince (CCM).....	72
3. Dosage des polyphénols.....	73
4. activités biologiques.....	74
4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique.....	74
4.2. Activité antioxydante.....	76

Conclusion

Partie I

Synthèse Bibliographique

INTRODUCTION

Les plantes médicinales ont été une source inépuisable de médicaments pour les tradipraticiens pour guérir certaines pathologies souvent mortelles sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Actuellement, l'ethnopharmacologie s'emploie à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs [37]

Jusqu'à présent, sur les 300000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques [40], ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré.

Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de chimiodiversité, avec souvent des structures très originales dont une synthèse totale et rentable (complexité structurale, stéréospécificité...), est souvent difficile à réaliser. Ces dernières années, nous assistons à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale.

L'Algérie, pays connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques [41] Néanmoins, il faut noter que, d'une part, le nombre d'espèces végétales diminue et que d'autre part, le savoir des médecines traditionnelles tend lui aussi à disparaître progressivement. Il en résulte une urgence à connaître et protéger ces espèces et les savoirs qui leur sont associés. La recherche de molécules bioactives d'origine naturelle constitue d'ailleurs un des axes prioritaires de l'industrie pharmaceutique algérienne mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle.

Pour notre part, notre choix s'est porté sur le *Phlomis* (lamiaceae), un genre largement utilisée dans le bassin méditerranéen pour ses nombreuses vertus thérapeutiques.

Nous avons structuré notre travail comme suit :

La 1^{ère} première partie : Etude bibliographique qui résume les principales caractéristiques de l'espèce sélectionnée de la famille de : Lamiaceae, *Phlomis purpurea* L. et les substances naturelles végétales.

2eme partie en globe : Le Criblage des métabolites secondaires, le dosage de polyphénols, l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne, suivi des résultats et discussion.

1- Etude botanique de la famille Lamiaceae

La famille des Lamiacées ou Lamiaceae (anciennement, Labiæ) est une catégorie importante de plantes dicotylédones comprenant près de six mille espèces répartie sur l'ensemble de la surface de la planète, bien qu'elles soient plus présentes en climats tempérés et surtout le pourtour méditerranéen. [38]

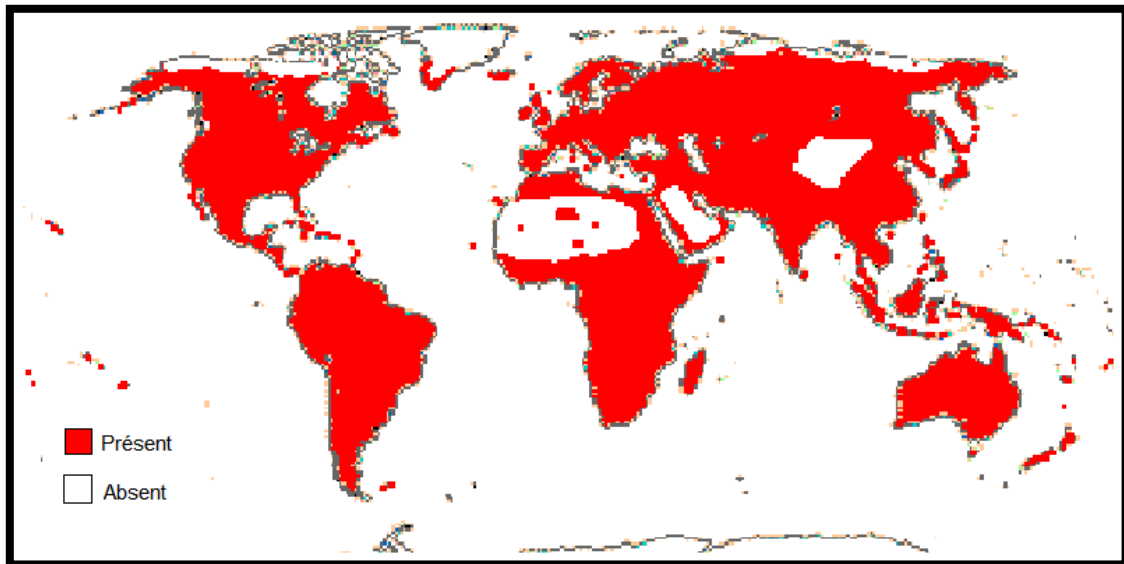


Figure.1 : Répartition géographique de la famille des lamiaceae dans le monde entier [1]

1.1. Description générale :

Les Lamiaceae sont des plantes herbacées ou arbustives, très rarement des arbres (Hyptis) ou des lianes. Elles se caractérisent par la présence de glandes épidermiques aromatiques et contiennent ordinairement des carbohydrates tels que le stachyose [31]

Ces plantes présentent des caractères facilement identifiables :

1.1.1. Les tiges :

- Les tiges ont une section carrée caractéristique
- Les jeunes tiges sont le plus souvent quadrangulaires, avec des arêtes en chacun de ses sommets
- Les tiges sont recouvertes de poils et de glandes, qui leur confèrent généralement un parfum aromatique

1.1.2. Les feuilles :

- Feuilles opposées, disposées en paire se croisant d'un nœud à l'autre, dépourvues de stipules, à limbe généralement denté
- Parfois verticillés ou alternes

1.1.3. Les fleurs :

- fleurs en cymes, souvent réunies en faux-verticilles étagés, axillaires ou terminaux ; rarement fleurs isolées
- Les fleurs sont irrégulières (zygomorphes), en bouquets axillaires (naissant à la base d'une feuille) étagés. Les bouquets forment souvent des verticilles autour de la tige
- Fleurs hermaphrodites, à symétrie bilatérale ou parfois sub-radiale
- composées d'une ou deux lèvres (d'où leur nom de labié)
- le calice est souvent persistant
- Calice pentamère à 5-12 lobes égaux ou disposés en 2 lèvres
- Corolle en tube terminé par 4 ou 5 lobes, subégaux, ou formant une lèvre inférieure unique, ou encore, le plus souvent, formant 2 lèvres bien distinctes et développées (sauf à de rares exceptions (*teucrium* et *ajuga*))
- Étamines insérées sur le tube de la corolle, au nombre de quatre ou, parfois, de deux ; dans ce dernier cas, elles sont accompagnées de deux staminodes (*Salvia*). Le connectif tend à séparer les deux sacs polliniques
- . Le nectar est riche en saccharose.
- Il y a souvent un disque nectarifère à la base du pistil ou parfois sur le gynophore
- Le pistil est composé de deux carpelles biovulés, chacun se divisant en deux loges uniovulées
- Carpelles soudés entre eux et au nombre de deux

• Ovaire supère, à 4 ovules. À la fructification, une fausse-cloison divise chaque carpelle en 2, formant ainsi un tétrakène (caractère que permet de faire la distinction entre les *Lamiaceae* et certaines *Scrophulariaceae* telle les *Rhinantus* [2])

1.1.4. Fruits :

• Le fruit est composé de 4 akènes (fruit sec et indéhiscent ne contenant qu'une graine), insérés à la base du calice persistant.

• Le fruit est ordinairement constitué de quatre nucules à tégument dur ; ce peut être une drupe (*Prasium*). Les semences sont à embryon droit et un albumen réduit ou absent

1.1.5. La formule florale :

La formule florale des Lamiaceae est ordinairement la suivante :

- Sépales : 5 soudés
- Pétales : 5 soudés
- Etamines : 4 ou 2
- Carpelles : 2 soudés
- Fruit : tétrakène

1.2. Étymologie

Lamiaceae : du genre *Lamium*, lui-même nommé ainsi en référence au nom latin de l'ortie (selon Pline), lamium. Cette famille est également connue sous le nom de Labiées, du latin *labium*, lèvre, en référence à la corolle bilabée, mais la nomenclature actuelle requiert un nom de genre comme racine du nom de famille. [42]

1.3. Intérêt économique :

La famille renferme de nombreuses espèces économiquement importantes soit par leurs huiles essentielles, soit pour leur usage condimentaire, elles appartiennent aux genres

Mentha (la Menthe) , *Lavandula* (la Lavande), *Marrubium* (le Marrube) , *Nepeta* (L'Herbe aux chats),

Ocimum (le Basilic), *Origanum* (l'Origan), *Rosmarinus* (le Romarin), *Salvia* (la Sauge), *Satureja* (la Sarriette) et *Thymus* (le Thym). Les tubercules de quelques espèces de *Stachys* sont comestibles. *Tectona* (le Tek) fournit un bois d'œuvre important. De nombreux genres contiennent des espèces ornementales : on peut citer parmi eux *Ajuga*, *Callicarpa*, *Clerodendrum*, *Monarda*, *Salvia*, *Scutellaire* et *Vitex* [38].

Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiaceae sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes et iridoïdes glycosylés..

Le genre *Salvia*, comprenant près de 900 espèces majoritairement riche en diterpénoïdes et le genre *Marrubium* avec environ 30 espèces réparties dans un grand nombre de pays du globe. Le genre *Phlomis* comprenant près de 100 espèces est particulièrement riche en flavonoïdes, phényléthanoïdes, phénylpropanoïdes et en iridoïdes glycosylés. [31]

1.4. Statut de protection :

Position variable selon les genres et espèces, dans la classification IUCN.

1.5. Écologie :

Grande diversité des habitats de la famille.

1.6. Classification de la famille Lamiaceae :

La famille des lamiaceae existe en classification classique de Cronquist (1981) et en classification phylogénétique APG (1998) , APG II (2003) et APG III (2009)

La famille répartis en plusieurs sous-familles

1.7. Sous-famille Lamioïdées

En biologie, une sous-famille est un rang taxinomique intermédiaire, immédiatement inférieur à la famille de la classification des êtres vivants.

1.8. Genre *Phlomis* :

Le genre botanique *Phlomis* regroupe plus de 70 espèces de vivaces, originaires de la Région méditerranéenne et dans les contrées tempérées de l'Asie

1.8.2. Caractères essentiels du genre *Phlomis* :

- calice : Monophylle, tubulé, oblong, à cinq angles, a cinq dents, persistant.
- corolle : Monopétale, en tube étroit dans sa partie inférieure partagée dans le reste en deux lèvres , dont la supérieure est velue en dessus, en forme de voûte , comprimée latéralement et plongée en avant comme pour ouvrir la lèvre inférieure qui est à trois lobes, dont celui du milieu est grand, arrondi, échancré, et les latéraux sont petits, aigus.
- étamines : Au nombre de quatre, à filaments recourbés, cachés sous la lèvre supérieure, deux plus longs et deux plus courts.
- pistil : quatre ovaires au centre desquels est un style filiforme, terminé par un stigmate bifide.
- péricarpe : Nul ; le calice persistant en tient lieu.
- semences : Oblongues, à trois angles, au nombre de quatre (4 semences nues au fond du calice). [10]

1.8.3. Rapports naturels :

Le genre *Phlomis* a de l'affinité avec le *Leonurus* ; il en diffère par la forme de la lèvre supérieure de la corolle et par les anthères qui ne sont point par semées de point brillant. [10]

Ce sont des sous-arbrisseaux ou des plantes vivaces, producteurs d'huiles essentielles, sans odeur spéciale, dont les poils sont les uns souples et les autres en étoile, à feuilles dont les nervures sont disposées en un réseau plus ou moins serré, à fleurs relativement grandes, jaunes ou purpurines, rarement blanches. Plusieurs espèces sont cultivées comme plantes d'ornement. [43]

1.8.4. Classification

Le genre *Phlomis* est séparé en 2 Sections :

- Section Phlomis

Arbustes et vivaces herbacées. La lèvre supérieure de la corolle est grande, à capuchon, quelque peu hémisphérique, fortement comprimé latéralement, pour former une arête étroite au dessus, pas en masse barbu à la marge intérieure (poils clairsemés et courts) ; lobes latéraux de la lèvre inférieure petits, le lobe moyen étant grand et largement arrondi.

La section Phlomis a été souvent coupée en trois sous-sections (Bentham) : *Gymnophlomis*, *Dendrophlomis*, et *Oxyphlomis*. [3]



figure.2: photo de l'espèce *Phlomis Edward bowles*

- Section Phlomoides

Vivaces herbacés. Lèvre supérieure de corolle plus petite, légèrement arrondie, pas fortement comprimée latéralement, et n'exhibant ainsi pas l'arête étroite au dessus, marginée par une masse barbue; lobes latéraux de lèvre inférieure à peine plus petits que le lobe moyen, obtus.



Figure.3 : photo de l'espèce *Phlomis tuberosa*

1.8.5. Distribution générale

Les *Phlomis* (sections *Phlomis* et *Phlomoïdes*) sont indigènes dans :

- La plupart des pays bordant la Méditerranée, nord et sud (37 *Phlomis* + 1 *Phlomoïdes*) et particulièrement en Turquie (27 *Phlomis* + 1 *Phlomoïdes*),
- l'Iran-Irak-Afghanistan-Himalaya (27 *Phlomis*+ 3 *Phlomoïdes*),
- l'ex URSS (27 *Phlomis*+ 22 *Phlomoïdes*)
- la Chine (1 *Phlomis*+ 42 *Phlomoïdes*),
- on dénombre de nombreux hybrides naturels.



Figure.4 : photo de l'espèce *Phlomis leucophracta*



Figure.5 : photo de l'espèce *Phlomis samia*

Les espèces faisant partie de la Section *Phlomis* sont arbustives et densément velues avec de petites feuilles ondulées.

Ils sont associés aux végétations des maquis et des garrigues, le long de la côte méditerranéenne et se poussent dans des sols pierreux ou rocheux. *Le Phlomis fruticosa* ayant

quant à lui une distribution beaucoup plus large allant jusqu'en ex URSS et en Chine. Cette région étant caractérisée par un hiver humide doux et un été sec chaud.

Les espèces faisant partie de la Section Phlomoides se retrouvent quant à eux dans la région Irano-Turanienne, la majorité provenant d'Asie centrale et de Chine. Ils se développent dans des prairies et steppes, entre les déserts arides et également dans les montagnes du Pamirs et du Tien Shan. La région est caractérisée par de basses précipitations, étés secs chauds, hivers froids et la fonte des neiges au printemps déclenchant la croissance des plantes. Les plantes de ce groupe sont généralement herbacées avec les feuilles membraneuses ; elles sont généralement moins velues que ceux de la section Phlomis. Il y a un membre de cette section actuelle dans la région méditerranéenne, à savoir *Phlomis tuberosa* L [syn. Phlomoides Tuberosa (L) Moench]. On le retrouve dans des prairies et steppes rocheuses à 1000-1500m dans des pays tels que la Hongrie, l'ex Yougoslavie, la Bulgarie et la Grèce.

1.8.6. Nomenclature

Comme dans la plupart des genres, il y a eu de grandes confusions dans l'identification des plantes. Pour seul exemple, on peut citer le cas de *P. tuberosa* que l'on a retrouvé dans 32 jardins botaniques sous le nom de 9 autres espèces :

- 17 sous le nom de *P. alpina*
- 4 sous le nom de *P. herba-venti*
- 3 sous le nom de *P. chrysophylla*
- 3 sous le nom de *P. samia*
- 1 sous le nom de *P. pungens*, *P. cashmeriana*, *P. americana*, *P. armeniaca* et *P. lanata*.
-

1.9. L'espèce *Phlomis purpurea* L. :



Figure.6 : planche botanique de l'espèce *Phlomis purpurea* L. [4]

Les noms donnés à la plante sont les suivants :

- ❖ Nom scientifique : *Phlomis purpurea* L. [5]
- ❖ Nom latin : *Phlomis purpurea*
- ❖ Nom arabe : الأذينة الأرجوانية [6]
- ❖ Nom arabe (en Algérie) :
- ❖ Nom Français, usuel ou vernaculaire: Saug de Jérusalem a fleurs rose pourpre
- ❖ Nom anglais: Matagallo
- ❖ Nom espagnol : matagallos, salvió purpuri [7]

Synonyme(s) Homotypic :

Phlomis salviifolia Jacq.

Phlomis ferruginea Mill. [8]

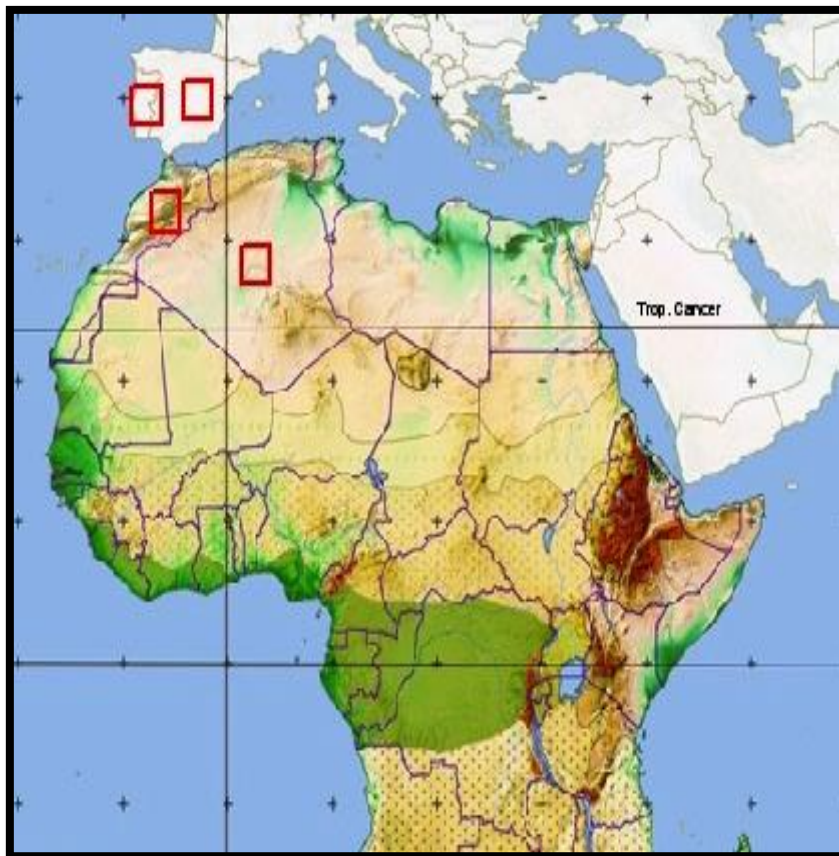


Figure.7 : Port de la plante adulte *Phlomis purpurea* L.

Espèce du *Phlomis purpurea* L., communément appelé Phlomide pourpre ou sauge de Jérusalem a fleurs rose purpurines, c'est une espèce du *Phlomis* de la famille des lamiaceae . Arbuste vivace de 60 cm à 1,20 m de hauteur, 1m de largeur. Fleurit du mois de mai à juin puis septembre octobre.

1.9.1. Répartition :

Il s agit d'une espèce originaire d'Afrique du Nord plus spécifiquement du Maghreb arabe (l'Algérie et le Maroc) et de la moitié sud de la péninsule ibérique le Portugal et l'Espagne (moins fréquemment à l'est). Dans les maquis clairsemés et les zones maritimes méditerranéennes sèches, jusqu'à 400 m d'altitude. (GBIF.org)



 Présent

Figure.8 : Répartition géographique de l'espèce *Phlomis purpurea* L.

[9]

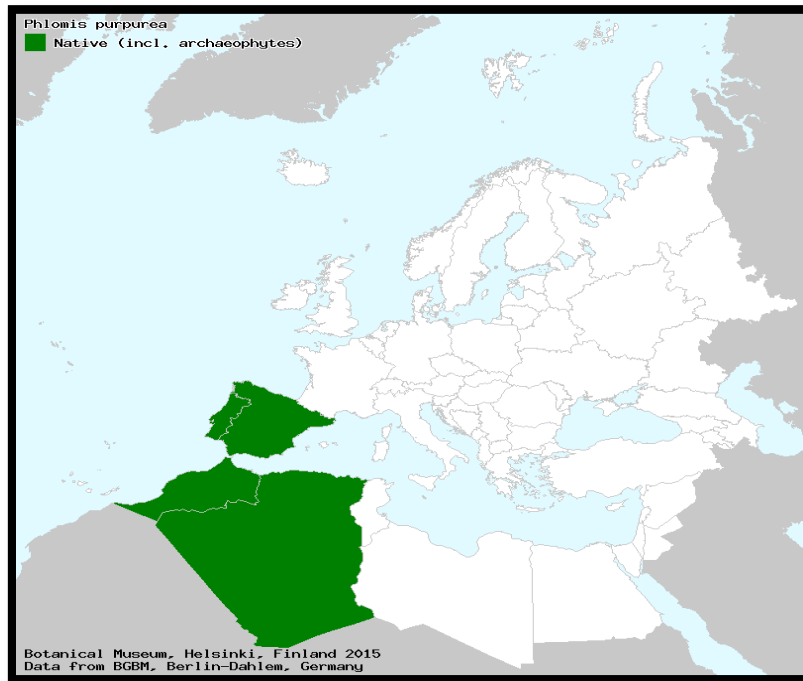


Figure.9 : les pays d'origine du *Phlomis purpurea* L.

1.9.2. Description generale du *Phlomis purpurea* L.

Les tiges et les rameaux de cette phlomide sont pubescents



Figure.10 : photo présente les tiges du *Phlomis purpurea* L.

Ses feuilles opposées, lancéolées, aiguës, pétiolées, verdâtres est simplement pubescentes en leur face supérieure, très – cotonneuses et blanchâtres en leur face inférieure.



Figure.11 : photo des feuilles du *Phlomis purpurea* L.

Les fleurs sont disposées par verticilles peu fournis et munis de bractées lancéolées , aiguës et très piquante .elles sont hermaphrodites.

Le calice de chaque fleur est anguleux, velu, à cinq dents acuminées.

La corolle est purpurine, à casque oblique. cette espèce est indigène de l'Espagne et du Portugal. [10]



Figure.12 : photo présente la fleur du *Phlomis purpurea* L.

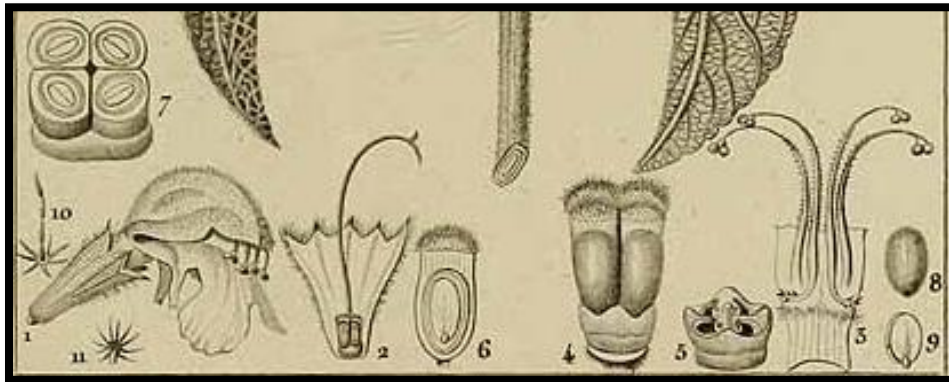


Figure.13 : les différentes parties de la fleur du *Phlomis purpurea* L. [11]

1. la fleur entière
2. calice ouvert pour faire voir le pistil
3. tube ouvert d'une corolle
4. fruit porté par le corps glanduleux
5. corps glanduleux
6. l'un des quatre lobes du fruit
7. fruit coupé horizontalement

8. graine

9-embryon, 10.11- poils stellaires.

Les fruits sont des sortes de petites capsules à 3 angles, contenant des semences oblongues, à trois angles, au nombre de quatre. [10]



Figure.14 : photo de capsules du *Phlomis purpurea* L.



Figure.15 : les semences du *Phlomis purpurea* L.

Ce *Phlomis* est une plante de culture facile et de croissance rapide qu'il faudra placer au soleil, en sol bien drainé et à tendance sèche. Elle peut être plantée en sol pauvre ou calcaire et en rocaille. En hiver elle pourra supporter des températures jusqu'à environ -10°C .

La Densité de plantation par m^2 : 2

La Période de plantation au mois d'avril, mai et de floraison de la plante a lieu au mois du mai juin puis septembre octobre.

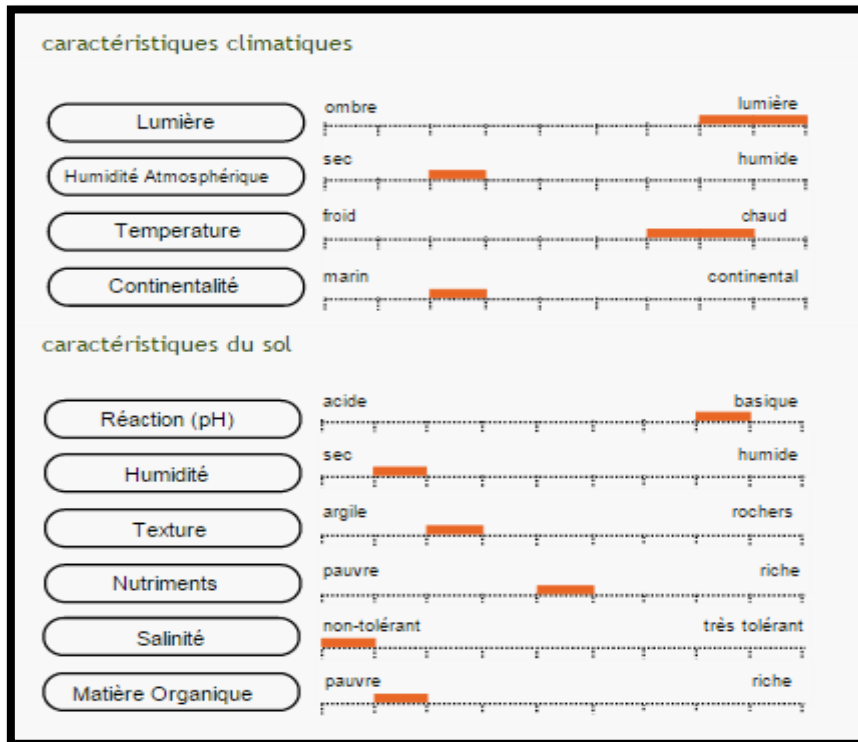


Figure.16 : Optimums écologiques du *Phlomis purpurea* L. [12]

1.9.3. Multiplication :

Puisqu'ils hybrident, la meilleure méthode est de les multiplier par bouturages ou par divisions.

1.9.4 Maladies et ravageurs :

Cicadelles : Sont des insectes suceurs de l'ordre des hémiptères, qui se nourrissent de la sève des végétaux grâce à leur rostre. [6]

1.10 Position systématique de l'espèce *Phlomis purpurea* L. :

La systématique végétale est la partie de la botanique qui a pour objet le groupement des plantes en des classes ou systèmes, en prenant en compte les caractères morphologiques, cytologiques, biochimiques et de biologie moléculaire.

Classification de Cronquist (1981)

Règne	Plantae
Division	Tracheophyta
Sub-division	Spermatophytina
Classe	Magnoliopsida
Super-ordre	Asteranae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae Lindl.
Genre	<i>Phlomis</i> L.

Nom binominal *Phlomis purpurea* L. ,1753

Classification APG II (2003)

Ordre	Lamiales
Famille	Lamiceae

Classification APG III (2009)

Ordre	Lamiales
Famille	Lamiceae
Sous-famille	Lamioideae
Espèce	<i>Phlomis purpurea</i> L.

1.11. Utilisation du *Phlomis purpurea* L.

Plantes précieuse dans les jardins secs, rocailles, talus bien exposé, plates-bandes ensoleillées. Feuillage agréable et floraison décorative.

La plante entière est traditionnellement utilisée dans la médecine traditionnelle méditerranéenne comme un remède anti incendiaire (anti-inflammatoire). Il contient des polyphénols, qui montrent des propriétés d'antioxydant intéressantes pour le traitement de pathologies inflammatoires associées au stress oxydatif dans des humains, y compris la maladie d'intestin inflammatoire) (IBD)

Source importante des huiles essentielles.

1. Définition générale :

Un métabolite est un composé organique intermédiaire ou issu du métabolisme. On réserve ce terme en général aux petites molécules et aux monomères, par opposition aux macromolécules. Ainsi, le glucose est un métabolite, contrairement au glycogène, qui est un polysaccharide de poids moléculaire très élevé.

1.1. Les métabolites primaires :

Les métabolites primaires sont des molécules présentes dans toutes les cellules de l'organisme et indispensables à sa vie. Ils sont : les sucres, les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques.

1.2. Les métabolites secondaires :

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes. Telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques [44]. Les métabolites secondaires (SM) sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Dont plus de 200.000 structures ont été définies [45] et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

1.2.1. Classification des métabolites secondaires

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine [46].

Principales substances actives végétales :

Chaque espèce végétale contient un certain nombre de substances, lesquelles procèdent de métabolisme et s'élaborent comme produit secondaire.

Les métabolites secondaires sont les produits à structure chimique souvent complexe, on recense plusieurs milliers de métabolites (au moins 30 000 structures caractérisées) et sont classées selon leur appartenance chimique [38] Parmi ces substances on trouve les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les huiles essentielles et les alcaloïdes qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

1.2.2. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal

Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement [29] A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés [47] Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) [48]. Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse Moléculaire peut atteindre 9000 [39]

- Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué. La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques [29]

- Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs.

Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportant le reste [49]

Les recherches des dix à quinze dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans de

processus vitaux les plus divers. Le mode de leur action et sa signification physiologique ne sont pas encore toujours claires. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement, la verticilliose. Le phénomène d'accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones proximales est également observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques [50] et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre [51].

Des travaux plus anciens [52] ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ces propriétés antifongique et antibactérienne [53]. Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons : les flavanones sont responsables de l'amertume des Cistus et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée [54], les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs.

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

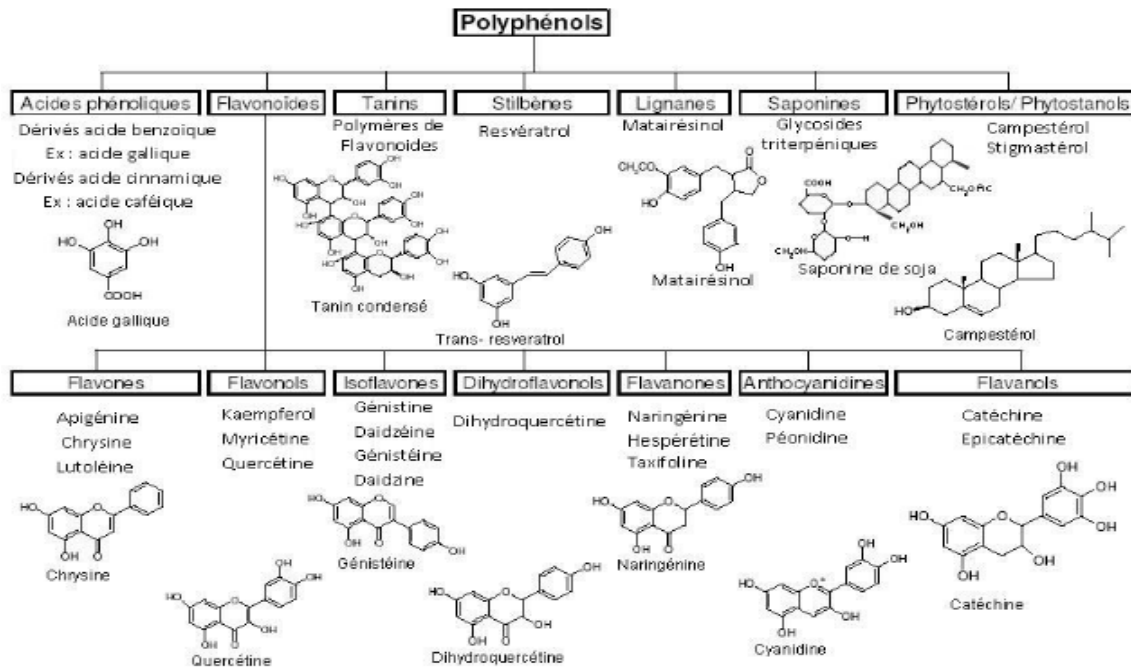


Fig.17 : Les différentes classes des composés phénoliques

1.2.2.1. Biosynthèse :

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de la l'acide shikimique . Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines [29]

1.2.2.2. Les flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante [13]. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques [55], dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance [56]. Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus [57] et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane [13].

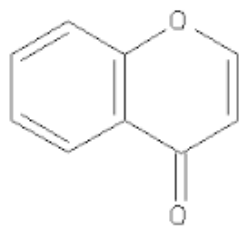


Figure.18 : Structure du 2-phényle chromane

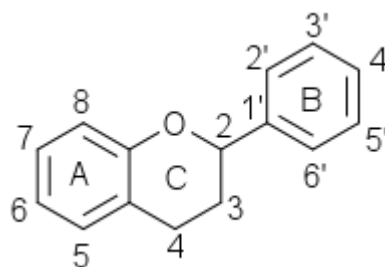


Figure.19 : Structure générale des flavonoïdes

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C2-C3, du groupe 3-Oet la fonction 4-oxo [13] En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003)

Tableau.1:Principales classes des flavonoïdes [14]

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

1.2 .2.2.1. Répartition :

Les flavonoïdes sont surtout abondants chez les plantes supérieures, particulièrement dans certaines familles : Polygonacées, Rutacées, Légumineuses, Ombellifères et Composées [33]. La présence de flavonoïdes chez les algues n'a pas, à ce jour, été démontrée. S'ils sont fréquents chez les Bryophytes (Mousses et Hépatiques), ce sont toujours des flavonoïdes stricto sensu. Majoritairement des O et C-Hétérosides de flavones et des dérivés O-uroniques. Chez les Ptéridophytes la variété structurale des flavonoïdes n'est guère plus grande, les Psylotales et Sélaginellales étant caractérisées par la présence de biflavonoïdes, les Equistérales par celle de proanthocyanoides. Les O-hétérosides de flavonols. Dominent chez les fougères qui, pour certaines, élaborent également les chalcones ou Chez les Gymnospermes, les proanthocyanidols. Ils sont remarquablement constants et l'on note la présence, chez les Cycadales et les Coniférales (à l'exception des Pinacées, de biflavonoides des absents chez les Gnétales. C'est chez les Angiospermes que la diversité structurale des flavonoides est maximale : ainsi, une trentaine de types flavonoidiques ont pu être identifiées chez les Astéracées [29].

1.2.2.2. Localisation :

Présents dans les organes aériens, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes feuilles et boutons floraux [33]. Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, hydrosolubles, s'accumulent dans des vacuoles et, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle (mais ces deux tissus peuvent accumuler spécifiquement des substances différentes. Comme cela a été démontré chez certaines Céréales, dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques [29]

1.2.2.3. Utilisation thérapeutique :

Par delà les résultats partiels fournis par des tests biochimiques ou des études de pharmacologie animale, la réalité de l'efficacité clinique de la plupart des flavonoïdes et, a fortiori, celle des drogues qui en contiennent est rarement correctement établie. Les essais chez l'homme ne sont assez souvent que des observations et ne sont pas toujours conduits en conformité avec les normes actuellement en vigueur pour un type d'évaluation.

C'est essentiellement dans le domaine capillaro-veineux que l'on utilise les flavonoïdes ; seuls ou associés, ce sont les constituants habituels des vasculo-protecteurs et veinotoniques et des toniques utilisés en phlébologie. La plupart des spécialités actuellement disponibles ont des indications ou propositions d'emploi suivantes :

- Traitement des symptômes en rapport avec l'insuffisance veinolymphatique (jambes lourdes, douleurs, impatiences des primo-décubitus).
- Traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire.

Quelques spécialités revendiquent en plus d'autres indications ou propositions d'emplois :

- Amélioration des troubles de la fragilité capillaire au niveau de la peau.
- Traitements des métrorragies lors de la contraception par microprogestatifs et des métrorragies dues au port du stérilet.
- Proposé dans les troubles impliquant la circulation rétinienne et/ou choroïdienne.
- Traitement du lymphoedème du membre supérieur après traitement radio-chirurgical du cancer du sein [29]

1.2.2.3. Les tanins :

On appelle communément « Tanins » des substances d'origine végétale, non azotées, de structure polyphénolique, soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther, de saveur astringente et ayant la propriété commune de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible et imperméable en se fixant sur les protéines. Leur poids moléculaire varie de 500 à 3000. Dans les plantes, les tanins existent à l'état de complexes, les tannoïdes; certains combinés à des sucres sont dénommés tanosides [32] Les tanins sont très importants dans l'industrie des cuirs, ils agissent en donnant des combinaisons insolubles avec les protéines et rendent ainsi les peaux moins perméable à l'eau et imputrescibles [33]

1.2.2.3.1. Répartition et localisation :

Les tanins très répandus dans le règne végétal, sont particulièrement abondants dans certaines familles ; exemples : Cupulifères, Polygonacées, Rosacées, Légumineuses, Myrtacées, Rubiacées.

Ils peuvent exister dans divers organes : racines ou rhizomes (Ratanhia, Rhubarbe), écorce (Chêne, Quinquina), bois (Acacia à cachou). Cependant, on note une accumulation dans les écorces âgées et les tissus d'origine pathologique (Galles) [33] On les rencontre dans les vacuoles des cellules, souvent combinés à d'autres substances : alcaloïdes, protéines, oses (Tanosides), parfois dans des cellules spécifiques (idioblastes) : ils sont aisément caractérisés par leur coloration brune ou verdâtre ou brune bleuâtre avec des sels ferriques. La teneur en tanins peut être très élevée : 50% à 70% dans les noix de galles, 20% dans les péricarpes du noyer, la racine de bistorte, 15% dans la racine de ratanhia, etc.... [32]

1.2.2.3.2. Structure chimique et classification :

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique, les tanins hydrosolubles et les tanins condensés.

- Tanins hydrolysables :

Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide phénol. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques. Soit l'acide hexahydroxy diphénolique, dans le cas des tanins classiquement dénommés tanins ellagiques [29]

- Tanins condensés :

Les tanins condensés ou tanins catéchiques sont des substances qui ne sont pas hydrolysées par les acides, ni par la tannase. Les acides forts à chaud ou les agents d'oxydation les convertissent en substances rouges ou brunes, insolubles dans la plupart des solvants. Par distillation sèche, ils fournissent du pyrocatéchol. Ces tanins dérivent des catéchols par condensation de molécules et ils sont d'ailleurs toujours accompagnés de catéchols dans les plantes fraîches [32]

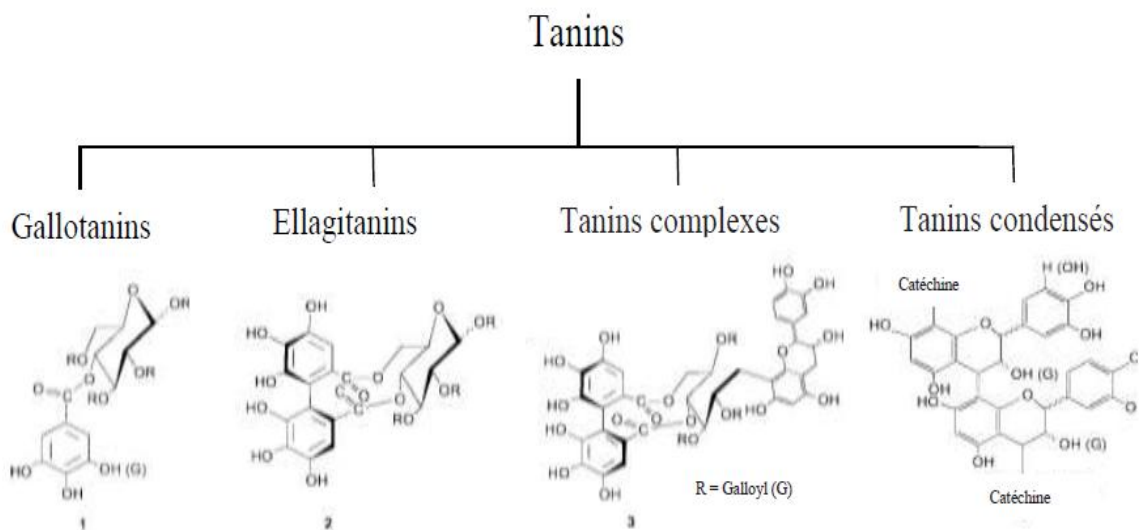


Figure.20 : Différentes structures des tanins [15]

1.2.2.3.3. Utilisation thérapeutique :

Les drogues à tanins servent surtout en thérapeutique pour leurs propriétés astringentes à l'extérieur et antidiarrhéiques en usage interne, Sur la peau et les muqueuses. Il s'ajoute une action vaso-constrictrice des petits vaisseaux, d'où l'emploi contre les hémorroïdes, les blessures superficielles. Les extraits tanniques sont aussi anti-inflammatoires dans les brûlures. Les drogues à tanins sont employées contre les diarrhées (Ratanhia, Salicaire). À l'action ralentissante du péristaltisme intestinal, s'ajoute l'action antiseptique ; les tanins libres étant détruits rapidement par le suc intestinal alcalin. On emploie de préférence les combinaisons tanniques et mieux les extrais végétaux complexes qui libèrent graduellement leurs tanins au cours de la digestion.

Il a été constaté que certains extraits tanniques comme ceux des *Acer* inhibaient la croissance de champignons, de bactéries, de virus. Ceci justifie l'emploi de drogues à tanins comme antiseptiques notamment dans les maladies pulmonaires [32]

1.2.2.4. Les anthocyanidines :

Les anthocyanidines ne possèdent pas de groupe OH à la position 4 et ont double liaison entre les positions 3 et 4. Les plus importants sont : pélargonidine, cyanidine et péonidine.

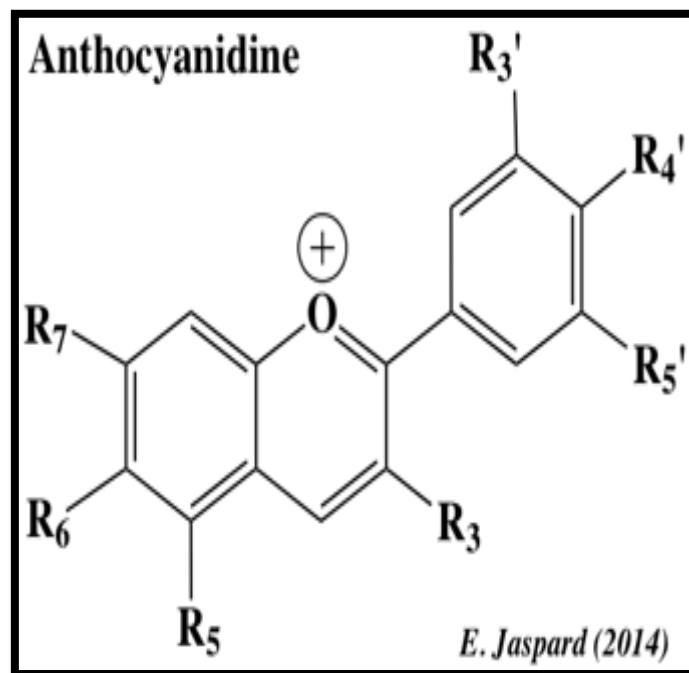


Figure.21 : Structure chimique d'anthocyanes

1.2.2.5. Les saponosides :

On entend par saponosides (mot latin « sapon », savon ; « saponaire », l'herbe à savon), des hétérosides à aglycones de structure stéroïde ou triterpéniques qui tiennent une grande place parmi les substances d'origine végétale [58].

1.2.2.5.1. Les propriétés biologiques des saponosides :

Les saponosides ont une activité expectorante, ils rendent un peu moussant la muqueuse des bronches inflammatoires et facilitent l'expectoration. De plus, ils sont de puissants hémolysants, ils possèdent également des propriétés édulcorantes, largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire [29]

D'autre part les travaux de [59] ont mis en évidence l'activité antifongique de saponosides triterpéniques extraits du lierre sur les levures et les dermatophytes. Dans un même ordre d'idée, les saponosides l'hédérine ont montré une activité antitumorale et antibactérienne.

1.2.2.6. Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont des molécules d'origine naturelle. On les trouve principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et chez certains micro-organismes.

Leur structure chimique de base est un hétérocycle azoté sauf pour quelques substances dans lesquelles l'azote est extra cyclique (c'est le cas de la colchicine et de l'éphédrine par exemple). Il existe plus de six mille alcaloïdes mais ce chiffre est en constante augmentation [38]

1.2.2.6.1. Propriétés biologiques des alcaloïdes :

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène du point de vue de leur structure, de leurs propriétés et de leurs effets biologiques.

Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique.

Les alcaloïdes sont aujourd'hui nommés d'après la plante qui les a fournis, toujours avec une terminaison en "ine". D'une façon générale, les alcaloïdes sont amers et utilisés comme apéritifs [29]

1.2.2.7. Les coumarines :

Les coumarines sont des substances naturelles connues, Il s'agit de composés à neuf atomes de carbone possédant le noyau benzo (2 H)-1 pyrannone-2. Ce composé dériverait de la cyclisation de l'acide cis cinnamique oxygéné en C-2 [63]. Les coumarines tirent son nom de kumarú, nom vernaculaire de la fève tonka *Coumarouna odorata* encore appelée *Disteryx odorata* Willd. Elles sont très largement distribuées dans le règne végétal. La coumarine et ses dérivés dont plus de 300 structures sont connues, se répartissent dans 9 familles de Monocotylédones et plus 70 familles Dicotylédones. Ils participent dans les racines des plantes symbiotiques hébergeant *Rhizobium*, à la formation des nodules. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique de l'aspérule odorante et du mélilot desséché.

1.2.2.7.1. Classification :

Les coumarines sont substituées par un hydroxyle ou plus sur les six positions disponibles. La majorité des coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. Les auteurs [64 - 65] ont classé les coumarines selon la nature des substituants sur leurs structures en cinq catégories :

- Coumarines simples
- Furanocoumarines
- Pyranocoumarines
- Dicoumarines (coumarines dimériques)
- Tricoumarines (coumarines trimériques)

1.2.2.7.2. Intérêt des coumarines

Les coumarines ont des propriétés antipyrétique, analgésique, sédative, antioedémateuses et anti convulsivante. Ils sont probablement responsables de l'effet anticonvulsivante. Les coumarines ont indiquées dans les cas de lymphoedème du membre supérieur après traitement radiochirurgical du cancer du sein. Concernant les dérivés coumariniques, certains d'entre-eux possèdent des activités pharmacologiques, principalement anticoagulantes. Les plus connus sont le dicoumarol et l'esculoside, tout deux veinotoniques et vasculoprotecteurs [60]

1. Activité antibactérienne :

Malgré les avancées spectaculaires dans les recherches pharmaceutiques, l'apparition et le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques est devenu un défi médical mondial. Les professionnels de la santé ne cachent pas leurs inquiétudes suite aux développements des bactéries multi-résistantes. Ces dernières provoquent des infections qui ne réagissent plus aux antibiotiques. Selon l'OMS, plus de 1,4 million de personnes dans le monde sont victimes des infections nosocomiales provoquées par les bactéries résistantes aux traitements et contractées lors des soins médicaux. Il est à noter que 70% des infections nosocomiales lourdes sont osseuses. Les fréquences maximales ont été rapportées dans les hôpitaux des régions de la méditerranée orientale et de l'Asie du Sud- Est (11,8% et 10,0% respectivement), et la prévalence atteignait 7,7% en Europe et 9,0% dans le pacifique occidental.

Par ailleurs, les plantes possèdent un système de défense naturelle très efficace, basé sur la biodiversité de leurs métabolites secondaires. Cette diversité, des groupes structuraux et fonctionnels, permet de se protéger efficacement contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus.

Les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes [16], d'où l'intérêt de la recherche et le développement de la phytothérapie. Justement dans cette optique, plusieurs instituts de recherches ont procédé à des investigations dans l'étude de l'activité biologique de plantes médicinales originales de diverses régions du monde. Ces travaux sont basés sur l'usage populaire des espèces natives. Certains extraits et huiles essentielles de plantes se sont montrés efficaces dans l'inhibition de la croissance d'une grande variété de souches bactériennes.

D'autre part, les risques de contamination microbienne provenant de la manipulation et la conservation des aliments sont de plus en plus fréquents. En outre, la demande croissante à des méthodes de conservation des aliments avec des produits naturels, nécessite le développement de 42 nouvelles méthodes de conservation basées sur l'ajout d'extraits de plantes. Ces méthodes de conservation représentent un besoin vital et pourraient éventuellement être une alternative aux antimicrobiens de synthèse. Il est donc nécessaire de développer des outils aiguisés pour tester l'activité antimicrobienne des produits naturels. On rapporte ci-dessous quelques techniques d'analyse de l'activité antibactérienne.

1.1 Quelques bactéries

1.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, également appelée colibacille et abrégée en *E. coli*, est une bactérie intestinale (Gram négatif) des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de chèvres, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. Coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou sepsis.



Figure.22 : Bactérie d'*Escherichia coli*

1.1.1.1. Description

Escherichia coli est un bacille gram négatif radorésistant de la famille des *Enterobacteriaceae*. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3 µm), pesant de 0,5 à 5 picogrammes [17] les bactéries en croissance rapide étant plus allongées et donc plus grandes que les bactéries quiescentes.

C'est un hôte commun du microbiote intestinal (anciennement appelé microflore commensale intestinale) de l'Homme et des animaux homéothermes. Son établissement dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent l'accouchement. *E. coli* constitue alors tout au long de la vie de l'hôte l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie facultative intestinale. *E. coli* est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour : en effet, l'ancienneté de sa découverte et sa culture aisée (division

cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche) en font un outil d'étude de choix. La profusion de publications scientifiques qui la mentionnent en témoigne, et elle joue le rôle de « cheval de labour » dans tous les laboratoires de biologie moléculaire.



Figure.23 : Culture de Bactérie d'*Escherichia coli*

1.1.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae* [18] Il a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 μm , est immobile, asporulé et facultativement anaérobique (sauf *S. aureus anaerobius*) ; il est habituellement disposé en grappes. De nombreuses souches produisent des entérotoxines staphylococciques, la toxine superantigénique du syndrome de choc toxique (TSST-1) et des toxines exfoliatives. *Staphylococcus aureus* fait partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau. [19]

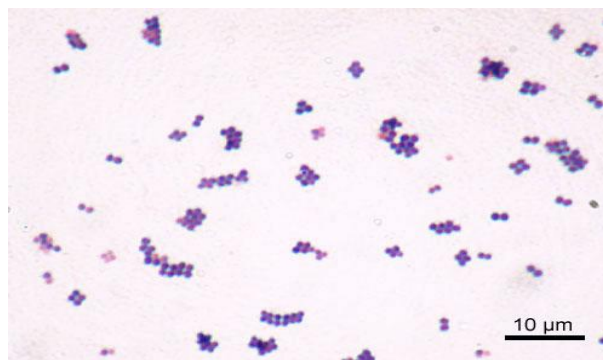


Figure.24 : Bactérie de *Staphylococcus aureus*

1.1.2.1. Pathogénicité et toxicité

Staphylococcus aureus est un pathogène opportuniste qui peut causer diverses maladies chez les humains, allant des affections qui évoluent spontanément vers la guérison à des pathologies mortelles [20]. Cette bactérie est une des principales causes de toxi-infections alimentaires, résultant de la consommation d'aliments contaminés par des entérotoxines. L'intoxication alimentaire par les staphylocoques se caractérise par une apparition brutale de nausées, de vomissements, de douleurs abdominales, de crampes et de diarrhée. Les symptômes disparaissent habituellement après 24 heures [21]. Les morsures d'animaux peuvent entraîner des infections locales, une cellulite, un érythème, une sensibilité, une fièvre légère, une adénopathie et une lymphangite (rare). L'érythrodermie bulleuse avec épidermolyse est causée par des toxines exfoliatives sécrétées sur l'épiderme et elle touche surtout les nouveau-nés et les jeunes enfants. D'autres affections cutanées peuvent être causées par ces toxines exfoliatives : phlyctènes, perte cutanée, papules, furoncles, impétigo, folliculite, abcès, piètre contrôle thermique, perte de liquide et infection secondaire.

S. aureus peut également causer une fasciite nécrosante chez les sujets immunodéprimés, mais c'est très rare [22]. La fasciite nécrosante est une maladie potentiellement mortelle qui s'accompagne d'une importante morbidité.

2. Les antioxydants

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés pour lutter contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres (**tableau 02**).

Ces derniers sont produits quotidiennement par l'organisme ; ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux [23] Ils deviennent cependant nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides [28]. Des acides nucléiques en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, l'artériosclérose [23].

Des systèmes de défense permettent de prévenir la formation radicalaire ou de limiter les lésions d'oxydation résultantes. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle [24]

Tableau.2 : Liste des principaux radicaux libres

Radical	Formule
Anion superoxyde	O_2^-
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Hydroxyle	OH^\cdot
Peroxyle	ROO^\cdot
Hydroperoxydes	$ROOH$
Alcoxydes	RO^\cdot
Oxygène singulet	$1/2O_2$
Oxyde nitrique	NO^\cdot

2.1. Les antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge [25]

2.2. Les antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes sont présents dans l'alimentation tels que les vitamines A, C, E et les polyphénols en particulier les flavonoïdes, ainsi que les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes anti-oxydants endogènes comme le sélénium, le zinc et le manganèse. De nombreuses molécules issues de notre alimentation : vitamines, nutriments, composés naturels,...etc. sont considérés comme des antioxydants [26]. Notons à titre d'exemples, les plus:

- La vitamine E : Le principal anti-oxydant nutritionnel est la vitamine E (essentiellement l' α -tocophérol), liposoluble, puissant anti-oxydant mais qui peut avoir des effets délétères à très forte dose [27]
- L'ascorbate ou vitamine C : est l'antioxydant hydrosoluble majeur, réagit rapidement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, ou encore avec le peroxyde d'hydrogène. Elle est indispensable par sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes [28]
- Les caroténoïdes : sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules notamment le lycopène et le 2-carotène, précurseurs de la vitamine A. Ils sont présents dans les carottes, les fruits rouge et jaunes, les légumes verts et les tomates [24]
- Les flavonoïdes: Ce sont des substances naturelles présentes dans tout le règne végétal. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer le cuivre ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène comme la xanthine oxydase [29]
- Les tanins : sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides .

- Les coumarines: Ils sont capables de piéger les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes, importants dans la prévention de la peroxydation des lipides membranaires et ils ont une activité antiperoxydante [29]
- Le sélénium: IL neutralise les métaux toxiques en particulier le plomb et le mercure. IL aurait aussi une action préventive sur certains cancers [24]

➤ **Evaporateur rotatif**

L'évaporateur rotatif (ou rotavap, ou rotavapor) est un appareil utilisé en chimie afin de distiller rapidement des solvants, dans le but de concentrer partiellement une solution ou pour concentrer à sec (on enlève tout le solvant) une solution ou une suspension. Le principe de cet appareil est basé sur la distillation simple sous vide, qui permet d'éliminer rapidement de grandes quantités de solvant, bien que partiellement. La solution est mise en rotation dans un ballon adapté pour éviter des bulles d'ébullition trop grosses ou mousseuses, pour augmenter la surface en contact avec l'air ainsi que pour éviter l'aspiration de la solution lors de la baisse de pression (grâce à la force centrifuge qui la plaque contre les parois du ballon). Ensuite, la pression est diminuée grâce, généralement, à une trompe à eau et la solution est chauffée -en fonction du solvant à éliminer- pour compenser le caractère endothermique de la réaction.

L'évaporateur rotatif est typiquement un appareil de laboratoire.

Il est constitué de différentes parties :

- Un bain-marie d'eau afin de chauffer la solution à concentrer
- Un ballon dont la forme est adaptée.
- Un réfrigérant qui condense les gaz
- Un ballon réceptacle dans lequel les gaz condensés sont recueillis.
- Un dispositif qui fait tourner le ballon suivant son axe de symétrie afin de permettre une homogénéisation du milieu et une évaporation tranquille.

Lyman C. Craig a créé un premier modèle simple d'évaporateur rotatif en 1950 [30]. Le dispositif a été commercialisé pour la première fois en 1957 par l'entreprise suisse Büchi.

➤ **Dosages des phénols totaux**

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu (1927) est la plus utilisée.

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune 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 [61]

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [62]

➤ **Spectrophotomètre**

Un spectrophotomètre est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution, à condition de se placer à la longueur d'onde à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux. C'est pourquoi la longueur d'onde est réglée en fonction de la substance dont on veut connaître la concentration. [6]

Partie II

Partie Expérimentale

Chapitre 01

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

Notre étude apportée sur l'espèce de plante : *Phlomis purpurea* L. de la famille des lamiaceae.

Nous somme intéressé par les métabolites secondaires et aussi de quelque molécules bioactives et quelque activités biologiques, et nous avons fait des études phytochimiques sur cette plante et on a utilisées dans cet étude trois parties de cette plante qui sont : feuilles,

Tiges et fleurs.

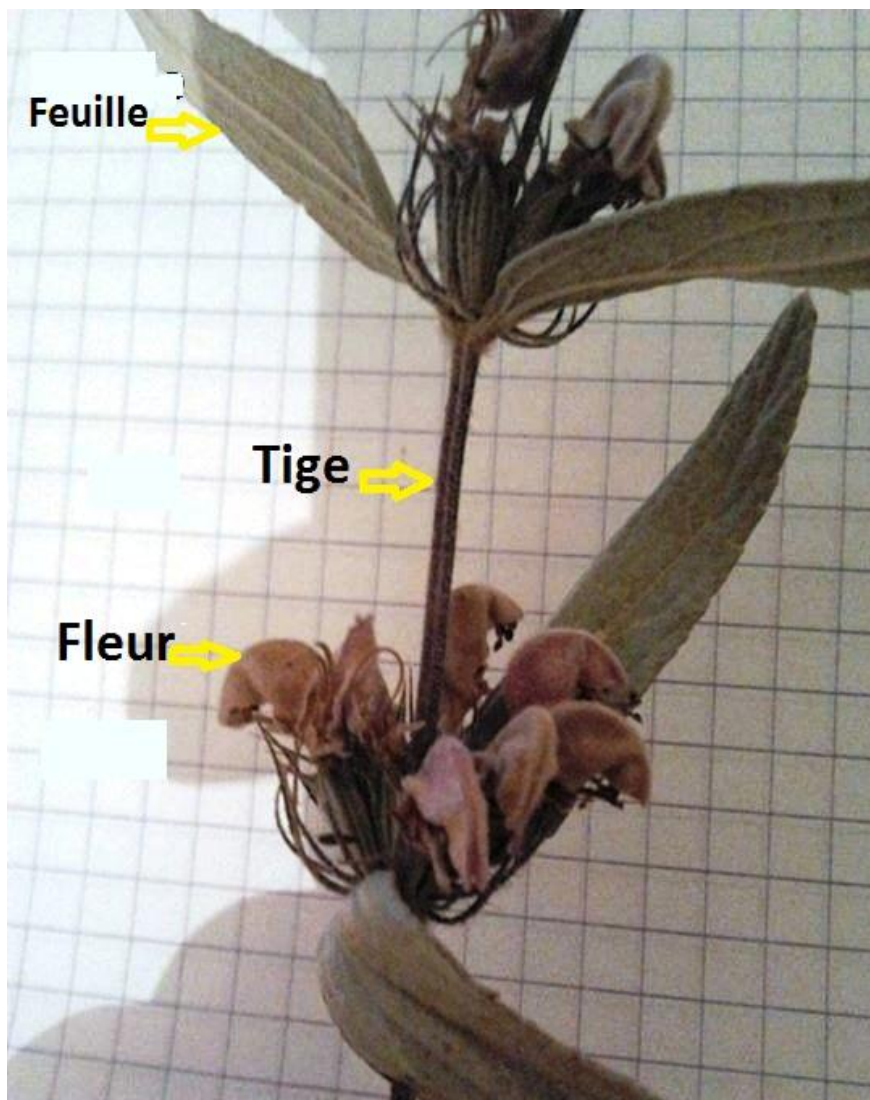


Figure.25 : La plante *Phlomis purpurea* L.

1.1. Récolte du matériel végétal

L'espèce sélectionnée *Phlomis purpurea* L. a été récolté dans la région de son habitat naturel durant le mois de mai 2014 période de pleine floraison.

La récolte est effectuée dans la région de Touzline (wilaya d'Oum el bouagui).

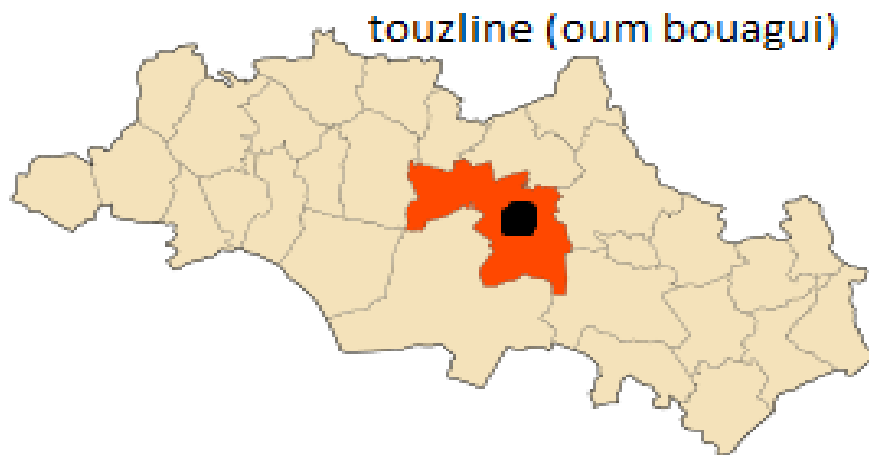


Figure.26 : Carte géographique qui indique la région de la plante étudiée

1.2. Conservation de la plante

Les différentes parties de *Phlomis purpurea* L. sont nettoyées, séchées à l'ombre et à température ambiante (25-27°), puis stockées (conservées) à l'abri de la lumière. Les parties utilisées sont: les feuilles, les fleurs et les tiges

1.3. Broyage

Différentes parties d'espèce sont broyées finement et entièrement à l'aide d'un moulin électrique.



Figure.27 : Le matériel végétal broyé (Tiges)

2. Les tests phytochimiques

L'espèce sélectionnée fait l'objet d'une étude phytochimique qui consiste à détecter les composants chimiques existant dans la plante. Quatre solvants de polarités différentes (eau, méthanol, éther de pétrole, chloroforme) ont été utilisés au cours de ces tests qui sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation, ainsi que des examens en lumière ultraviolet.

2.1. Epuisement de l'extrait végétal hydro-alcoolique

Après le broyage du matériel végétal, 25g sont mis en contact avec 100 ml de méthanol plus l'eau distillée dans un flacon pendant 24 heures. Le mélange est filtré et l'extrait méthanolique est soumis aux différents tests.



Figure.28 : Les extraits méthanolique préparés

2.1.1. Criblage des Flavonoïdes

Le criblage des flavonoïdes se réalise à partir de l'extrait Hydro-alcoolique des différentes parties de la plante, et réparti dans des tube, pour ajouter quelques gouttes des réactifs suivants les deux tests

- Test de Wilstater

Traiter 5 ml de l'extrait préparé avec 1ml de l'HCl concentré. Ajouter tout doucement quelques fragments de tournures de Magnésium (laisser agir) sous la haute. La présence des Flavones est confirmée par l'apparition d'une couleur virage au rouge pourpre (Flavonols), rouge violacées (Flavanones et Flavanols) [29]

- Test de Bate-Smith

Additionner dans chacun des 4 tubes l'HCl concentré (0,5ml) et porter au bain marie à trente minutes. L'apparition d'une Coloration rouge dénote la présence de Leucoanthocyanes qui sont des dérivés du Flavan-3,4-diols.

2.1.2. Criblage des Tanins

100 mg d'extrait hydro-alcolique sont dissout dans 25ml de l'eau distillée chaude puis additionner de trois à quatre gouttes de NaCl 10 %. La solution ainsi obtenue est filtrée, le filtrat est ensuite réparti dans quatre tubes à essai le 4ème tube servant de témoin .

[34]

- Tube N° 1 : addition de quatre à cinq gouttes de gélatine à 1 % ;
- Tube N° 2 : addition de quatre à cinq gouttes de gélatine salée ; gélatine (1%) + Na CL (10%). L'apparition d'une précipitation par la gélatine salée signifie la présence de tanins.
- Tube N° 3 : addition de quatre à cinq gouttes de FeCl₃ en solution méthanolique. Une coloration :
 - ✓ Bleu-vert ou vert noir est dû aux tanins du type catéchols.
 - ✓ Noir bleuâtre signifie la présence de tanins de type pyrogallols.
 - ✓ Une réaction négative à la salée accompagnée d'une coloration verte ou bleu noir avec FeCl₃ ; sont dues à la présence de deux types de composés phénoliques.

2.1.3. Criblage des Stérols et Stéroïdes

Dépigmenter 100mg de l'extrait hydro-alcoolique par addition de 10ml de cyclohexane et agitation pendant 5minutes. Dissoudre le résidu dépigmenté dans 10ml de chloroforme. Sécher la solution obtenue sur Na₂SO₄ anhydre, puis filtrer. Répartir le filtrat dans quatre tubes à essai, le 4ème tube servira de témoin.

Tube N° 1 (test de Salkowski) : Incliner le tube à 45°, ajouter 1 à 2ml de H₂SO₄.

Le changement de coloration est noté immédiatement. Agiter le mélange légèrement et noter le changement graduel de coloration : une coloration rouge indique la présence de stérols insaturés.

· **Tube N° 2** (test de Libermann-Burschard) : Additionner trois gouttes d'anhydride acétique puis agiter légèrement. Ajouter une goutte de H₂SO₄ concentré. Le changement de coloration est observé pendant une heure: une coloration bleu-vert indique la présence de stéroïdes tandis que, le rouge-violet à rose dénote la présence de triterpènes.

Tube N° 3(test de Badjet-Kedde) : Additionner quelques grains d'acide picrique.

L'apparition d'une coloration orange est due aux stéroïdes lactoniques.

2.2. Epuisement du l'extrait végétal Chloroformique et Etherique

25g de matériel végétal sèche (feuilles, fleurs, tiges) sont mis en contact avec 100 ml de chloroforme et d'éther de pétrole dans des flacons pendant 24 heures, le mélange est filtré et l'extrait chloroformique et étherique est soumis aux différents tests.



Figure.29 : Les extraits étherique préparés



Figure.30 : Les extraits Chloroformique préparés

2.2.1. Criblage des anthraquinones

L'extrait chloroformique de chacun des organes. On ajoute KOH aqueux 10%, Après agitation, la présence des Anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge ou rose [34]

2.2.2. Criblage des quinones

1g de matériel végétal (feuille, tige, racine, gel, hampe florale, fleurs(Al), gousse(Ag)) sec et broyé et placé dans des tubes avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole Après agitation et un repos de 24heures, après les extraits sont filtrés.

La présence de quinones libres est confirmée par l'ajoute de quelque goutte de NaOH (1/10), lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet [64].

2.2.3. Criblage des coumarines

✓ Protocole 1 :

La présence des coumarines (composés polyphénoliques) est réalisée en évaporant à sec 5 ml d'extrait étheré. 2ml d'eau chaude sont ajoutés puis 1 ml de NH₄OH a 25%. Le mélange est observé sous UV à 254 nm. L'observation d'une fluorescence bleue intense indique leur présence (Badiaga M, 2011).

✓ Protocole 2 :

Test de détection : 2 g de matériel végétal en poudre sont mélangés à 10 ml de CHCl₃. Après un chauffage de quelques min et une filtration, les extraits chloroformiques sont soumis à une CCM, et le solvant étant le mélange toluène / AcEt (90:10). La visualisation du chromatogramme, après migration, se fait à 254 nm.

2.2.4. Criblage des stérols et stéroïdes et triterpènes

Dépigmenter 100mg d'extrait hydroalcoolique par addition de 10ml de cyclohexane et agitation pendant 5minutes. Dissoudre le résidu dépigmenté dans 10ml de chloroforme.

Sécher la solution obtenue sur Na₂SO₄ anhydre, puis filtrer. Répartir le filtrat dans quatre tubes à essai, le 4ème tube servira de témoin.

- Tube n°1: test de Salkowski: incliner le tube à 45°, ajouter 1 à 2ml de H₂SO₄. Le changement de coloration est noté immédiatement. Agiter le mélange légèrement et noter le changement graduel de coloration : une coloration rouge indique la présence de stérols insaturés.
- Tube n°2: test de Libermann-Burschard : additionner trois gouttes d'anhydride acétique puis agiter légèrement. Ajouter une goutte de H₂SO₄ concentré. Le changement de coloration est observé pendant une heure: une coloration bleu-vert indique la présence de stéroïdes tandis que rouge-violet à rose dénote la présence de triterpènes.
- Tube n°3: test de Badjet-Kedde : additionner quelques grains d'acide picrique. L'apparition d'une coloration orange est due aux stéroïdes lacs toniques.

3. Extraction des Métabolites Secondaires

3.1. L'objectif

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules chimiques contenant dans les parties aériennes de la plante en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.

3.2. Protocole général d'extraction

Pour la macération, on utilise 100 g des parties des feuilles et tiges de la plante *Phlomis purpurea* L., sous forme de poudre dans un bécher contenant un mélange de solvant Méthanol et l'eau distillée (70 : 30), agiter de temps en temps, ensuite couvrir le tout et laisser macérer pendant 48h. Cette macération est répétée 03 fois, ce qui permet d'extraire le maximum de produits. Après filtration, le mélange hydro-alcoolique est concentré à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Cette étape consiste à reprendre le résidu sec avec 100 ml d'eau distillée bouillante

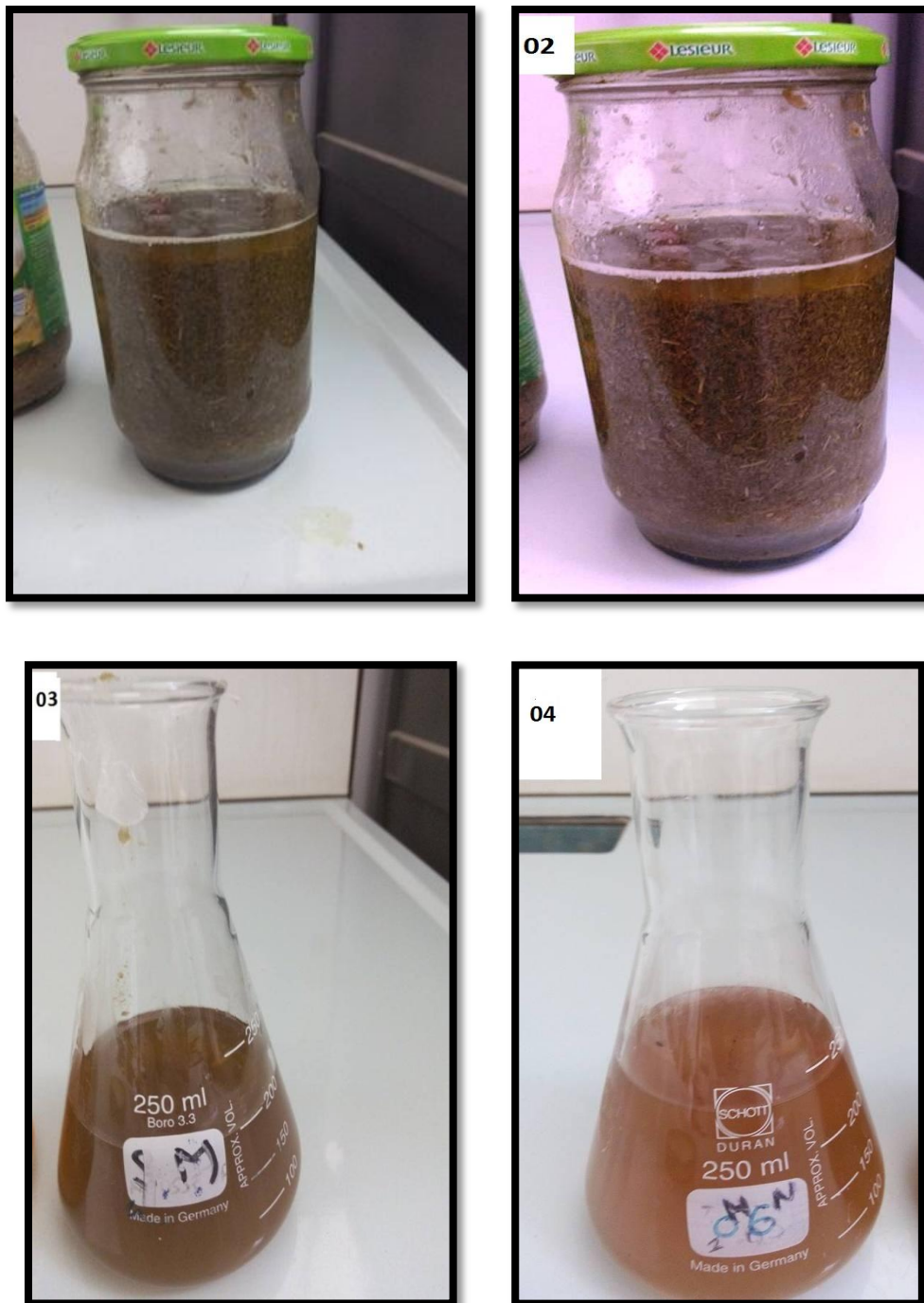


Figure.31 : 1- Macération feuilles

2- Macération tiges

3- Extrait hydro-alcoolique feuilles

4- Extrait hydro-alcoolique tiges

3.3. L'évaporateur rotatif

Un évaporateur rotatif est un appareil de laboratoire utilisé généralement en chimie organique pour évaporer rapidement des solvants après avoir été utilisés dans une extraction

ou dans un milieu réactionnel. Le plus souvent, l'évaporation du solvant est menée sous pression réduite (afin d'accélérer l'étape) que l'on obtient au moyen d'une trompe à eau ou d'une pompe à vide. L'évaporateur rotatif est souvent appelé, par abus de langage, Rotavaporou "Büchi" (noms de deux marques très courantes).



Figure.32 : Evaporateur rotatif

3.4. Les Fractionnement des extraits bruts par extraction Liquide-Liquide (ELL)



Figure.33 : Extraits obtenus par le rotavap des feuilles et tiges

Cette étape permet de séparer les flavonoïdes selon leur structure et leur degré de polymérisation en les affrontant avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire

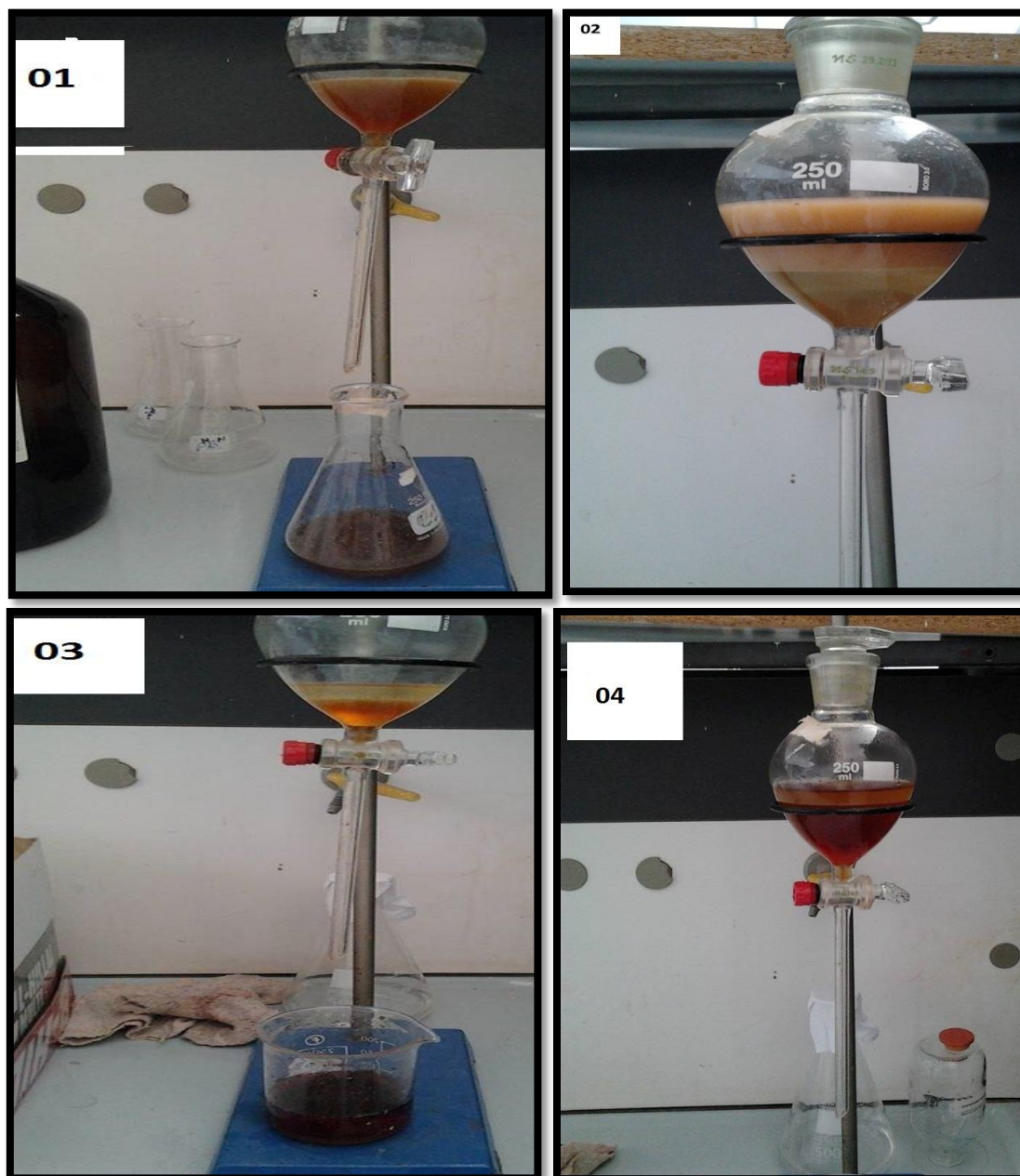


Figure.34 : Photo de l'affrontement des tiges

1- Ether de pétrole

2- Chloroforme

3- Acétate d'éthyle

4- Butanol



figure.35 : Extraits récupérés (tiges)

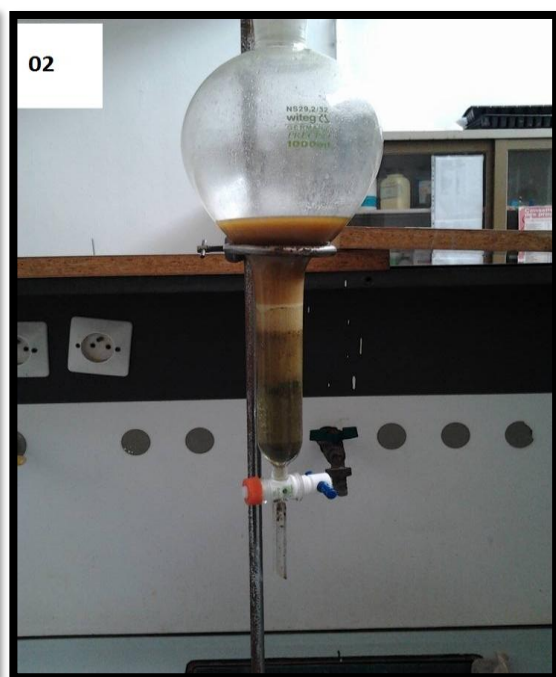




Figure.36 : Photo de l'affrontement des feuilles (1) Ether de pétrole (2) Chloroforme (3) Acétate d'éthyle

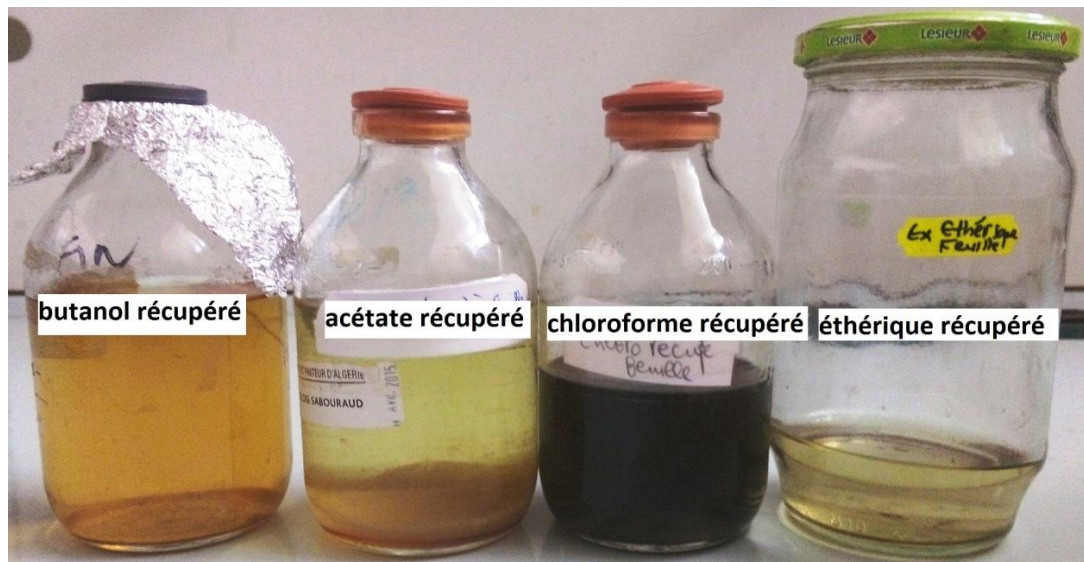


Figure.37 : Extraits récupérés (feuilles)

3.4.1 Fractionnement de l'extrait méthanolique (MeOH) :

La phase aqueuse est affrontée successivement par les solvants suivant :

- ✓ L'éther de pétrole.
- ✓ Le chloroforme.
- ✓ L'acétate d'éthyle.
- ✓ Le Butanol

Ces affrontements se font dans les ampoules à décanner, la phase aqueuse et les solvants

sont mélangés énergiquement en laissant s'échapper à chaque fois les gazes.

Après un repos de 24h en récupère séparément d'une part, et la phase aqueuse d'autre part, le solvant utilisé se charge des composés spécifiques.

La phase d'éther de pétrole ne referme pas des composés phénoliques et elle est rejetée, quant aux autres phases, elles sont évaporées à sec avec le rota vapo à 50°C puis récupérées à 10 ml du méthanol.

4. La Chromatographie Analytique sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une plaque semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium [35]

4.1. Principe

Le principe de la chromatographie sur couche mince repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire. Après que l'échantillon a été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant [35]

4.2. Mode opératoire

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- ✓ La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle.
- ✓ La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 μ m de gel de silice ou d'un autre adsorbant et fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un éluant.
- ✓ L'échantillon : environ un microlitre de solution diluée du mélange à analyser.
- ✓ L'éluant : un solvant pur ou un mélange qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

4.2.1. Préparation de la phase stationnaire (fixe)

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur une plaque d'aluminium recouverte de gel de silice : G60 ; 20 x 20 cm à 0,5 cm d'épaisseur, sont commercialisées

4.2.2. Préparation de la phase mobile (éluant)

A/-Systèmes solvants essayés :

La phase mobile est constituée par un mélange des solvants organiques :

S1 : Acétate d'éthyle / Méthanol / Eau (10 : 1 : 0,5).

S2 : Ether de pétrole / Acétate d'éthyle (8 : 2).

S3 : Hexane / Acétate d'éthyle (8 : 2).

S4 : Butanol / Acide acétique / Eau (4 : 1 : 5).

S5 : Chloroforme / Méthanol (9 : 1).

B/-Systèmes choisis :

S1:Acétate d'éthyle + Hexane (2 : 8)

S2 : le butanol + acide acétique + H₂O (5 : 4 :1).

4.2.3. L'extrait méthanolique

Préparé préalablement suivant le protocole déjà cité

4.3. Le dépôt (15 min.)

Sur la plaque à CCM réalisé successivement les dépôts des différentes substances à chromatographie . Manipuler la plaque à CCM. Pour chaque solution on fera 2 à 3 dépôts successifs (afin de disposer d'une concentration suffisante de produit) au moyen de la micropipette. Le diamètre du dépôt ne doit pas excéder 2 mm. Utiliser le repère tracé au crayon. Séparer les dépôts. Sécher la plaque entre chaque dépôt.

Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations [65].

On peut effectuer plusieurs dépôts successifs de la même solution au même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyté [66].

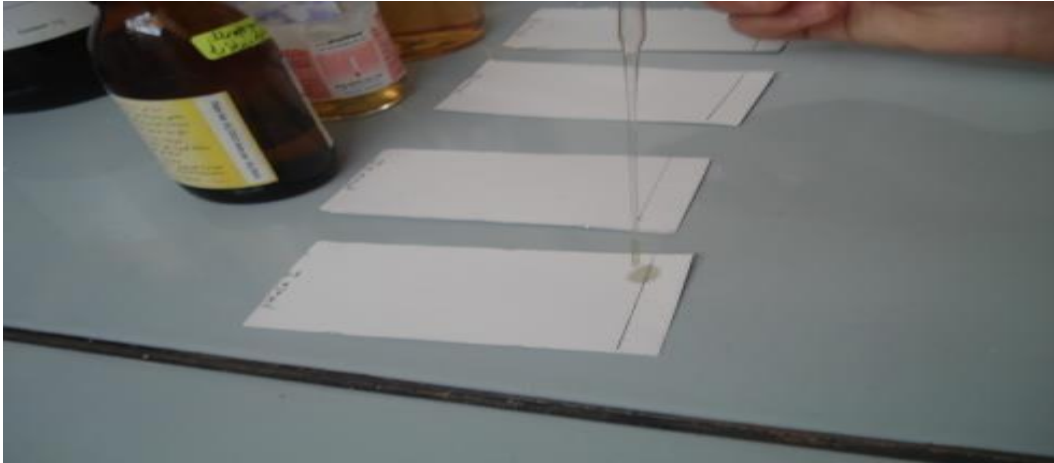


Figure .38 : Dépôt de l'échantillon

4.4. Le développement des plaques

Chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque.

4.5. Migration et séchage (40 min.) :

Une fois l'ensemble des dépôts réalisés, placer rapidement la plaque à CCM dans la cuve. La ligne des dépôts doit être située au-dessus du solvant. Laisser migrer 30 min environ.

Retirer la plaque quand le solvant est arrivé à 1 ou 2 cm du bord supérieur. Marquer, au crayon la limite de migration. Evaporer le solvant en le plaçant sous la hotte aspirante. La plaque doit être incolore.

Si les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque, sinon la révélation (la visualisation) des plaques est effectuée sous :

- la lampe UV, en utilisant deux longueurs d'onde : 254 nm.



Figure.39 : Lumière UV.

5. Dosage des polyphénols

A partir de la solution mère (1mg/ml) de l'extrait méthanolique de l'écorce de plantes étudiée, nous avons préparé deux répétitions d'une même concentration (125 μ l) avec la manière suivante:

Une prise de 125 μ L de l'extrait dilué (SM) est mélangée avec 500 μ L d'eau distillée et 125 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3 minutes, une prise de 1250 μ L de $\text{Co}_3(\text{Na})_2$ 2à7% est additionnée. Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3ml.

Après un repos de 90 minutes à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 760 nm [67].

La gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique à des concentrations variables de 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg.l^{-1} .

Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière séchée ($\text{mgEAG.g}^{-1}\text{MS}$), [68].

6. Etude de l'activité antibactérienne

6. 1. Identification et isolement des souches

On a choisis de travailler sur 2 souches bactériennes (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*) qui sont identifiées par Laboratoire de microbiologie du CHU de Constantine.

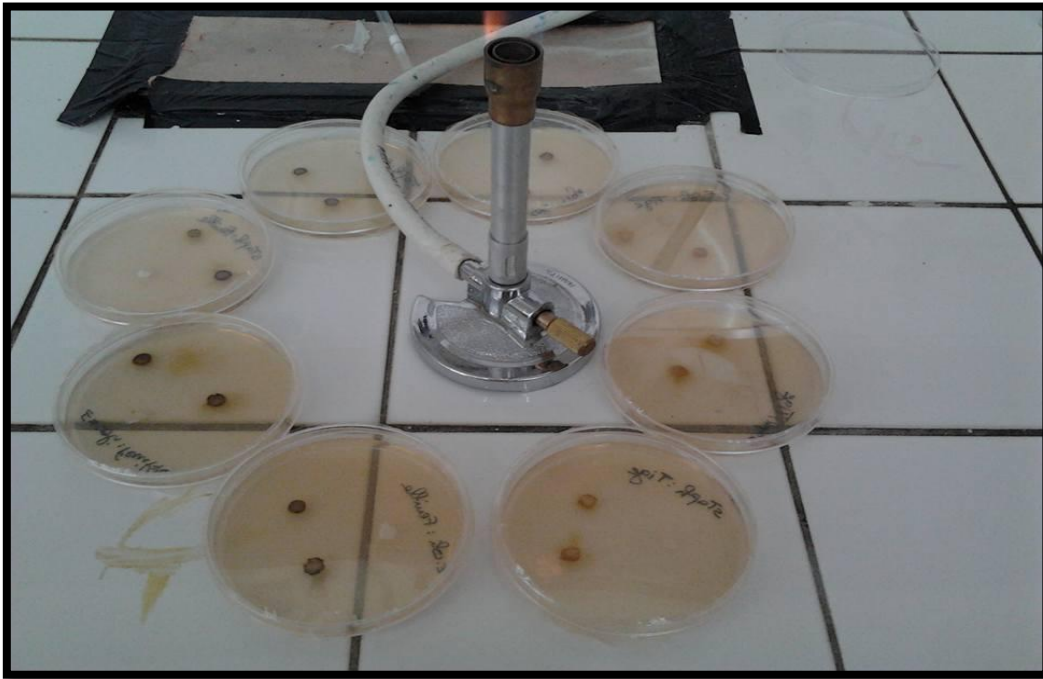


Figure.40 : L'activité antibactérienne

6.2. Stérilisation du matériel

On stérilise à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes :

- L'eau distillée et les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes (inoculums), ainsi que dans la préparation des dilutions de nos échantillons.

Les disques en papier Whattman(6 mm de diamètres) après enrobage dans du papier aluminium.



Figure .41 : Les différentes étapes de l'activité antibactérienne

1: l'écoulement du milieu Muler-Hinton dans les boites pétries.

2 : Etalement des souches bactériennes

3 : préparation des pouilles

4 : Fermeture des boites pétrie.

5: Incubation dans l'étuve

6. 3. Protocole d'évaluation de l'activité antibactérienne (test de sensibilité)

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de diffusion en gélose dite méthode de diffusion de disques [69].

6. 4. Préparation des boites

La gélose **Muler-Hinton** stérile bouillie dans un bain-marie pendant environ 1h du temps, après, la gélose coulé dans des boites de pétries dans une zone stérile par le Bec benzène jusqu'à une épaisseur de 4 à5 mm puis laissées 1 heure pour la solidification

6.5. Etalement des souches

L'étalement est réalisé à l'aide d'une pipette pasteur, Deux boites sont utilisées pour chaque souche bactérienne.

6.6. Lecture des boites

L'activité antibactérienne a été déterminée par mesurant à l'aide d'une règle de diamètre de la zone d'inhibition autour des disque imprégné par l'extrait des deux organes (feuilles, tige) et les pouilles, déterminé par les différentes concentrations de l'extrait autour des disques.

7. Le pouvoir antioxydant :

Les extraits méthanoliques sont testées pour leur pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et pour évaluer l'activité antioxydant, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par **Lopes-Lutz**

et al., 2008

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu.

1- Nous avons prendre 0,05 g de chaque poudre d'extraits différentes du *Phlomis purpurea* L. dissoudre dans 10 ml d'eau distillée (solution mère), après nous avons préparés 4 concentrations différentes :

-3 mg/ml : 3 ml de solution mère + 2 ml de MeOH.

-2 mg/ml : 2 ml de solution mère + 3ml de MeOH.

-1 mg/ml : 1 ml de solution mère + 4ml de MeOH.

-0,5 mg/ml : 0,5 ml de solution mère + 4,5 ml de MeOH.

2- Préparer dans un erlen la solution du DPPH (0,5mgduDPPHdissoudredans100mlde MeOH) etprendre30 µL du chaque solution préparée t mélangé avec 3 ml du DPPH.

3- Les différentes concentrations préparées sont mises dans le vortex quelques minutes pour Mélanger et après cette étape les différents tubes sont mis d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 minutes.

4- La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517

Nm après30 minutes d'incubation

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages(%) en utilisant la formule suivante:

$$-I\% = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) \times 100 / A_{\text{blanc}}$$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol),

A échantillon : Absorbance du composé d'essai. [36]

Chapitre 02

Résultats et Discussion

1. Screening phytochimique

1.1. Métabolites secondaires

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans les parties étudiées de la plante *Phlomis purpurea* L. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les (feuilles, fleurs, tiges) de la plante étudiées épuisés par le méthanol, éther de pétrole et le chloroforme sont consignés dans les tableaux suivants :

1.1.1. Criblage des Flavonoïdes

Les résultats de criblage phytochimique des flavonoïdes indiqués dans le tableau illustrent la présence de ces métabolites secondaires fortement positive dans les Feuilles, fleurs et par contre dans les tiges sont faiblement positives. (**Tableau03**)

Tableau03 : résultats de criblage des flavonoïdes

Espèce	Extrait et réactif	feuille	Tige	Fleur
<i>Phlomis purpurea</i> L.	Extrait méthanolique+ HCl+ mg	+++	+	+++

- : Test négatif

+ : Test faiblement positif

++ : Test positif

+++ : Test fortement positif

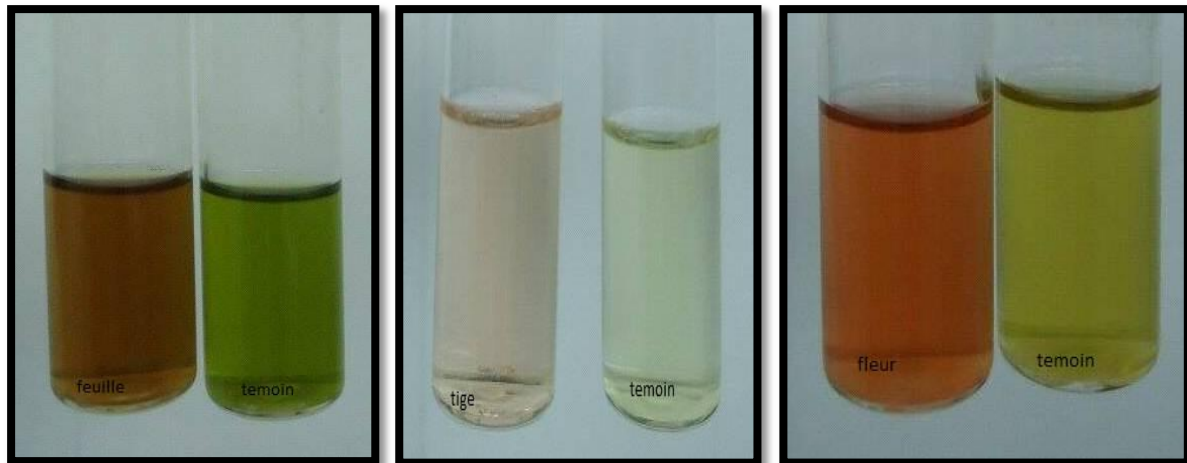


Figure.42 : Photographie des résultats des Flavonoïdes

1.1.2. Criblage d'Anthraquinones

Le réactif KOH utilisé pour la détection des Anthraquinones a démontré que toutes les organes de *Phlomis purpurea* L. sont très abondants en anthraquinones sauf les feuilles, et ont été trouvées aussi dans les fleurs (**Tableau04**)

Tableau.4 : Résultats de criblage des Anthraquinones

Espèce	Extrait et réactif	Feuille	Tige	Fleur
<i>Phlomis purpurea</i> L.	Extrait chloroformique + KOH 10%	+++	--	+

- : Test négatif

++ : Test positif

+ : Test faiblement positif

+++ : Test fortement positif

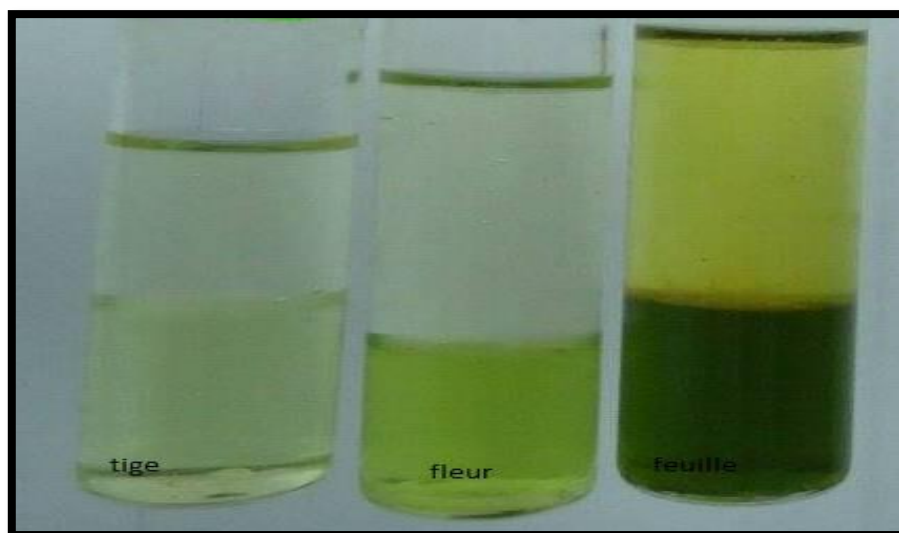


Figure.43 : Photographie des résultats des Anthraquinones

1.1.3. Criblage des Quinones

Le criblage photochimique des Quinones a montré que les feuilles du *Phlomis purpurea* L. contiennent des quantités faibles en Quinones. (**Tableau 05.**)

Tableau.5 : Résultats de criblage des Quinones

Espèce	Extrait et reactif	Feuille	Tige	Fleur
<i>Phlomis purpurea</i> L.	Extrait etherique + NaOH	+	--	--

- : Test négatif

++ : Test positif

+ : Test faiblement positif

+++ : Test fortement positif

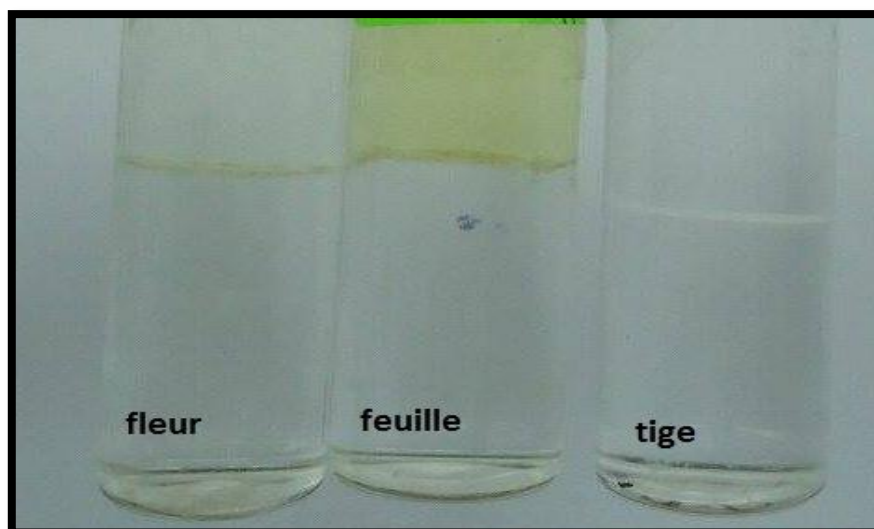


Figure.44 : Photographie des résultats des quinones

1.1.4. Criblage d'Anthocyanes

Le criblage phytochimique nous a montré que les fleurs de *Phlomis purpurea* L. sont très riches en Anthocyanes.

Les feuilles de *Phlomis purpurea* L. sont moyennement riches en composés Anthocyanidols, suivies des tiges qui sont très abondantes en Anthocyanes (**Tableau06**).

Tableau.06 : Résultats de criblage des Anthocyanes

Espèce	Extrait et réactif	Feuille	Tige	Fleur
<i>Phlomis purpurea</i> L.	Extrait méthanolique + HCl conc. (incubation 30 min à 80°)	++	--	+++

- : Test négatif

++ : Test positif

+ : Test faiblement positif

+++ : Test fortement positif

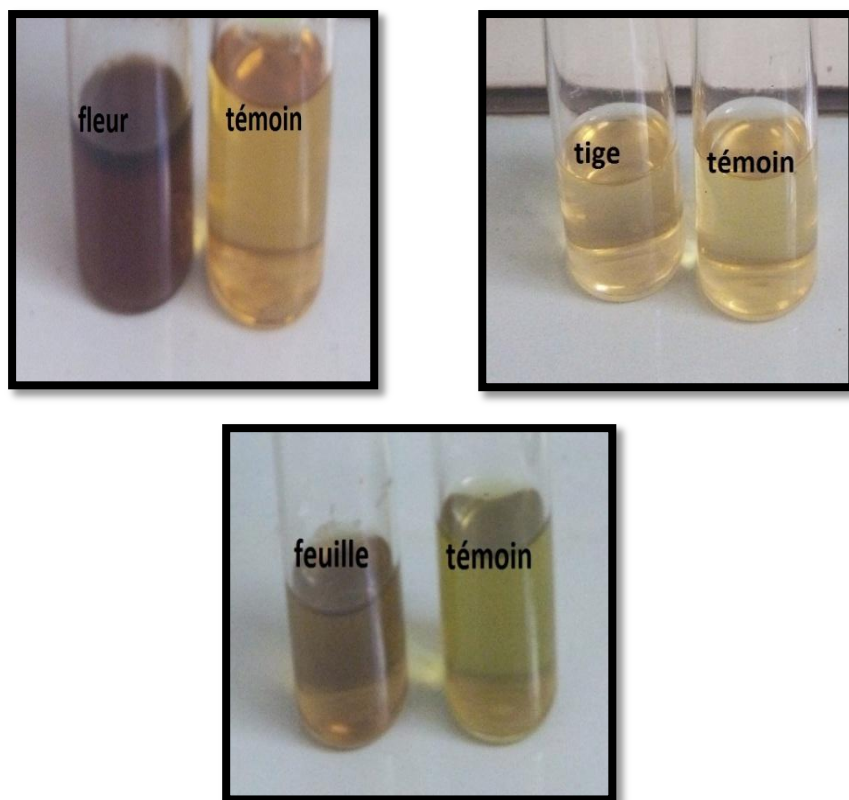


Figure.45 : Photographie des résultats d'anthocyanes

1.1.5. Criblage des Tanins

Selon les réactifs utilisés pour la détection des tanins il apparait que les tiges, fleurs et feuilles de *Phlomis purpurea* L., sont très riche en tanins catéchique (feuilles et fleurs) et en tanins gallique (tiges) (**Tableau 07**)

Tableau.7 : Résultats de criblage des Tanins

Espèce	Extrait	Réactif	Feuille	Tige	Fleur
<i>Phlomis purpurea</i> L.	Methanolique	FeCl3	+++	++	+ + +
		Gélatine	--	--	--
		Gélatine salée	--	--	--

- : Test négatif

++ : Test positif

+ : Test faiblement positif

+++ : Test fortement positif

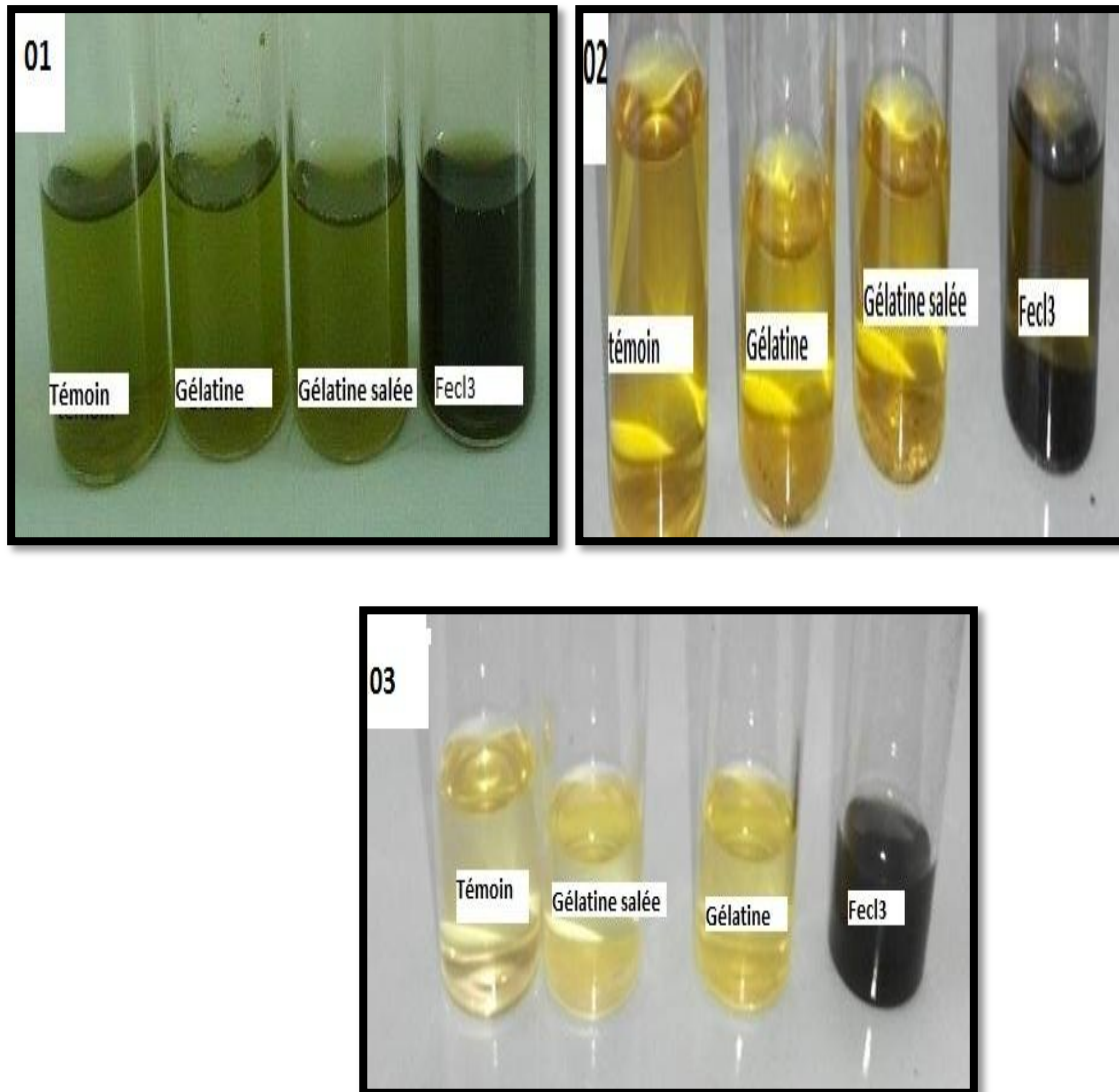


Figure.46 : Photographie des résultats des tanins (1) feuilles, (2) fleurs, (Tiges)

1.1.6. Criblage des Stérols et Stéroïdes

Le criblage phytochimique des stérols, a montré que tous les organes étudiés sont riches en stérols. Les feuilles, les fleurs de *Phlomis purpurea* L. sont moyennement riche en stérols les tiges

Le criblage phytochimiques des stérols insaturé sa montré que les organes (feuilles, fleurs, tiges) de l'espèce étudiée *Phlomis purpurea* L. sont riches.

Le réactif acide Picrique utilisé pour la détection des stéroïdes lactonique à donné une coloration orange avec les extrais méthanolique des feuilles et fleurs ce qui indique que sont

moyennement riche en stéroïdes lactonique.

Tableau.08 : Résultats de criblage des stérols, triterpènes et stéroïdes

Espèce	N° tube	Réactif	Feuille	Tige	fleur
<i>Phlomis purpurea</i> L.	Tube 01	H ₂ so ₄	+++	+	++
	Tube 02	Na ₂ so ₄ +h ₂ so ₄	Absence de réactif Na ₂ so ₄		
	Tube 03	Acide picrique	+	-	+

- : Test négatif

++ : Test positif

+ : Test faiblement positif

+++ : Test fortement positif

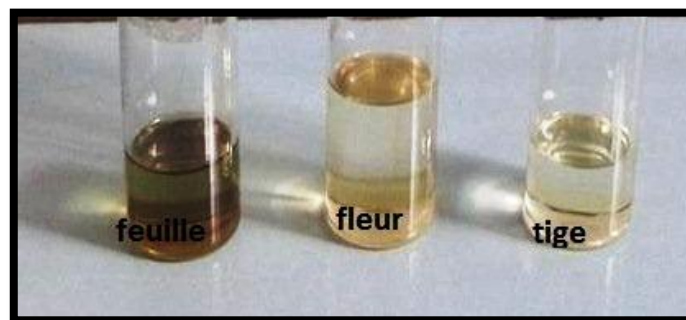


Figure.47 : Photographie des résultats des stérols

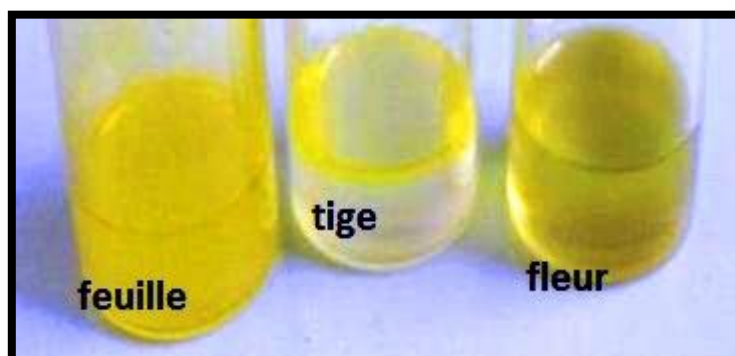


Figure.48 : Photographie des résultats des stéroïdes

1.1.7. Criblage des coumarines

Le criblage des coumarines par la méthode du CCM a révélé l'absence de ces métabolites dans les organes: feuilles, fleurs, tiges.

2. Séparation de l'extrait méthanolique par chromatographie sur couche mince (CCM)

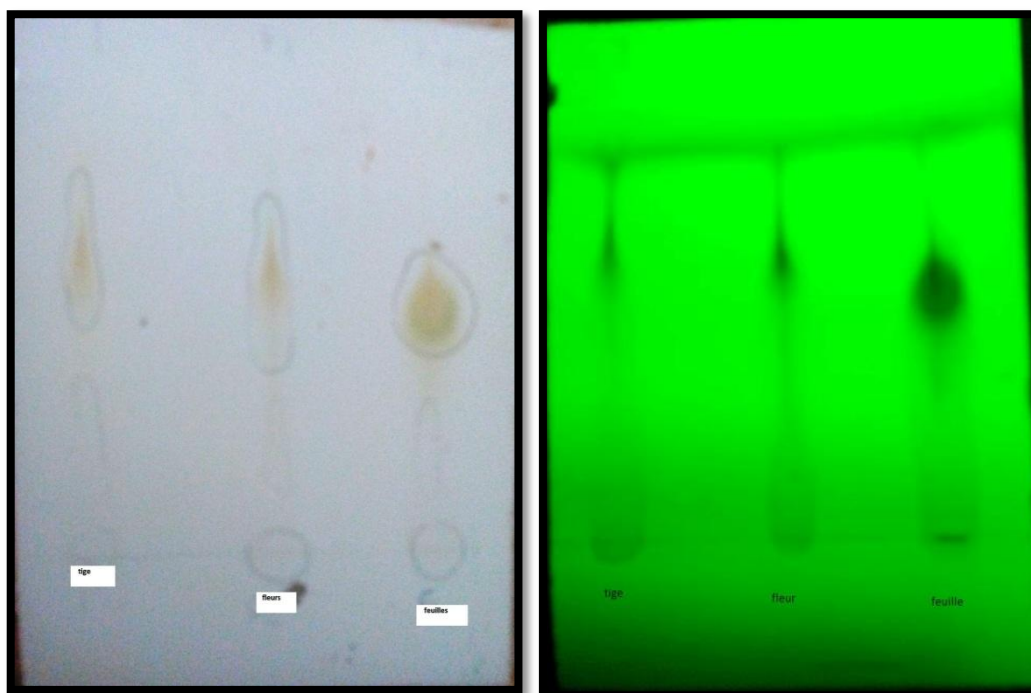
Le développement de la technique de la chromatographie sur couche mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire.

Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant deux systèmes solvant :

S1 : Acétate d'éthyle + Hexane (2 : 8)

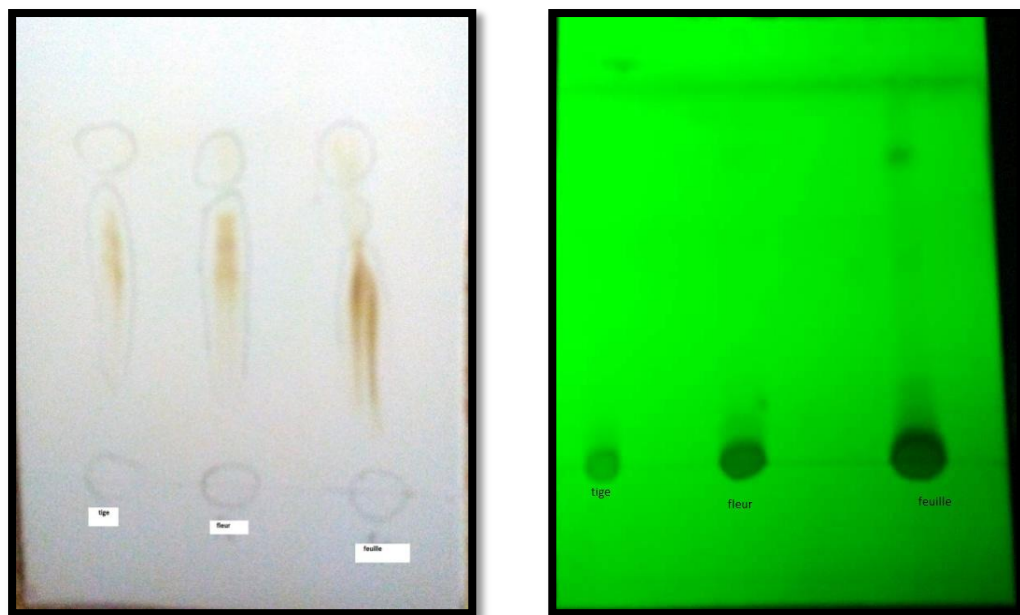
S2 : le butanol + Acide acétique + H₂O (5 : 4 : 1)

Sous lumière UV à 254 nm, les différentes tâches qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées au crayon.



Détection visible

Révélation par UV (254)



Détection visible

Révélation par UV (254)

Figure.49 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique des feuilles, des fleurs et des tiges chez *Phlomis purpurea* L.

L'étude analytique des extraits méthanolique par CCM, en utilisant les systèmes suivants (sur photographies) visualisée avec UV : 254 nm, (Figure.), montre l'existence de quelques métabolites secondaires dans les organes du *Phlomis purpurea* L. surtout flavonoïdes et terpènes ce qui confirme les résultats obtenue par les criblages précédent.

3. Dosage des polyphénols

Les taux de polyphénols existant dans les extraits méthanolique du *Phlomis purpurea* L. calculés sont présentés dans le (tableau.), ainsi que ce de la référence standard.

Il apparait que l'EM des feuilles ($346 \pm 168,99$) est plus r que l'EM des tiges en polyphénols ($213 \pm 45,96$).

Comparativement à la référence standard, nous pouvons conclure que nos deux extraits sont moins riches en polyphénols.

Tableau.9 : Taux de polyphénols existant dans les extraits méthanolique feuilles et tiges



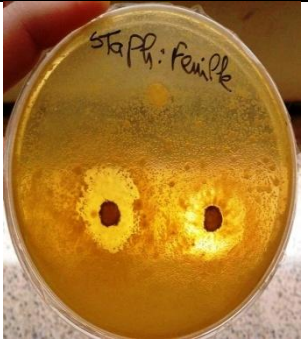

Echantillon	Taux de polyphénols
EM feuilles	346 ± 168,99
EM tiges	213 ± 45,96

4. activités biologiques

4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique

Pour tester le pouvoir antibactérienne des différentes phases issues des affrontements de l'extrait méthanolique brut des feuilles et tiges de *Phlomis purpurea* L., on a utilisé la technique de diffusion des disques.

Tableau.10 : Activité antibactérienne de l'extrait du *Phlomis purpurea* L.

Organes bactérie	Feuilles	Tige	Photographie feuille	Photographie tige
<i>E. coli</i>	D1 =19	D1 =6		
	D2 =12	D2 =6		
<i>Staphylococcus aureus</i>	D1=12	D1 =11		
	D2 =18	D2 =14		

Les tests préliminaires de l'activité antibactérienne test par la méthode de la diffusion sur disque en montrant que les extraits méthanoliques des feuilles et des tiges de la plante *Phlomis purpurea* L. ont un effet antibactérien très puissant sur la croissance d'*E. Coli* et *Staphylococcus aureus*.

L'évolution de l'activité antibactérienne de l'extrait Méthanolique de *Phlomis purpurea* L. a été effectuée par la méthode des disques vis-à-vis des deux souches bactériennes *E. Coli*, *S. aureus*.

L'extrait méthanolique du Genre *Phlomis* présente un effet inhibiteur très efficace contre les deux espèces bactériennes mais avec des diamètres variables.

Technique disc : contacte indirecte avec les souches bactériennes++ Pour mieux élucider le pouvoir antibactérien des différentes fractions de l'extrait méthanolique de la plante, les diamètres de la zone d'inhibition sont représentés graphiquement sur des histogrammes (figures.51).

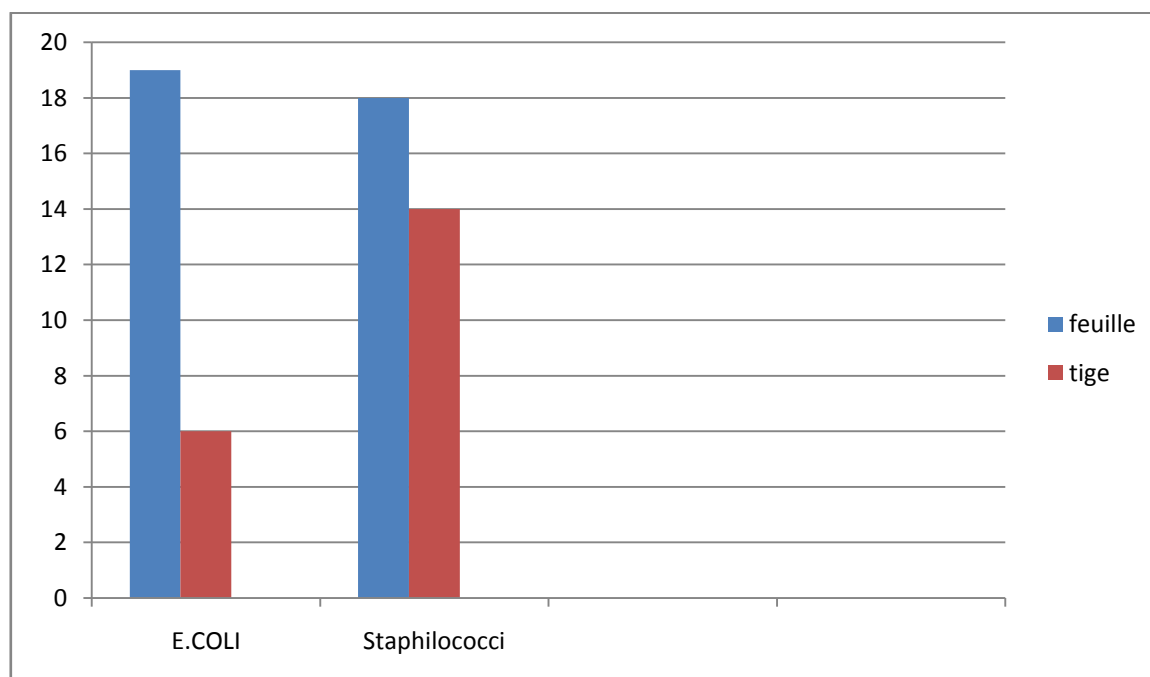


Figure.50 : Diamètre des zones d'inhibition des fractions de l'extrait contre différentes bactéries.

4.2. Activité antioxydante

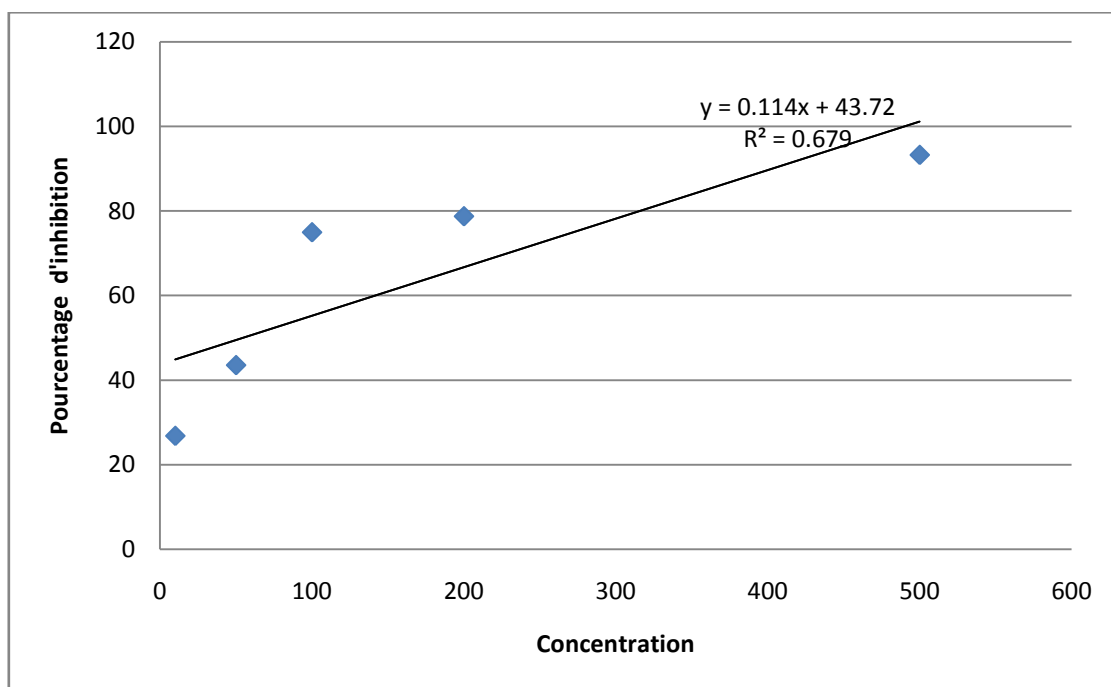


Figure.51 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations d'extraits méthanolique Feuille du *Phlomis purpurea* L.

Ces résultats montre un meilleur effet inhibiteur des radicaux libres du DPPH parce que environ 93,25% du DPPH sont inhibés a une concentration de 500 $\mu\text{g/ml}$ de l'extrait méthanolique des feuilles.

Comparativement à la Quercétine (antioxydant de référence) avec $\text{CI } 50 = 12$, l'extrait méthanolique des feuilles *Phlomis purpurea* L. ($\text{CI } 50 = 55,08$) possède un pouvoir antioxydant puissant.

Conclusion

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de composés naturels bioactifs

Notre étude a concerné l'espèce *Phlomis purpurea* L. qui appartient à la famille des Lamiaceae. une des familles les plus importantes dans la flore algérienne et les plus utilisées en médecine traditionnels , On a utilisé des plantes originaires de la région d'Oum el bouaghi (Algérie), où l'emploi de cette espèce fait partie des traditions.

Notre recherche a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique la présence des tanins, des anthraquinones, des stérols et stéroïdes, des flavonoïdes qui ont montré un potentiel antibactérien intéressant.

Cette étude a été réalisée à partir des extraits méthanoliques des tiges et des feuilles de *Phlomis purpurea* L.

Le dosage des phénols totaux de l'extrait méthanolique dans *Phlomis purpurea* L. des feuilles ($346 \pm 168,99$), et des tiges ($213 \pm 45,96$) nous pouvons conclure que notre extrait est riche en polyphénols.

L'analyse par chromatographie sur couche mince des fractions obtenues avec deux systèmes de solvant différents, a permis de séparer un certain nombre de métabolites secondaires .

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction du piégeage du radical libre DPPH des extraits méthanolique a montré que notre extrait possède un pouvoir antioxydant puissant, le pourcentage d'inhibition à une concentration de 500 mg/ml .

Par ailleurs, l'étude antibactérienne par la méthode de diffusion de disque montrent que l'extrait méthanolique a un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries : *Staphylococcus aureus*, et *E. coli*

On conclue de tous nos résultats obtenus que l'espèce *Phlomis purpurea* L. est très riches en métabolites secondaires « flavonoïdes » particulièrement au niveau des feuilles. Ces flavonoïdes présentent un pouvoir antibactérien et antioxydant important.

Références bibliographiques

- [1] AP-Website (« Stevens, P. F. (2001 onwards)
- [2] Bonnier, Revue générale de botanique., (1895).
- [3] Les botaniques de ploemeur 56., (2014).
- [4] Jacquin, N.J. von, Plantarum rariorum horti caesarei Schoenbrunnensis descriptiones et icones, vol. 3: t. 359 (1798))
- [5] Sp. Pl. 2: 585. 1753 [1 May 1753]
- [6] Wikipedia, *Phlomis purpurea*
- [7] Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem (2006).
- [8] WCSP : *Pl. Hort. Schoenbr. 3: 58 (1798)*.
- [9] CJBG (2015).
- [10] Henri-Louis Duhamel Du Monceau,(1782).
- [11] Dictionnaire des sciences naturelles, Plates Botanique, vol. 3: (1816-1830)
- [12] NCBT Taxonomy, (2008).
- [13] Yao et al., (2004) ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006.
- [14] Narayana et al,2001;W- Erdman et al,(2007).
- [15] Karamali et Teunis, (2001).
- [16] Jones et Dangl,(2006) ; Gibbons et Coll., 2008.
- [17] H. Bremer et P.P. Dennis, « Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate » (1996),
- [18] Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., & von Eiff, C. (2004).
- [19] Kluytmans, J., van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997).
- [20] Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Pfaller, M. A., & Tenover, R. C. (Eds.). (2003).

[21] Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2(1), 63-76).

[22] Miller, L. G., Perdreau-Remington, F., Rieg, G., Mehdi, S., Perlroth, J., Bayer, A. S., Tang, A. W., Phung, T. O., & Spellberg, B. (2005). Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *The New England Journal of Medicine*, 352(14), 1445.

[23] Bartosz. G., (2003).

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

[25] MEYER A. et DEIANA J., (1988). Cours de microbiologie générale. Doin éditeurs, paris.

[26] BOUGANDOURA N.;(2010) Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha spnepta* (nabta) et *Ajuga reptans* L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. mémoire magister; université Tlemcen.

[27] BILLING J. ET SHERMAN P.W., (1998). Antimicrobial function of spices. *Quarterly Review of Biology*. 73: p.49.

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

[29] BRUNETON J., (1993) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 2ème Ed. Lavoisier. Paris, 274-285).

[30] L. C. Craig, J. D. Gregory et W. Hausmann, « Versatile laboratory concentration device », *Anal. Chem.*, vol. 22, 1950, p. 1462.

[31] Bonnier, (1909).

[32] Paris et Moyses, (1976).

[33] Paris et Hurabielle, (1980).

[34] Rizk, (1982).

[35] Antonot et al. (1998).

[36] Laibimene, (2011).

- [37] Pelt, (2001).
- [38] Judd et *al.*, (2002)
- [39] Harbone, (1993).
- [40] Verpoorte,(2002)
- [41] Gaussen, (1982).
- [42] Tekhno-Botanico Slovar ,(1820).
- [43] GAEC Les Senteurs du Quercy.
- [44] Guillaume, (2008).
- [45] Hartmann, (2007)
- [46] Krief, 2003, Haven et al., (2000).
- [47] Mompon et al., (1998).
- [48] Hennebelle et al., (2004).
- [49] Middleton et al., (2000).
- [50] Brzozowska et al., (1973)
- [51] Loche, (1966).
- [52] Nitsch et Nitsch, 1961; Alibert et al., (1977)
- [53] Heimeur et al.,(2004).
- [54] Dubois et al., (1977)
- [55] Mukohata et al., (1978)
- [56] Havsteen, (2002)
- [57] Edenharder et Grünhage, (2003)
- [58] Robinet, (1951).
- [59] steinmetz et al., (1993)

[60] Hostettmann,1997)

[61] Ribereau, (1968).

[63] Ghazi et Sahraoui,(2005).

[64] Ribérreau, (1968)

[65] Kabouche, (2007)

[66] Sine, (2003)

[67] Heilerová*etal.*,(2003).

[68] Singleton *etal.*, (1999).

[69] Rahal et *al.*(2005).

Références

- Akroum, S. (2011) Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels, 2011, université mentouri Constantine ,101p
- Bremness, L. (2002) Plantes aromatiques et médicinales. Bordas (Ed). Paris, 303 p.
- Bruneton, J. (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575p
- Criblage chimique et l'activité biologique de spiruline (*Arthrospira platensis*). BOUTALBI SAFA UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA
- Dictionnaire des sciences naturelles, Plantes Botanique, vol. 3: (1816-1830))
- FENNANE, M., M. IBN TATTOU, A. OUYAHYA & J. EL OUALIDI (éd.) (2007). Flore Pratique du Maroc [vol.2] Fl. Prat. Maroc 2: [455]
- Fl. Iberica 12: 210 (2010).
- GREUTER, W., H. M. BURDET & G. LONG (ed.) (1986). MED-CHECKLIST. [vol. 3] Conservatoire & Jardin botaniques de la Ville de Genève. [p.310]
- Jacquin, N.J. von, *Plantarum rariorum horti caesarei Schoenbrunnensis descriptiones et icones*, vol. 3: t. 359 (1798)
- Jacquin, N.J. von, *Plantarum rariorum horti caesarei Schoenbrunnensis descriptiones et icones*, vol. 3: t. 359 (1798)
- PELTIER, J. P. (1973). Contribution à la flore du bassin versant de l'Oued Souss. (1er fascicule). Bull. Soc. Sci. Nat. Maroc53: [23]
- BATTANDIER, J. A. & TRABUT, M. (1888). Flore de l'Algérie. Dicotyledones. [1-184] vol. 1(4). Monocotyledones par L. Trabut. [p.701]
- Second germination theory and practice : seconde edition.norman C.Deno, Professor emeritus of chemistry June 1, 1993
- TUTIN, T. G. & al. (ed.) (1972). *Flora Europaea*. (vol.3) Cambridge University Press, Cambridge. [p.144]
- VALDES, B., S. TALAVERA & E. FERNANDEZ-GALIANO (ed.) (1987). *Flora Vascular de Andalucía Occidental*, vol. 1Ketrès editoria, Barcelona, 1987. Vol.1: [1]-485. [p.412]

Sites internet

<http://fr.scribd.com/doc/44360991/SEED-GERMINATION-THEORY-AND-PRACTICE-by-Professor-Norman-C-Deno>

<http://margaridamoreira.com/portfolio/phlomis-purpurea/>

<http://plantillustrations.org/taxa.php?taxon=Phlomis>

<http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/PTaxonDetail.asp?NameId=66649&PRefFk=800000>

<http://www.leaderplant.com/acheter-phlomis-pourpre-1942.html>

<http://www.quelleestcetteplante.fr/genres.php?genre=Phlomis>

<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=144420>

Nom et Prénom :**Zaarour Nesrine****Lahlah Esma****Mémoire pour l'obtention du diplôme de : MASTER****Domaine : Sciences de la nature et de la vie****Filière : Biodiversité et production végétale****Spécialité : Biologie et physiologie végétale****Option : Métabolisme secondaire et molécules bioactives****Thème : Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante de l'espèce*****Phlomis purpurea L.*****Résumé :**

Nos travaux sont basés principalement sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de la plante *Phlomis purpurea L.* appartenant à la famille des lamiaceae, récolté de touzline (oum el bouaghi). Les tests phytochimiques ont révélé que cette plante est riche en flavonoïdes, anthocyanes, quinones, anthraquinone, tanins, stéroïdes, et les terpènes. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les feuilles et les tiges est estimé de $346 \pm 168,99$, $213 \pm 45,96$. L'évaluation de l'activité antioxydante des feuilles par la méthode des tests de DPPH a montré que les feuilles ont un pouvoir antioxydant puissant. Les extraits méthanoliques des feuilles et tiges ont un effet antibactérien vis-à-vis des souches *E. coli*, *Staphylococcus aureus*.

Mots clés :

Phlomis purpurea L., Lamiaceae, Anthocyanes, Tanins, Anthraquinones, Activité antioxydante.

Jury d'évaluation :**Président du jury : Mme. BOUDOURE Leila** (M.C.B - UFM Constantine 1).**Rapporteur : Mr. CHIBANI Salih** (M.C.B - UFM Constantine 1).**Examineurs : Mme. HAMOUDA_ BOUSBAA Dounia** (M.C.B - UFM Constantine 1).**Année universitaire : 2014/2015**