



**Université Constantine 1 Frères Mentouri**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**جامعة قسنطينة 1 الإخوة منورى**  
**كلية علوم الطبيعة والحياة**

**Département :** de Biochimie et Biologie  
Cellulaire et Moléculaire

**قسم:** الكيمياء الحيوية-البيولوجية الخلوية والجزئية

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

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** *Biochimie*

**N° d'ordre :**  
**N° de série :**

Intitulé :

---

## **Investigation phytochimique et biologique d'une plante de la famille des Rubiacées**

---

**Présenté par :** KHELLAF Rahil  
BOUTAHLA Nesrine

**Le :** 23/06/2025

**Jury d'évaluation :**

**Président :** Dr. RAMLI Iman (MCA- U Frères Mentouri Constantine 1)  
**Encadrant :** Dr. ZAABAT Nabil (MCA- U Frères Mentouri Constantine 1).  
**Examinateur :** Dr. ZEHANI Lamia (MCB- U Frères Mentouri Constantine 1).

**Année universitaire  
2024- 2025**

## **Remerciements**

*Avant toute chose, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à **Allah**, le Tout-Puissant, le Clément, qui m'a accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires pour mener à bien mon parcours universitaire. C'est par Sa volonté que j'ai pu surmonter les épreuves et accomplir ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à **Madame Nabila Zaabat, MCA** à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté, avec une grande bienveillance, de nous encadrer. Son encadrement exceptionnel, sa sagesse, sa patience inépuisable et la qualité de ses conseils ont été une source précieuse d'inspiration tout au long de ce travail.*

*Nos vifs remerciements pour Dr **Ramlī I** qui a accepté de présider le jury de ce mémoire.*

*Nos sincères remerciements pour Dr **ZEHĀNİ L** qui a accepté d'examiner et d'évaluer notre travail*

*Mes remerciements les plus sincères vont également à Monsieur **Lefahal Mostefa**, et Madame **Azzouzi Salima** enseignants au laboratoire de chimie, et **Amina Boughachiche**, doctorante au même laboratoire, pour leur aide précieuse lors de la partie pratique, leurs conseils éclairés et leur soutien constant ont grandement contribué à la réalisation de ce mémoire.*

*Nous avons eu le plaisir d'effectuer notre stage de fin d'études dans laboratoire d'hygiène de Wilaya de Constantine. Nous adressons aussi nos vifs remerciements à Madame **Mouni Belhafaf** et à sa tante **Benzornadží Atika** pour leur précieuse collaboration lors de l'application de l'activité*

*antibactérienne, ainsi que pour l'attention bienveillante qu'elles ont portée à notre travail*

*Ainsi que nous profitons de l'occasion pour remercier du fond du cœur toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## **DEDICACES**

Avant toute chose, je rends grâce à Allah, le Tout-Puissant, pour la vie, la santé, la patience et la force qu’Il m’a accordées tout au long de ce parcours. Merci pour Sa lumière, Sa paix, Ses bienfaits visibles et invisibles. Chaque souffle, chaque succès, chaque prière silencieuse témoigne de Sa présence. Alhamdulillah, du plus profond de mon âme.

Je tiens aussi à me remercier, pour ma persévérance, ma force intérieure et ma capacité à me relever face aux épreuves. Ce travail est le fruit de mon engagement, de mon intelligence et de ma volonté de ne jamais abandonner.

Ma reconnaissance infinie va à ma chère maman, Djamila, pour son amour inconditionnel, ses encouragements constants et son soutien indéfectible. À mon père, Abdelhak, pour sa présence rassurante et ses sacrifices, merci pour ta confiance et ta sagesse.

À mon frère Mahmoud, pilier de ce parcours, merci pour ton amour fraternel, ta fidélité et ton soutien sans faille. À Hicham et Sana, mes chers frère et sœur, merci pour votre tendresse, votre humour et votre confiance.

À mon amie et binôme de toujours, Nesrine : tu as été plus qu’une amie, une sœur, un soutien spirituel et affectif précieux. Que Dieu préserve ce lien unique entre nous.

Enfin, merci à toutes celles et ceux qui, par un mot, un regard ou un geste, m’ont soutenue de près ou de loin. Ce mémoire vous est aussi dédié.

*Rahil*

## **DEDICACES**

Au nom de **Dieu**, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux, Louange à Dieu et remerciement pour Sa grâce, pour la force, la patience et la détermination qu'Il m'a accordées afin d'atteindre ce moment tant attendu.

Je dédie ce travail humblement :

**À ma chère mère Fahima**, source de tendresse et âme de réconfort. Toi qui as toujours été cette prière sincère qui m'accompagne, ce refuge rassurant dans chaque instant de faiblesse. Ta présence dans ma vie est une bénédiction et tes invocations sont le secret de ma réussite. Que Dieu te protège et t'accorde un bonheur infini.

**À mon cher père Omar**, mon soutien premier et ce cœur immense qui m'a appris la valeur de la patience et du sacrifice. Par ton amour inestimable et ton soutien discret mais profond, tu as su me guider et me fortifier. Que Dieu te préserve et fasse de toi une lumière éternelle dans ma vie.

**À mon frère bien-aimé Nassim**, morceau de mon cœur et ami fidèle. Merci d'avoir été ce compagnon de route qui partage rires et peines, et qui a toujours su être présent avec bienveillance. Je te porte un amour grand comme le ciel.

**À mes chères sœurs Fatima Zohra et Nardjes**, les fleurs de mon existence et les complices de mon âme. Vous êtes la joie de notre maison et la lumière de mon cœur.

**À ma précieuse amie Rahil**, plus qu'une camarade d'études, une sœur que la vie m'a offerte. Ensemble, nous avons traversé années de fatigue, d'espoir et de souvenirs mémorables. Ton soutien, ta sincérité et ta présence à mes côtés sont des cadeaux que je chérirai toujours. Nos souvenirs communs sont gravés dans mon cœur pour l'éternité.

À tous ceux qui m'ont aimée, soutenue et accompagnée : famille, amis, collègues et proches, qui ont une place unique et indélébile dans mon cœur.

À vous tous, je dédie ce travail en témoignage de mon amour, de ma reconnaissance et de ma fidélité sincère.

*Nesrine*

## Table des matières

Introduction Générale	0
Chapitre 1 : Étude bibliographique	2
1.    La famille de Rubiacées	3
1.1.    Définition	3
1.2.    Description botanique de Rubiacées	3
1.3.    Utilisation traditionnelle des Rubiacées	4
1.4.    Distribution géographique des Rubiacées	5
2.    Le genre <i>Asperula</i>	6
2.1.    Définition	6
2.2.    Description du genre <i>Asperula</i>	7
2.3.    La position systématique	8
2.4.    Utilisation traditionnelle d ' <i>Asperula</i>	9
2.5.    Distribution géographique	9
Chapitre 2 : Les métabolites secondaires	16
1.    Les Métabolites secondaires :	12
1.1    Définition	12
1.2    Classification des métabolites secondaires	12
1.2.1    Les composés phénoliques ou les polyphénols	12
1.2.1.1    Les acides phénoliques	13
1.2.1.2    Les flavonoïdes	14
1.2.1.3    Les tanins	16
1.2.1.4    Les coumarines	16
1.2.1.5    Quinones	17
1.2.2    Les alcaloïdes	17
1.2.3    Les terpénoïdes	18
1.2.4    Les saponosides	18

2. Méthode de séparation (Chromatographie)	19
2.1 Définition	19
2.2 Les différents types de chromatographie :	19
2.2.1 La chromatographie sur papier	20
3. Métabolites secondaires isolés des genres de la famille Rubiacées :	21
4. Métabolites secondaires isolés des espèces du genre <i>Asperula</i> :	24
Chapitre 3 : Les activités biologiques	30
1. L'activité antibactérienne	28
1.1 Les bactéries	28
1.2 Bactéries Gram positifs/ Gram négatif	29
1.3 Souches bactériennes testées	29
1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> :	29
1.3.2 <i>Escherichia coli</i>	30
1.3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.3.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i> :	32
1.3.5 <i>Enterococcus</i> :	32
1.3.6 <i>Serratia marcescens</i>	33
1.4 Nature de l'activité antibactérienne	33
1.5 Mode d'action contre les bactéries	33
2. L'activité antioxydante	34
2.1 Stress oxydatif	34
2.2 Les radicaux libres	34
2.2.1 Définition	34
2.2.2 Formes des radicaux libres	35
2.2.2.1 Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	35
2.2.2.2 Espèces réactives de l'azote (RNS)	35
2.2.3 Origine des radicaux libres	36

2.2.3.1	Sources endogènes	36
2.2.3.2	Sources exogènes	36
2.3	Les Antioxydantes	37
2.3.1	Définition	37
2.3.2	Types de substances antioxydantes	37
2.3.2.1	Antioxydants enzymatiques	37
2.3.2.2	Antioxydants non enzymatiques	39
2.4	Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant :	42
2.4.1	Activité anti-radicalaire au DPPH	43
2.4.2	Activité du piégeage du cation radical ABTS <sup>·+</sup>	44
2.4.3	Réduction du fer par la méthode de FRAP	45
2.4.4	Piégeage du peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	46
Chapitre 4 : Matériels et méthodes		53
1.	Préparation des extraits :	47
1.1	Séchage de la plante	47
1.2	Extraction et séparation de l'espèce étudiée :	47
1.2.1	Extraction solide-liquide (macération)	47
1.2.2	Extraction liquide/liquide	49
2.	L'étude phytochimique de la plante étudiée	53
3.	Séparation et purification de l'extrait n-BuOH	54
4.	Analyse qualitative (screening phytochimique) :	55
4.1	Détection des alcaloïdes	56
4.2	Détection de polyphénols	56
4.3	Détection des tanins	56
4.4	Détection des flavonoïdes	56
4.5	Détection des coumarines	56
4.6	Détection de terpènes	56

4.7	Détection des saponines	57
4.8	Détection des quinones	57
5.	Analyse quantitative :	57
5.1	Teneur en polyphénols totaux (TPC)	57
5.1.1	Principe	57
5.1.2	Mode opératoire :	57
5.2	Dosage des flavonoïdes (TFC)	58
5.2.1	Principe	58
5.2.2	Mode opératoire	58
6.	Evaluation des activités biologiques	58
6.1	L'activité antioxydante	58
6.1.1	Test de Piégeage du radical libre 2,2- diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH)	58
6.1.1.1	Principe	58
6.1.1.2	Mode opératoire	59
6.1.2	Méthode de la capacité antioxydante totale (TAC) par le test phosphomolybdène	59
6.1.2.1	Principe :	59
6.1.2.2	Mode opératoire	60
6.1.3	Activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>2+</sup> - phénanthroline	60
6.1.3.1	Principe	60
6.1.3.2	Mode opératoire	60
7.	Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait végétal	60
7.1	Milieux de culture	61
7.2	Préparation des suspensions bactériennes (l'inoculum)	61
7.3	ensemencement des souches conservées	62
7.4	Préparation des différentes concentrations des extraits AcOEt et CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	63
7.5	Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne des extraits	63

7.5.1	Méthode de diffusion sur gélose avec puits	63
7.5.2	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	64
Chapitre 5 : Résultats et discussions		69
1.	Étude phytochimique de genre étudié	67
1.1	Résultats des CCM de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	67
1.2	Détermination du composé A1	67
1.3	Screening phytochimique	68
1.4	Teneur en polyphénols totaux TPC :	69
1.5	Teneur en flavonoïdes totaux TFC	70
2.	Activités biologiques	72
2.1.	Evaluation de l'activité antioxydante in vitro	72
2.1.1	Test de piégeage du radical 2-diphényl-picrylhydrazyl (DPPH) :	72
2.1.2	Capacité antioxydante totale (TAC)	73
2.1.3	Activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>+2</sup> phénanthroline	73
2.2	Étude de l'activité antibactérienne :	75
2.2.1	Méthode de diffusion sur gélose par puits :	75
2.2.2	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	77
Conclusion		59
Résumé		81

---

## Liste des figures

Figure 1: Plante de la famille Rubiacée .....	3
Figure 2: Aspect morphologique <i>d'Asperula</i> .....	6
Figure 3: Quelque espèces du genre <i>Asperula</i> (A). <i>Asperula taurina</i> (B). <i>Asperula capitata</i> (C). <i>Asperula hirta</i> .....	8
Figure 4: Structure d'unité de base des polyphénols.....	13
Figure 5:Classification des polyphénols . .....	14
Figure 6: Structure générale d'un flavonoïde.....	15
Figure 7: Structures chimiques (a) d'un tanin hydrolysable et (b) d'un tanin condensé.....	16
Figure 8: structure de base des coumarines.....	17
Figure 9: Structure de base des alcaloïdes.....	18
Figure 10: Structure de la molécule d'isoprène .....	18
Figure11 : Structure de la molécule des saponosides.....	19
Figure 12 :Classification des méthodes chromatographiques .....	20
Figure 13 :Cuve chromatographique.....	21
Figure 14: Différentes classes de composés isolés de Rubiacées .....	23
Figure 15: structure de la scopoletine.....	24
Figure 16:Structures chimiques des composés isolés de l'espèce <i>Asperula taurina</i> .....	25
Figure 17: Aspects caractéristiques en amas de coques à Gram positif de <i>S. aureus</i> .. .....	30
Figure 18: Micrographie électronique à balayage <i>d'Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	31
Figure 19 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
Figure 20: Le déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire .....	34
Figure 21: Formation des radicaux libre .....	36
Figure 22: Les différentes classes des antioxydants .....	42
Figure 23: Fréquence d'utilisation des méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ....	43
Figure 24: Structure chimique du radical libre DPPH .....	44
Figure 25: Piégeage du radical DPPH avec l'antioxydant (AH) .....	44
Figure 26: Formation et piégeage du radical ABTS <sup>+</sup> par un antioxydant .....	45
Figure 27: Schéma de la réaction de test FRAP .....	45
Figure 28:Parties aériennes séché de l' <i>Asperula</i> .....	47

---

Figure 29: Evaporation de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> par l'évaporateur rotatif .....	48
Figure 30: Filtration de l'extrait hydrométhanolique des parties aériennes et des racines .....	48
Figure 31: Affrontements par les deux solvants AcOEt (Ext A) et n-BuOH (Ext B).....	50
Figure 32 : Schéma des différentes étapes d'extraction des parties aériennes de la plante étudiée. .....	52
Figure 33: CCM bidimensionnelle de polyamide de l'extrait n-BuOH des PA.....	53
Figure 34: CCM bidimensionnelle de polyamide de l'extrait AcOEt.....	53
Figure 35 : Schéma de fractionnement de l'extrait n-BuOH.....	54
Figure 36: une CCM de l'extrait n-BuOH .....	54
Figure 37: Schéma de séparation de la fraction F1 .....	55
Figure 38: Les sept fractions obtenues par la chromatographie sur colonne de gel de Séphadexe. .....	55
Figure 39 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• (entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)).....	59
Figure 40: les souches bactériennes de référence utilisées .....	61
Figure 41: Préparation des suspensions bactériennes.....	62
Figure 42: Ensemencement des souches conservées.....	62
Figure 43: Méthode de diffusion sur gélose avec puits.....	64
Figure 44: la préparation des concentrations décroissantes des extraits testés .....	65
Figure 45: Plaque CCM de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> sur de gel de silice dans le système Hexane – AcOEt (7-3).....	67
Figure 46: spectre UV-visible du composé A1 .....	68
Figure 47: Courbe d'étalonnage d'acide gallique .....	69
Figure 48: Résultats de teneur en polyphénols totaux (TPC) de genre étudié .....	70
Figure 49: Courbe d'étalonnage de quercétine .....	70
Figure 50: Résultats de teneur en flavonoïdes totaux (TFC) de genre étudié .....	71
Figure 51: Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique (test DPPH).....	72
Figure 52: Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique .....	73
Figure 53: Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique (test Phénanthroline).....	74
Figure 54: Résultats de l'activité antioxydante (DPPH, TAC, Phénanthroline) de l'espèce étudiée .....	75

---

---

Figure 55: la sensibilité des souches bactériennes <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Enterococcus faecium</i> avec l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (Ext C) et l'extrait AcOEt (Ext A) .....	76
Figure 56: les différents diamètres des zones d'inhibition des extraits CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (Ext C) et AcOEt (Ext A) sur les souches antibactériennes .....	77

---

## **Liste des tableaux**

Tableau 1: description de quelques espèces du genre <i>Asperula</i> .....	7
Tableau 2: classification de genre <i>Asperula</i> .....	8
Tableau 3 : Principales classes de composés phénoliques .....	13
Tableau 4: Structures de quelques classes des flavonoïdes.....	15
Tableau 5 : Quelques métabolites isolés des Rubiacées .....	21
Tableau 6 : Différents types des espèces réactives .....	35
Tableau 7: Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires des parties aériennes d' <i>Asperula</i> .....	68
Tableau 8 : Résultats de Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux de genre étudiée ...	71
Tableau 9: Résultats de l'activité antioxydante de genre étudié .....	74
Tableau 10: Concentration minimal inhibitrices des extraits d' <i>Asperula</i> pour <i>Staphylococcus aureus</i> .....	77
Tableau 11 : Concentration minimal inhibitrices des extraits d' <i>Asperula</i> vis-à-vis <i>Enterococcus faecium</i> .....	78

---

## Abréviations

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Dichlorométhane

AcOEt : Acétate d'éthyle

BuOH : Butanol

MeOH : Méthanol

mL : millilitre

mg : milligramme

*A* : *Asperula*

Abs : Absorbance

EAA : Equivalent d'acide ascorbique

EAG : Equivalents d'acide gallique

EQ : Equivalent de quercétine

Abs : Absorbance

PA : Partie aérienne

DMSO : Diméthylsulfoxyde

BMH : Bouillon Müller-Hinton

Ext A : Extrait acétate d'éthyle

Ext B : Extrait butanolique

Ext C : Extrait dichlorométhanique

PA : Partie aérienne

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

*Ser. marcescens* : *Serratia marcescens*

---

*Kleb. pneumoniae* : *Klebsiella pneumoniae*

*Ent. farcium* : *Enterococcus farcium*

*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

*E.coli* : *Escherichia coli*

---

## *Introduction Générale*

### **Introduction générale**

Depuis les débuts de l'humanité, les plantes ont toujours répondu aux besoins essentiels des sociétés humaines, en fournissant nourriture, abri, vêtements, protection contre les agents pathogènes, ainsi que des remèdes contre de nombreuses maladies et infections (**Max RA et al, 2014**).

Parmi elles, les plantes médicinales se distinguent par leur richesse en composés phytochimiques capables de participer au maintien de l'équilibre physiologique de l'organisme humain. Le savoir lié à leurs vertus thérapeutiques s'est transmis de génération en génération, notamment dans les pays africains, où la médecine traditionnelle demeure un élément clé des systèmes de soins (**Hostettmann et al., 2002 ; Karou et al., 2011**). Toutefois, une grande partie de la biodiversité végétale médicinale reste encore peu explorée scientifiquement, ce qui freine la validation des usages empiriques rapportés par les populations locales. Il devient donc essentiel d'orienter les recherches futures vers une évaluation rigoureuse de ces espèces à potentiel thérapeutique.

Selon **Bruneton (1999)**, les plantes aromatiques présentent une importance économique considérable dans plusieurs domaines, notamment les industries pharmaceutique, agroalimentaire, cosmétique et officinale. Au-delà de leurs usages culinaires et de leurs propriétés olfactives, elles renferment une grande variété de composés bioactifs — tels que les alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, saponosides et huiles essentielles — auxquels sont attribuées de nombreuses vertus médicinales. Ces plantes constituent ainsi non seulement une base essentielle des remèdes traditionnels, mais également une ressource naturelle de premier plan pour la recherche et le développement de nouveaux médicaments (**Beloued, 1998**).

Parmi les familles botaniques d'intérêt, les Rubiacées représentent une vaste famille botanique comprenant environ 500 genres et plus de 6 000 espèces. Elles sont largement réparties dans les régions tropicales et subtropicales, avec une présence plus restreinte dans la zone tempérée froides (**Zhu, Y. 2024**)

Dans ce contexte, notre étude vise à mener une investigation phytochimique et biologique sur une plante appartenant au genre *Asperula*.

L'objectif principal est de caractériser les composés bioactifs qu'elle renferme, tout en évaluant ses activités biologiques potentielles, notamment ses effets antibactériens et antioxydants.

## *Introduction générale*

---

Notre mémoire est structuré en cinq chapitres. Le premier est consacré à une étude bibliographique sur la famille des Rubiacées et le genre *Asperula*. Le deuxième chapitre traite des métabolites secondaires, tandis que le troisième expose les principes des activités biologiques étudiées, à savoir l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne.

Le quatrième chapitre décrit les méthodes d'évaluation *in vitro* des activités antioxydante et antibactérienne, ainsi que l'étude phytochimique de la plante étudiée. Enfin, le cinquième chapitre est consacré à la discussion des résultats obtenus, suivie d'une conclusion générale récapitulant l'ensemble des travaux réalisés.

### Références Bibliographiques

- Beloued, A. (1998). *Plantes médicinales d'Algérie*. Alger : OPU.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie : Plantes médicinales* (Techniques et documentation). Paris : Éditions Lavoisier.
- Hostettmann, K., & Marston, A. (2002). Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews*, 1, 275–285.
- Karou, S. D., Tchacondo, T., Ilboudo, D. P., & Simpore, J. (2011). Sub-Saharan Rubiaceae: A review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14(3), 149–169. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.149.169>
- Max, R. A., Mwageni, C., & Bakari, G. G. (2014). Effect of crude root extract from *Synadenium glaucescens* on selected bacterial infections in albino mice (*Mus musculus*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(26), 915–923.
- Zhu, Y. (2024). A comparative study on antimicrobial effects of Rubiaceae plants. *Theoretical and Natural Science*, 48(1), 118–123.

*Chapitre 1 :*  
*Étude bibliographique*



# Chapitre 1 : Etude bibliographie

---

## 1. La famille de Rubiacées

### 1.1. Définition

Les Rubiacées, une famille de plantes appartenant à l'ordre des Gentianales au sein des eudicotylédones, incluent notamment le caféier. Avec environ 14000 espèces réparties en 637 genres et 60 tribus (**Razafimandimbison et al., 2024, Mongrand et al., 2005**), elles constituent la quatrième famille la plus riche en espèces et l'une des plus diversifiées parmi les plantes à fleurs après les Asteracées, Orchidacées et Fabacées (**Mabberley, 2017 ; Ly et al., 2020, Ehrendorfer et al., 2005**).

Cette famille est divisée en quatre sous-familles principales : Rubioideae, Cinchonoideae, Antirheoideae and Ixoroideae (**Martins et al., 2015**).



Figure 1: Plante de la famille Rubiacée

### 1.2. Description botanique de Rubiacées

La famille des Rubiacées présente une grande diversité de formes botanique, comprenant des arbres (jusqu'à 40 m comme *Blepharidium guatemalense*), des arbustes de petite taille (ex. *Maschalodesme*, 1-2 m), des lianes, des herbacées et des épiphytes (**Robbrecht, 1988 ; Gardner et al., 2000 ; Ricker et al., 2013**). On recense 32 genres grimpants en zone néotropicale (**Delprete, 2022**) et 88 dans l'Ancien Monde (**Hu et Li, 2015**), avec des mécanismes d'ascension variés : stipules, épines, racines adventives, tiges volubiles (**Robbrecht, 1988 ; Delprete, 2022**).

Les feuilles, simples et entières, sont souvent opposées ou décussées, parfois disposées en verticilles, avec des domaties chez certaines espèces (*Tricalysia*). Les stipules,

## *Chapitre 1 : Etude bibliographie*

---

intrapétiolaires ou interpétiolaires, peuvent être entières, bifides ou frangées, parfois glandulaires. Les fleurs sont majoritairement pentamères et hermaphrodites, souvent actinomorphes, à corolle tubulaire généralement blanche ou bleue, et étamines alternes avec les lobes. Le calice, soudé, forme un tube aux lobes variés. L'ovaire est en général infère et biloculaire, mais peut être semi-infère ou supère selon les espèces (**Robbrecht, 1988**).

Les fruits varient en forme et couleur (baies, drupes, capsules, etc.) ; leur taille varie selon les groupes (grands chez les Gardenieae, petits chez les herbacées). Les graines sont souvent nombreuses et petites, mais parfois grandes et protégées par un exostesta.

La pollinisation est majoritairement entomophile, parfois assurée par les chauves-souris ou les oiseaux (Burchellia). Les grains de pollen sont souvent tricolporés et isopolaires.

### **1.3. Utilisation traditionnelle des Rubiacées**

Les Rubiacées comptent parmi les familles botaniques les plus utilisées en médecine traditionnelle en raison de la richesse en composés bioactifs dotés d'un fort potentiel pharmacologique (**Karou et al., 2011** ; **Martins et Nunez, 2015**). Leur grande diversité chimique leur confère une vaste gamme d'usages à travers le monde, qu'ils soient médicinaux, alimentaires, industriels, culturels ou encore scientifiques, à l'échelle mondiale (**Dubey et Prakash, 2021** ; **Kagisha et al., 2021** ; **Chaniad et al., 2022** ; **González-Castelazo et al., 2023** ; **Jaafar et al., 2023** ; **Roy et al., 2023** ; **Rushdan et al., 2023** ; **Joseph et al., 2024**). Certaines espèces de Rubiacées, comme les caféiers, possèdent une importante valeur économique, tandis que d'autres, telles qu'Ixora, Gardenia, Mussaenda, Portlandia ou Serissa, sont particulièrement appréciées pour leurs qualités ornementales (**Putri et al., 2021**).

Les Rubiacées sont connues pour leur capacité à produire une grande variété de métabolites secondaires, parmi lesquels figurent les iridoïdes, anthraquinones, triterpènes et alcaloïdes indoliques, responsables de nombreuses propriétés thérapeutiques (**Martins et Nuñez, 2015**). Par exemple, *Coffea arabica* renferme de la caféine, un composé bioactif reconnu pour ses effets stimulants, diurétiques, vasoconstricteurs et bronchodilatateurs (**Simões et al., 2004**). De son côté, *Cinchona ledgeriana* constitue une source majeure de quinine, un antipaludique naturel ayant inspiré la synthèse de nombreux traitements modernes (**Viegas et al., 2006**).

Traditionnellement, les espèces de la famille des Rubiacées sont employées dans le traitement de nombreuses affections, notamment le paludisme, les troubles digestifs, la fièvre, la diarrhée, les infections urinaires et respiratoires, les céphalées, les inflammations ainsi que

## *Chapitre 1 : Etude bibliographie*

---

diverses maladies cutanées (**Conserva et al., 2012**). Certaines parties de plantes, notamment les racines, sont même traditionnellement utilisées dans le traitement du téton ou en cas de morsures venimeuses (**Allabi et al., 2011**). D'autres espèces de Rubiacées sont reconnues pour leurs propriétés expectorantes, anti-inflammatoires, antiémétiques et diaphorétiques, en particulier dans le traitement de la bronchite, des hémorroïdes et des céphalées (**Hall et al., 2012**).

Diverses plantes de la famille, comme le cafetier (*Coffea*), présentent une valeur économique notable. Plusieurs genres, tels que *Uncaria* Schreber, *Cinchona* L. et *Coffea* L., constituent des sources de matières premières pharmaceutiques utilisées à des fins thérapeutiques (**Martin et al., 2015**)

### **1.4. Distribution géographique des Rubiacées**

La famille des Rubiacées a une distribution cosmopolite, majoritairement présente dans les zones tropicales et subtropicales, notamment dans les forêts humides de plaine, où elle représente l'une des familles les plus riches en espèces ligneuses (**Davis et al., 2009**). Par exemple, dans la flore tropicale de la péninsule malaise, la famille comprend 24 genres et 237 espèces, aux côtés d'autres grandes familles telles que les Fabacées et Euphorbiacées (**Ng, 1988**).

Certaines espèces de Rubiacées se développent aussi dans des zones de haute altitude, comme dans les régions subpolaires, bien que leur diversité y soit plus limitée. Dans le nord-est des États-Unis et au Canada, seulement neuf genres répartis en quatre tribus sont recensés (**Gleason et al., 1991**).

**Selon Davis et al. (2009)**, les pays les plus riches en espèces de Rubiacées sont la Colombie, le Venezuela, la Nouvelle-Guinée, le nord du Brésil et la République démocratique du Congo. Le genre *Psychotria*, avec 1834 espèces, est le troisième plus grand genre d'angiospermes au monde, après *Astragalus* (Fabaceae) et *Bulbophyllum* (Orchidaceae) (**Frodin et al., 2004 ; Plants of the World Online**).

La famille comprend aussi une importante proportion de genres à faible diversité : environ 200 genres monotypiques, 330 genres avec 2 à 3 espèces, et 450 genres comptant entre 4 et 10 espèces (**Davis et al., 2009**). Environ 64 % des espèces de Rubiacées sont endémiques à une île ou un pays. Les régions les plus riches en espèces endémiques sont la Nouvelle-Guinée,

## *Chapitre 1 : Etude bibliographie*

---

Madagascar, les Philippines, Bornéo et Cuba, avec respectivement 620, 520, 443, 428 et 344 espèces endémiques (**Davis et al., 2009**).

### **2. Le genre *Asperula***

#### **2.1. Définition**

Le genre *Asperula*, appartenant à la tribu Rubieae de la famille des Rubiacées, compte entre 183 et 185 espèces, pour un total de 230 à 232 taxons selon les auteurs (**Latrou et al., 1984** ; **Minareci et al., 2007** ; **Thompson et al., 2009** ; **Minareci et al., 2010** ; **Öztürk et al., 2013**). Il est considéré comme l'un des genres les plus importants de cette famille (**Minareci et al., 2007**).

*Asperula* comprend majoritairement des espèces vivaces et suffrutescentes, réparties en dix sections (**Ehrendorfer et al., 2005**). Les espèces de ce genre, comme celles de la tribu Rubieae en général, sont autoincompatibles et ont une reproduction majoritairement allogame, l'autogamie étant rare (**Gücel et al., 2009** ; **Tao et al., 2011**).

Les genres *Rubia*, *Galium* et *Asperula* appartiennent tous à la même tribu Rubieae, issue de la sous-famille Rubioideae, au sein d'une famille Rubiaceae riche de plus de 10 000 espèces et 637 genres (**DerkSEN et al., 2001** ; **Mongrand et al., 2005**).



**Figure 2: Aspect morphologique d'*Asperula***

## Chapitre 1 : Etude bibliographie

### 2.2. Description du genre *Asperula*

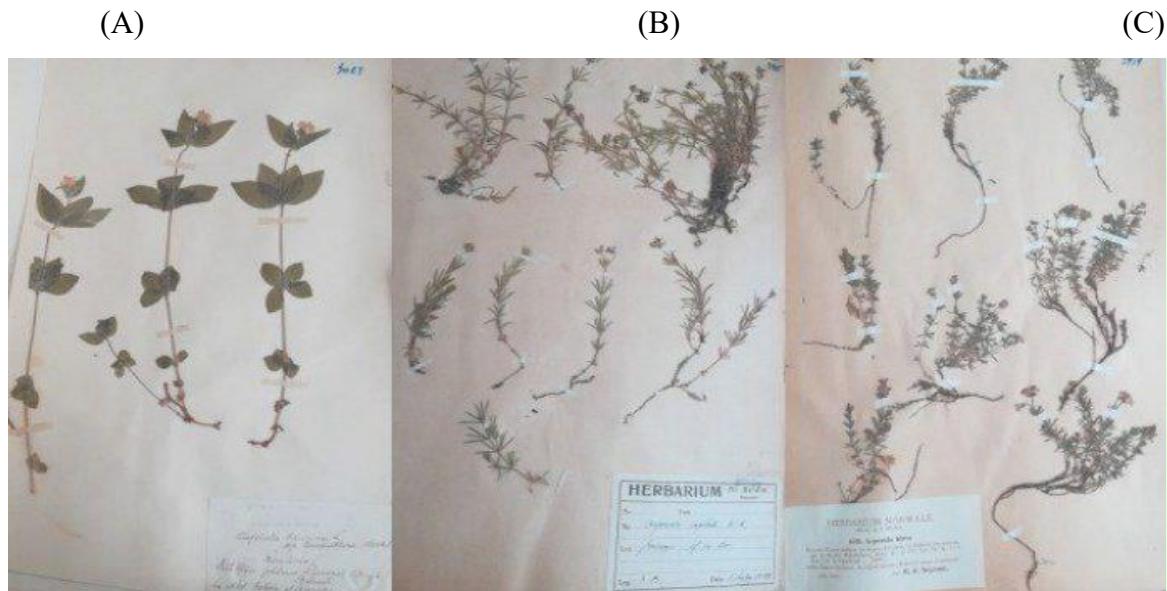
Le genre *Asperula* est représenté par plusieurs espèces largement distribuées en Europe, avec quelques-unes endémiques ou localisées. Les espèces de ce genre présentent une diversité morphologique marquée (**Codd et al., 2007 ; Caputo et al., 2013**)

**Tableau 1: description de quelques espèces du genre *Asperula***

Espèce d'asperula	Description
<i>Asperula taurina</i> (A)	Les tiges sont dressées ou ascendantes, à quatre angles, plus ou moins velues, avec de longs entre-nœuds. Les feuilles sont ovées-lancéolées, aiguës, très brièvement pétiolées, disposées en verticilles de quatre. L'inflorescence est entourée de bractées ciliées et inégales. Les corolles sont blanches ou jaunâtres pâles avec des anthères violettes ou blanches
<i>Asperula cynanchica</i>	Elle se distingue par de nombreuses tiges rampantes ou ascendantes, glabres et ramifiées. Les feuilles, linéaires et glabres, sont aiguës, disposées par quatre, aux marges plates à légèrement recourbées. Les corolles, généralement pâles (violacées à blanchâtres), sont largement infundibuliformes avec un tube dépassant les lobes d'au moins 1,5 fois.
<i>Asperula capitata</i> (B)	Les tiges, glabres et peu ramifiées, atteignent 30 cm. Les feuilles, linéaires et glabres, sont disposées en verticilles de 6 (ou 4 sur les rameaux stériles). L'inflorescence est capituliforme, avec 20 à 25 fleurs au sommet de la tige, entourées à la base par des bractées linéaires-lancéolées. Les corolles sont pâles (violacées à blanchâtres), avec un tube deux fois plus long que les lobes
<i>Asperula graveolens</i> <i>subsp. graveolens</i>	Les tiges sont obliquement ascendantes, à quatre angles. Les feuilles sont linéaires, plus courtes que les entre-nœuds, en verticilles de quatre. Les inflorescences sont lâches, à fleurs violet pâle, courtement pédicellées, avec des corolles poilues à l'extérieur et sur les nervures
<i>Asperula rumelica</i>	Elle a de nombreuses tiges glabres, peu ramifiées, avec des feuilles en verticilles de 4, étroites, linéaires et acuminées. Les corolles sont blanchâtres avec des lobes mesurant les deux tiers du tube. Les pédicelles mesurent 2 mm

## Chapitre 1 : Etude bibliographie

<i>Asperula hirta</i> (C)	Les tiges sont dressées ou ascendantes, glabres ou rarement hirsutes, portant 1 à 2 inflorescences. La corolle est rose pâle ou blanche rosée, glabre, avec un tube plus court que les lobes.
<i>Asperula glauca</i>	Les feuilles sont en verticilles de 8 à 10, linéaires, à extrémité arrondie portant une courte pointe. L'inflorescence est largement infundibuliforme avec des fleurs blanches en coupe.
<i>Asperula aristata</i>	Les tiges, dressées, sont lignifiées à la base, avec des feuilles linéaires, lisses et glabres. Les corolles ont des bractées courtes et lancéolées. Les fleurs sont rougeâtres à courts pédicelles dressés



**Figure 3: Quelque espèces du genre *Asperula* (A). *Asperula taurina* (B). *Asperula capitata* (C). *Asperula hirta* (Plesca, et al 2020)**

### 2.3. La position systématique

La position systématique d'*Asperula* selon la flore d'Algérie est la suivante :

**Tableau 2: classification de genre *Asperula***

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae

## Chapitre 1 : Etude bibliographie

---

Ordre	Rubiales
Famille	<b>Rubiaceae</b>
Genre	<i>Asperula</i>

### 2.4. Utilisation traditionnelle d'*Asperula*

*Asperula* est traditionnellement reconnue pour son efficacité dans le traitement de divers troubles notamment l'angoisse, les céphalées, l'insomnie, les palpitations, les troubles menstruels d'origine nerveuse, ainsi que les troubles digestifs liés au système neuro-végétatif (**Goetz et al., 2011**). Certaines espèces du genre *Asperula* sont également utilisées en tant que diurétique, tonique et antidiarrhéique (**Ufuk et al., 2018**).

Elles sont par ailleurs utilisées pour abaisser la pression artérielle, atténuer les œdèmes et contribuer à la prise en charge du diabète. Par ailleurs, ces plantes représentent une source précieuse de composés bioactifs, notamment aux propriétés antimicrobiennes (**Goetz et al., 2011**).

Bien que les recherches sur les activités biologiques de l'espèce étudiée du genre *Asperula* demeurent limitées, d'autres espèces de ce genre ont fait l'objet d'études approfondies. Leurs propriétés thérapeutiques ont été démontrées, notamment des activités anti-inflammatoires (Goetz et Le Jeune, 2011), antimicrobiennes, antifongiques, antihypoxiques (**Sergeevna et al., 2015 ; Yurchenko et al., 2013**), et surtout antioxydantes (**Ufuk et al., 2018**).

### 2.5. Distribution géographique

Le genre *Asperula* présente une large diversité géographique au sein du continent européen et au-delà. *Asperula taurina* se répartit depuis la région méditerranéenne jusqu'au centre de l'Europe, s'étendant vers le sud-ouest de l'Asie. *Asperula cynanchica* est une espèce largement répandue en Europe du Sud et du Centre, où elle colonise principalement les prairies sèches et calcaires (**Codd et al., 2007**).

En revanche, *Asperula capitata* montre une distribution plus restreinte, limitée à la Roumanie et à la Bulgarie. *Asperula graveolens* subsp. *graveolens* est présente en Europe du Sud-Est, croissant sur les sables marins et continentaux, notamment le long de la mer Noire et de certains cours d'eau en Roumanie. *Asperula rumelica* est originaire du sud-est et de l'est de l'Europe jusqu'au nord-ouest de la Turquie (**Caputo et al., 2013**).

## *Chapitre 1 : Etude bibliographie*

---

*Asperula hirta*, quant à elle, pousse dans la partie occidentale des Pyrénées, dans des habitats subalpins et alpins (**Chouard, 1948**). *Asperula glauca* est répandue en Europe de l'Ouest, du Centre et du Sud (**Ančev et al., 2011**), tandis qu'*Asperula aristata* est signalée en Europe du Sud-Est, ainsi que dans les Alpes et les Balkans nord-occidentaux (**Caputo et al., 2013**).

*Asperula* est abondante dans le Sud de la péninsule Ibérique et l'Afrique du Nord, à l'exception de l'Égypte. Cette espèce est très commune dans le Tell Algérien et toutes les régions montagneuses (**Clamote, 2017**

## Références bibliographiques

- Allabi, A. C., Busia, K., Ekanmian, V., & Bakiono, F. (2011). The use of medicinal plants in self-care in the Agonlin region of Benin. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 234–243.
- Ančev, M., & Krendl, F. (2011). *Galium* sect. *Leiogalium* (Rubiaceae) in the Bulgarian flora. *Phytologia Balcanica*, 17, 291–314.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie. Plantes médicinales* (1re éd.). Paris : Lavoisier, Techniques et documentation.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales* (2e éd.). Paris : Éditions médicales internationales, Tec & Doc Lavoisier.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales* (3e éd., pp. 101–120). Paris : Tec & Doc.
- Caputo, P., Aceto, S., Gaudio, L., & Gargiulo, D. R. (2013). Phylogeny of *Asperula* L. sect. *Cynanchicae* (DC.) Boiss. (Rubiaceae). (*Titre de la revue ou éditeur manquant, veuillez préciser*)
- Chaniad, P., Phuwajaroanpong, A., Techarang, T., Viriyavejakul, P., Chukaew, A., & Punsawad, C. (2022). Antiplasmoidal activity and cytotoxicity of plant extracts from the Asteraceae and Rubiaceae families. *Heliyon*, 8(1), e08848. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08848>
- Chouard, P. (1948). Coup d’œil sur les groupements végétaux des Pyrénées centrales. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 95(sup1), 145–149.
- Clamote, F. (2017). *Plantes : beauté et diversité*. [http://obotanicoaprendiznaterradosespantos.blogspot.com/2017/01/asperula\\_hirsuta.html](http://obotanicoaprendiznaterradosespantos.blogspot.com/2017/01/asperula_hirsuta.html)
- Codd, R. B., & Rich, T. C. G. (2007). Variation in *Asperula cynanchica* L. (Rubiaceae) in the British Isles. *Watsonia*, 26(4), 433.
- Conserva, L. M., & Ferreira, J. C. (2012). *Borreria* and *Spermacoce* species (Rubiaceae) : A review of their ethnomedicinal properties, chemical constituents, and biological activities. *Pharmacognosy Reviews*, 6, 46–55.

Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., Ruhsam, M., Moat, J., & Brummitt, N. A. (2009). A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96, 68–78.

Delprete, P. G. (2022). *Guide to the Genera of Lianas and Climbing Plants in the Neotropics : Rubiaceae.* Washington : Smithsonian Institution. Disponible sur : <https://naturalhistory.si.edu/sites/default/files/media/file/rubiaceae.pdf>

Derksen, G. C. H. (2001). Red, redder, madder. Analysis and isolation of anthraquinones from madder roots (*Rubia tinctorum*) (Thèse de doctorat). Bruxelles.

Dubey, K., & Prakash, S. (2021). Economic importance of Angiosperm. In *Economic Importance of Different Classes of Plants*.

Ehrendorfer, F., Schönbeck-Temesy, E., Puff, C., & Rechinger, W. (2005). Rubiaceae. In K. H. Rechinger (Éd.), *Flora Iranica* (Vol. 176). Vienne : Verlag des Naturhistorischen Museums Wien.

Frodin, D. G. (2004). History and concepts of big plant genera. *Taxon*, 53, 753–776.

Gardner, S., Sidisunthorn, P., & Anusarnsunthorn, V. (2000). *A Field Guide to Forest Trees of Northern Thailand*. Bangkok : Kobfai Publishing Project.

Gleason, H. A., & Cronquist, A. (1991). *Manual of Vascular Plants of Northeastern United States and Adjacent Canada* (2nd ed.). Bronx : The New York Botanical Garden.

Goetz, P., & Le Jeune, R. (2011). *Asperula odorata* L., Aspérule (partie aérienne de). *Phytothérapie*, 9(3), 185–188.

González-Castelazo, F., Soria-Jasso, L. E., Torrevillalvazo, I., Cariño-Cortés, R., Muñoz-Pérez, V. M., Ortiz, M. I., & Fernandez-Martinez, E. (2023). Plants of the Rubiaceae family with effect on metabolic syndrome : Constituents, pharmacology, and molecular targets. *Plants*, 12(20), 3583. <https://doi.org/10.3390/plants12203583>

Güçel, S., & Seçmen, O. (2009). Conservation biology of *Asperula daphneola* (Rubiaceae) in western Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 33, 257–262.

Hall, D. W., Vandiver, V. V., & Sellers, B. A. (2012). *Brazil Pusley, Richardia brasiliensis (Moq.)*. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Disponible sur : <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FW/FW03300.pdf>

Hu, L., & Li, M. (2015). Diversity and distribution of climbing plants in Eurasia and North Africa. In N. Parthasarathy (Ed.), *Biodiversity of Lianas, Sustainable Development and Biodiversity* (pp. 57–79). Cham : Springer.

Jaafar, A., Zulkipli, M. A., Hatta, F. H. M., Jahidin, A. H., Nasir, N. A. A., & Hasan, M. H. (2023). Therapeutic potentials of iridoids derived from Rubiaceae against in vitro and in vivo inflammation: A scoping review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 101876. <https://doi.org/10.1016/j.jpsp.2023.101876>

Joseph, P., Claude, J. P., & Abati, Y. (2024). Some considerations on the medicinal botany of the Lesser Antilles: The case of Martinique. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 12(4), Part A. <https://doi.org/10.22271/plants.2024.v12.i4a.1692>

Kagisha, V., Marini Djang'eing'a, R., Muganga, R., Bonnet, O., Tchinda, A. T., Jansen, O., & Frederich, M. (2021). *Pentas longiflora* Oliv. (Rubiaceae), a plant used in the treatment of Pityriasis Versicolor in Rwanda: Chemical composition and standardization of leaves and roots. *Fitoterapia*, 153, 104974. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104974>

Karou, S. D., Tchacondo, T., Ilboudo, D. P., & Simpore, J. (2011). Sub-Saharan Rubiaceae: A review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14(3), 149–169. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.149.169>

Latrou, G., & Georgiadis, T. (1984). A new species of *Asperula* (Rubiaceae) from Peloponnesos, Greece. *Willdenowia*, 14, 55–59.

Ly, S. N., Garavito, A., De-Block, P., Asselman, P., Guyeux, C., Charr, J. C., Janssens, S., Mouly, A., Hamon, P., & Guyot, R. (2020). Chloroplast genomes of Rubiaceae : Comparative genomics and molecular phylogeny in subfamily Ixoroideae. *PLoS One*, 15(4), 1–21.

Mabberley, D. J. (2017). Mabberley's Plant-Book : A Portable Dictionary of Plants, Their Classification and Uses (4th ed.). Cambridge : Cambridge University Press.

Martins, D., & Nunez, C. V. (2015). Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules*, 20, 13422–13495. <https://doi.org/10.3390/molecules200713422>

Minareci, E. (2007). The Revision of the section Thlipthisa (Griseb.) Ehrend. of the genus Asperula L. (Rubiaceae) spreading in Turkey (PhD thesis). Celal Bayar University, Manisa, Turkey.

Minareci, E., & Yıldız, K. (2010). *Asperula pseudochlorantha* var. *antalyensis* comb. et stat. nov. (Rubiaceae). *Annales Botanici Fennici*, 47, 121–128.

Mongrand, S., Badoc, A., Patouille, B., Lacomblez, C., Chavent, M., & Bessoule, J. J. (2005). Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry*, 66(5), 549–559.

Ng, F. S. P. (1988). Forest tree biology. In Earl of Cranbrook (Ed.), *Key Environments, Malaysia* (pp. 102–125). Oxford: Pergamon Press.

Öztürk, M. (2013). *Asperula anatolica* (Rubiaceae), a new species from South-East Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 37, 46–54.

Plants of the World Online. (Consulté le 22 avril 2023).

Plesca, I. M., Blaga, T., & Dincă, L. (2020). *Asperula* L. species preserved in “Alexandru Beldie” Herbarium. *Bulletin UASVM Horticulture*, 77(1), 1843–5394.

Putri, D. M., Junaedi, D. I., & Hendrian, R. (2021). Ornamental plant’s potentials of Indonesian native Rubiaceae collected in Cibodas Botanical Garden. *International Journal of Agriculture System*, 9(1), 1–9.

Razafimandimbison, S. G., & Rydin, C. (2024). Phylogeny and classification of the coffee family (Rubiaceae, Gentianales) : Overview and outlook. *Taxon*, 73, 673–717.

Ricker, M., Hernández, H. M., Sousa, M., & Ochoterena, H. (2013). Tree and tree-like species of Mexico : Asteraceae, Leguminosae, and Rubiaceae. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 439–470.

Robbrecht, E. (1988). Tropical woody Rubiaceae. *Opera Botanica Belgica*, 1, 1–273.

Roy, D., Brar, S., Bhatia, R., & Rangra, N. K. (2023). An insight into the ethnopharmacological importance of Indian subcontinent medicinal plant species of Rubiaceae family. *Advances in Traditional Medicine (ADTM)*.

Rushdan, N. A. N. A., Ab Ghani, N., & Rasol, N. E. (2023). Review on anthraquinones isolated from Rubiaceae family. *Journal of Science and Mathematics Letters*, 11, 163–174.

Sergeevna, I. N., Vasilevna, I. T., Mihaylovna, K. A., Leonidivna, T. E., & Aleksandrovna, K. I. (2015). The antihypoxic and sedative activity of the dry extract from *Asperula odorata* L. *Pharmacognosy Communications*, 5(4), 233–236.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2004). *Farmacognosia : Da planta ao medicamento* (6e éd.). Florianópolis, Brazil : UFSC University Press.

Tao, C., & Ehrendorfer, F. (2011). 28. *Galium* L. In Wu, Z. Y., Raven, P. H., & Deyuan, H. (Eds.), *Flora of China*, vol. 19 (pp. 104–141). St. Louis : Missouri Botanical Gardens Press.

Thompson, I. R. (2009). A revision of *Asperula* and *Galium* (Rubiaceae: Rubiaceae) in Australia. *Muelleria*, 27(1), 36–112.

Ufuk, Ö., Sila, Ö., Merve, B., Hatice, S., Seda, D., Ahmet, C., Cavit, K., & Erhan, P. (2018). Evaluation of HPLC, phytochemical, anticholinesterase and antioxidant profiles of the aerial parts of *Asperula taurina* subsp. *caucasica*. *Özgün Makale*, 42(1), 1–13.

Viegas, C., Bolzani, V. S., & Barreiro, E. J. (2006). *Os produtos naturais e a química medicinal moderna. Química Nova*, 29, 326–337.

Yurchenko, N. S., Il-Ina, T. V., & Kovaleva, A. M. (2013). Amino-acid composition of *Asperula odorata* herb. *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 401–402.

Zhu, Y. (2024). A comparative study on antimicrobial effects of Rubiaceae plants. *Theoretical and Natural Science*, 48(1), 118–123.

## *Chapitre 2 : Les métabolites secondaires*

## *Chapitre 2 : les métabolites secondaires*

---

### **1. Les Métabolites secondaires :**

#### **1.1 Définition**

Les métabolites secondaires sont issus de voies de synthèse qui, bien que non indispensables à la survie immédiate de l'organisme, peuvent lui conférer un avantage sélectif dans certaines conditions environnementales. Ils s'opposent aux métabolites primaires, produits des voies cataboliques et anaboliques essentielles à la croissance, au développement et à la reproduction cellulaire. Les métabolites secondaires présentent une grande diversité structurelle et fonctionnelle, et sont souvent dotés d'activités biologiques variées et sophistiquées. (**Drago, 2015**).

#### **1.2 Classification des métabolites secondaires**

La classification des métabolites secondaires des plantes repose sur leurs propriétés chimiques et les rassemblent en quatre groupes de molécules :

- Les composés phénoliques ou les polyphénols.
- Les alcaloïdes ou les composés azotés.
- Les terpènes.
- Les saponosides (**Merghem, 2009**)

##### **1.2.1 Les composés phénoliques ou les polyphénols**

Les composés phénoliques, également appelés polyphénols, sont des métabolites secondaires produits par les plantes. Bien qu'ils ne soient pas essentiels à leur survie mais ils jouent des rôles clés dans la protection et l'adaptation au milieu. Ils forment une famille très diversifiée de molécules largement répandues dans le règne végétal (**Macheix *et al.*, 2013**).

Ces composés ont en commun une structure chimique caractérisée par au moins un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (OH) (**Hennebelle *et al.*, 2004**).

Dans les plantes, les composés phénoliques participent à divers processus biologiques tels que le développement, la reproduction, la pigmentation, la défense contre les rayons UV, les herbivores, ou encore les pathogènes (**Shahidi *et al.*, 2015**).

## Chapitre 2 : les métabolites secondaires

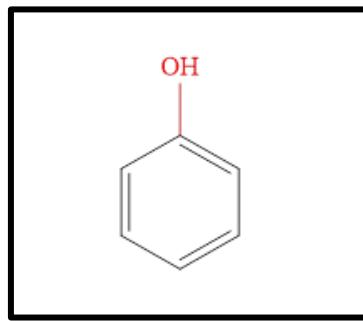


Figure 4: Structure d'unité de base des polyphénols

Cinq principales classes de composés phénoliques sont généralement distinguées ; elles sont présentées dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Principales classes de composés phénoliques (Macheix et al., 2005)

Nombre de C	Classe	Exemples/origine
C <sub>6</sub>	Phénols Simples	Catéchol
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénols	Hydroquinine
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acide cinnamique Coumarines Phénylpropènes	Acide cafféïque (Café) Esculétine (Citron) Eugénol (Giroflier)
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignane	Pinorésinol (Pin)
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) n	Lignines	Bois, noyau des fruits.
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes Isoflavonoïdes Anthocyanes	Apigénine (fruits) Génistéine (Soja, Pélargonidine (fruits rouges)
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoïde	Amentoflavone
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) n	Proanthocyanes (tannins)	Procyanidines (Raisin rouge)

### 1.2.1.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés appartenant à la famille des polyphénols, caractérisés par la présence d'une fonction acide carboxylique (-COOH) et d'un ou plusieurs groupes phénoliques (-OH portés par un noyau aromatique). Bien qu'ils soient généralement incolores

## Chapitre 2 : les métabolites secondaires

et moins abondants que d'autres types de polyphénols, ils sont largement distribués dans de nombreuses plantes alimentaires, médicinales et aromatiques, (Psotová et al., 2003).

Parmi les acides phénoliques les plus connus, on peut citer l'acide chlorogénique, l'acide caféïque, l'acide protocatéchique, l'acide vanillique, l'acide férulique, l'acide sinapique et l'acide gallique. Selon leur structure chimique, ces composés sont classés en deux grandes familles :

Les acides hydroxybenzoïques, qui sont des dérivés de l'acide benzoïque (structure de base C6–C1), comme l'acide protocatéchique, vanillique et gallique ;

Les acides hydroxycinnamiques, qui dérivent de l'acide cinnamique (structure C6–C3), tels que l'acide caféïque, férulique, sinapique et chlorogénique (Pandey et al., 2009).

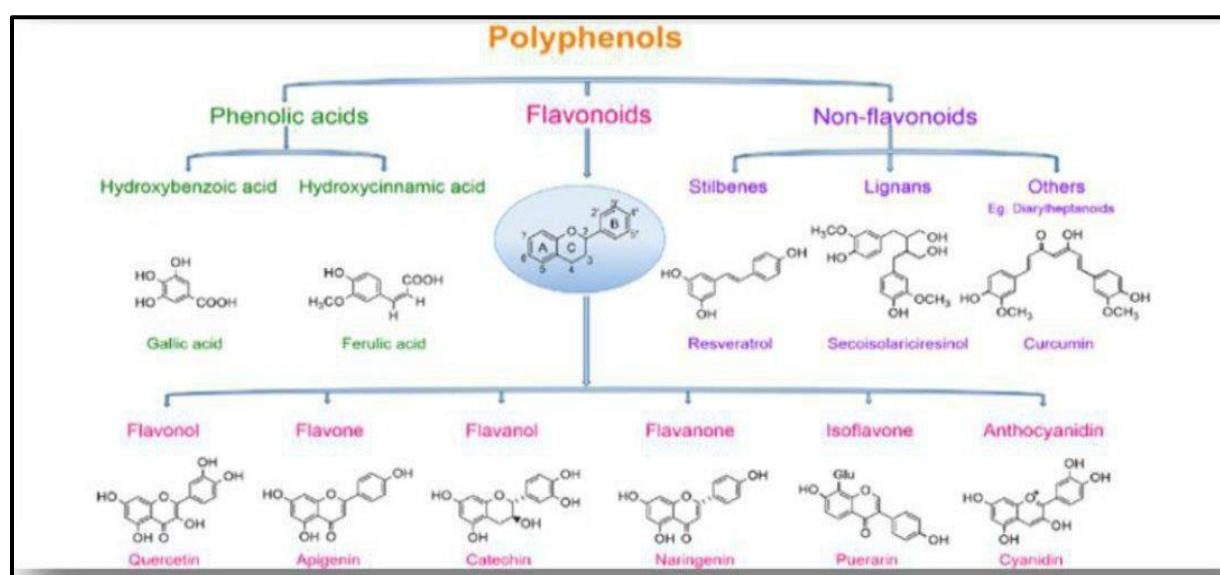


Figure 5: Classification des polyphénols (Macheix et al., 2006).

### 1.2.1.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent le groupe le plus important parmi les composés phénoliques. Ils jouent un rôle de pigments responsables des teintes jaunes, oranges et rouges observées dans divers organes végétaux (Yezza et al., 2014).

Leur structure de base comprend quinze atomes de carbone (C6-C3-C6), formée de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par un pont de trois carbones, souvent sous forme d'un hétérocycle C. Généralement hydrosolubles (Nijveldt et al., 2001),

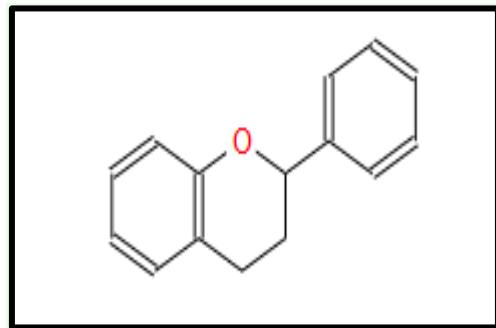


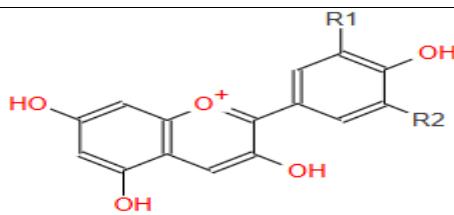
Figure 6: Structure générale d'un flavonoïde

Les flavonoïdes se répartissent en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau central, telles que les flavones, flavonols, flavanols, anthocyanes et aurones. Ils jouent également un rôle protecteur pour les tissus végétaux contre les effets nocifs des rayons ultraviolets (**Ahmad et al., 2015**).

Tableau 4: Structures de quelques classes des flavonoïdes

Classe de flavonoïde	Structure
Flavonols	 The structure shows a flavonoid core with a hydroxyl group (OH) at the 3-position and a 4-phenylpropanoyl group at the 2-position. The 2-oxo group is highlighted in red. Substituents R1, R2, R3, R4, and R5 are indicated on the outer rings.
Flavones	 The structure shows a flavonoid core with a hydroxyl group (OH) at the 3-position. The 2-oxo group is highlighted in red.
Flavanones	 The structure shows a flavonoid core with two hydroxyl groups (OH) at the 3-position. The 2-oxo group is highlighted in red.
Isoflavonoïde	 The structure shows a more complex flavonoid core with multiple hydroxyl groups (OH) and substituents R1 through R5.

### Anthocyanines

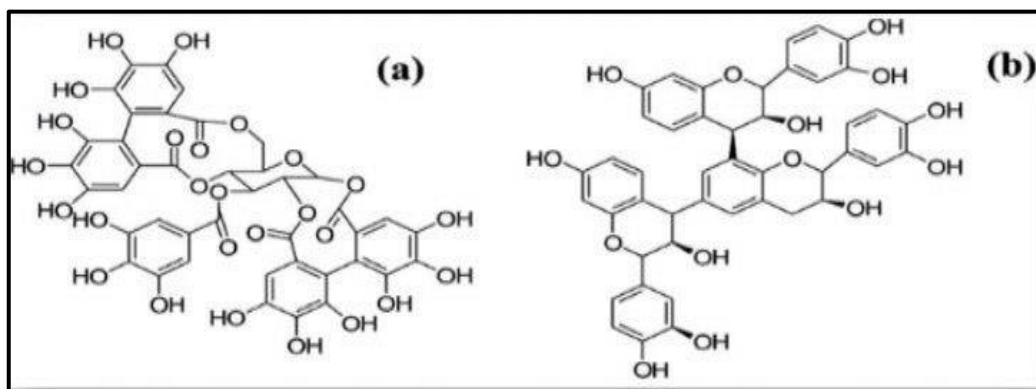


#### 1.2.1.3 Les tanins

Les tanins sont classés en deux grandes catégories selon leur structure chimique : les **tanins hydrolysables** et les **tanins condensés** (également appelés proanthocyanidines) (**Shahidi et al., 2004**).

- Les tanins condensés sont des oligomères ou polymères constitués d'unités flavonoïdiques, en particulier des flavan-3-ols comme la catéchine et l'épicatéchine.
- Les tanins hydrolysables, quant à eux, sont des sucres (principalement du glucose) estérifiés par des acides phénoliques, notamment l'acide gallique ou ses dérivés, comme l'acide ellagique. (**Ferreira et al., 2000 ; Khanbabae et al., 2001**)

Ils se distinguent des autres composés phénoliques par leurs activités chimiques et biologiques. Présents dans différentes parties des plantes, les tanins possèdent des propriétés antiseptiques, antibiotiques, astringentes, anti-inflammatoires, antidiarrhéiques, hémostatiques et vasoconstrictrices (**Ali-dellile et al., 2013**).



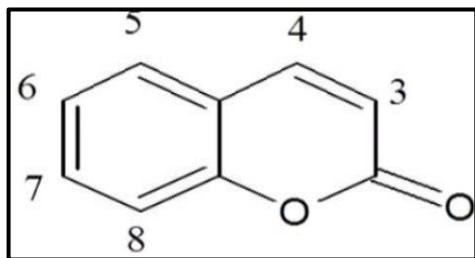
**Figure 7: Structures chimiques (a) d'un tanin hydrolysable et (b) d'un tanin condensé**

#### 1.2.1.4 Les coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques hétérocycliques oxygénés et volatils, largement distribués dans le règne végétal. Elles se caractérisent par leur fluorescence bleue à bleu-vert sous lumière ultraviolette, ce qui, associé à un spectre UV spécifique, facilite leur identification. Sur le plan physico-chimique, les coumarines sont solubles dans les alcools ainsi que dans

## *Chapitre 2 : les métabolites secondaires*

divers solvants organiques, notamment le diéthyléther et les solvants chlorés. (**Garabéth *et al.*, 2007**).



**Figure 8: structure de base des coumarines**

### 1.2.1.5 Quinones

Les quinones sont des composés aromatiques oxygénés résultant de l'oxydation de dérivés phénoliques. Elles se distinguent par leur forte réactivité chimique, notamment vis-à-vis des groupes amines libres ( $\text{NH}_2$ ) présents dans les protéines. Cette réactivité peut entraîner la formation de liaisons covalentes, provoquant ainsi une coloration durable de la peau ou des tissus biologiques. (Bruneton *et al.*, 2009).

## 1.2.2 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes (anciennement connus sous le nom de purines), forment une large famille de composés azotés d'origine naturelle, caractérisés par leur nature basique. Ils possèdent généralement des structures cycliques complexes, avec un atome d'azote intégré dans le cycle, jouant un rôle clé dans leur activité biologique. En raison de leur grande diversité chimique et structurale, leur classification demeure complexe. Elle se base sur plusieurs critères, notamment leur origine biologique, leur voie de biosynthèse et leur structure chimique (**Badiaga *et al.*, 2011**).

On peut classer les alcaloïdes en trois groupes, en fonction de leur biogénèse et de la position de l'azote (**Dehak *et al.*, 2013** ; **Beddou *et al.*, 2015**) :

- Les alcaloïdes vrais
  - Les proto-alcaloïdes
  - Les pseudo alcaloïdes

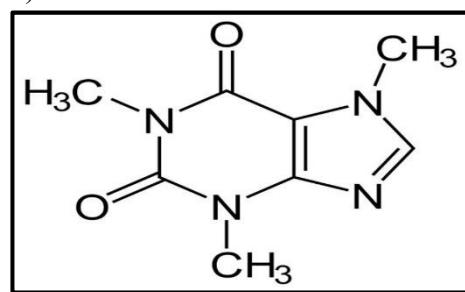


Figure 9: Structure de base des alcaloïdes

### 1.2.3 Les terpénoïdes

Le terme terpénoïde désigne l'ensemble des composés dont la structure moléculaire est basée sur une unité à cinq atomes de carbone appelée isoprène. Selon le nombre d'unités isopréniques qui les composent, on distingue :

- Monoterpènes (C10)
- Sesquiterpènes (C15)
- Diterpènes (C20)
- Triterpènes (C30)
- Tétraterpènes (C40)
- Polyterpènes (jusqu'à C4000) (**Merghem et al., 2009**)

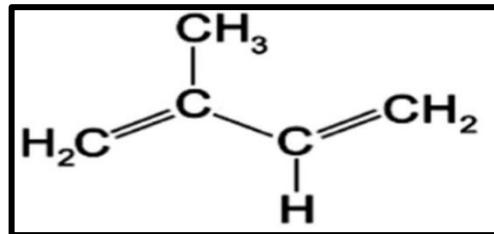


Figure 10: Structure de la molécule d'isoprène

Les terpénoïdes constituent l'un des groupes majeurs de métabolites secondaires produits par les végétaux. Ils dérivent des terpènes, qui sont des hydrocarbures naturels pouvant présenter une structure linéaire ou cyclique (**Hernandez-Ochoa et al., 2005**). Sur le plan chimique et fonctionnel, les terpénoïdes forment un ensemble extrêmement diversifié, regroupant des composés aux structures, propriétés et fonctions variées. Avec près de 15 000 structures identifiées, ils représentent l'une des classes les plus étendues et les plus complexes de composés organiques d'origine végétale (**Hopkins et al., 2003**).

Certains terpénoïdes, comme le menthol ou le limonène, sont connus pour leurs fortes odeurs, ce qui les rend utiles dans la fabrication des huiles essentielles. Ils sont également utilisés pour leurs propriétés antiseptiques, en cosmétique (notamment en parfumerie), ainsi que dans le traitement des affections respiratoires, grâce à leur activité antimicrobienne et expectorante (**lowe et al, 2024**)

### 1.2.4 Les saponosides

Le terme saponosides provient du mot savon. Ce sont des terpènes glycosylés, mais ils peuvent également exister sous forme d'aglycones, notamment à structure stéroïdienne. Ils se caractérisent par un goût amer et âcre (**Iserin et al., 2001**).

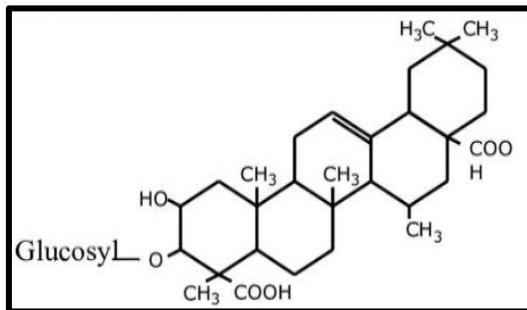


Figure11 : Structure de la molécule des saponosides

### 2. Méthode de séparation (Chromatographie)

#### 2.1 Définition

La chromatographie est une méthode physique d'analyse utilisée pour séparer les différents constituants d'un mélange. Ces constituants, appelés solutés, sont transportés par une phase mobile (liquide) à travers une phase stationnaire fixe. Les solutés interagissent différemment avec cette phase stationnaire, qui agit comme un frein en ralentissant leur progression. Cette interaction différentielle est à la base de la séparation. Le terme « chromatographie » provient du grec *chroma* (couleur) et *graphein* (écrire), en référence aux premières séparations de composés colorés réalisées par cette méthode.

#### 2.2 Les différents types de chromatographie :

Les méthodes chromatographiques sont classées selon le dispositif séparateur utilisé (phase stationnaire/mobile) et les paramètres physico-chimique intervenants :

**Phase mobile :** chromatographies (liquide)

Phase stationnaire :

- Chromatographies de surface (sur papier, sur couche mince (CCM))
- Chromatographies sur colonne

**Paramètres physico-chimiques :** chromatographies (d'adsorption ; de partage ; d'exclusion, échangeuse d'ion ; d'affinité)

## Chapitre 2 : les métabolites secondaires

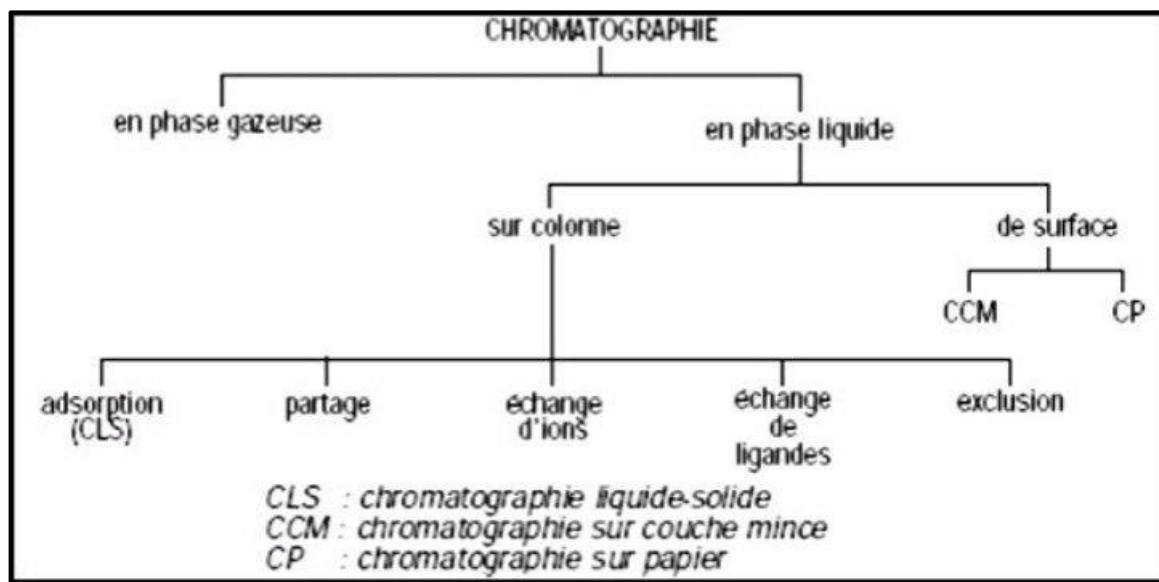


Figure 12 :Classification des méthodes chromatographiques

### 2.2.1 La chromatographie sur papier

Repose sur les phénomènes de partage (solubilité des molécules).

Phase mobile : solvant (BAW : BuOH, Acide Acétique, Eau)

Phase stationnaire : papier Whatman ou papier cellulosique

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique largement utilisée pour séparer et identifier les composés organiques (**Autran et al., 1991**). Elle repose sur un phénomène d'adsorption, dans lequel une phase mobile (généralement un solvant ou un mélange de solvants) migre le long d'une phase stationnaire, telle que le gel de silice, le polyamide ou la cellulose. Lors du processus, chaque composé est soumis à deux forces opposées : l'une de rétention exercée par la phase stationnaire, et l'autre d'entraînement due à la phase mobile. L'interaction entre ces deux forces permet une migration différenciée des substances, aboutissant à leur séparation (**Délattre et al., 2005**).

L'identification des composés se fait par comparaison avec des témoins déposées dans les mêmes conditions que l'échantillon étudié. Chaque témoin est caractérisé par une valeur de Rf (rapport frontal ou facteur de rétention), propre à lui. Une fois la migration terminée, les différentes tâches sont rendues visibles par un révélateur coloré, après un passage au chauffage (**Paulsen et al, 2002**).

## Chapitre 2 : les métabolites secondaires

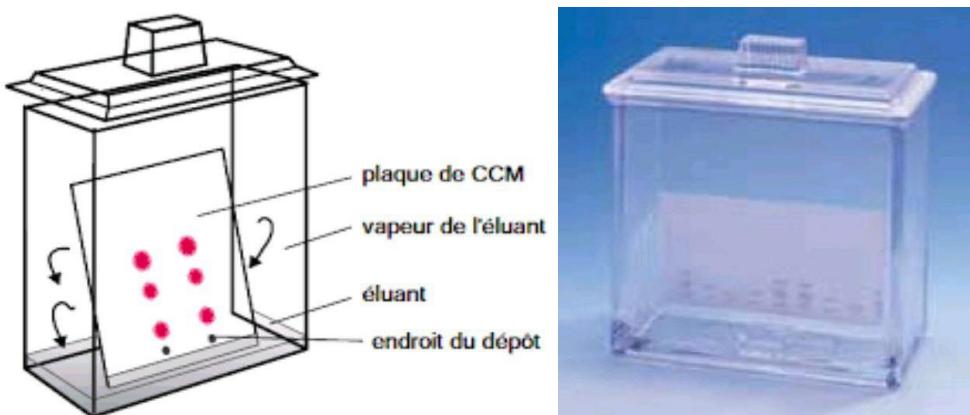


Figure 13 :Cuve chromatographique

### 3. Métabolites secondaires isolés des genres de la famille Rubiacées :

Des études phytochimiques menées sur les espèces appartenant à la famille des Rubiaceae, publiées entre 1990 et 2014, ont révélé que les iridoïdes, les anthraquinones, les triterpènes, les alcaloïdes indoliques, les flavonoides ainsi que d'autres sous-classes d'alcaloïdes figurent parmi les composés les plus fréquemment identifiés dans cette famille botanique (**Martins et al, 2015 ; Moubasher et al., 2016**)

Ces composés ont été principalement isolés des genres *Uncaria*, *Psychotria*, *Hedyotis*, *Ophiorrhiza* et *Morinda*. La répartition des iridoïdes, des alcaloïdes et des anthraquinones mettent en évidence leur corrélation chimio-taxonomique entre les tribus et les sous-familles. D'un point de vue évolutif, la sous-famille des Rubioideae est la plus ancienne, suivie par les Ixoroideae, puis les Cinchonoideae. La voie biosynthétique chimique, qui est moins spécifique chez les Rubioideae, peut expliquer cela, car de grandes quantités d'iridoïdes et d'alcaloïdes indoliques y sont produites. Chez les Ixoroideae, la voie biosynthétique la plus active est celle qui produit les iridoïdes ; tandis que chez les Cinchonoideae, elle produit principalement des alcaloïdes indoliques, ainsi que d'autres types d'alcaloïdes (**Martins et al, 2015**).

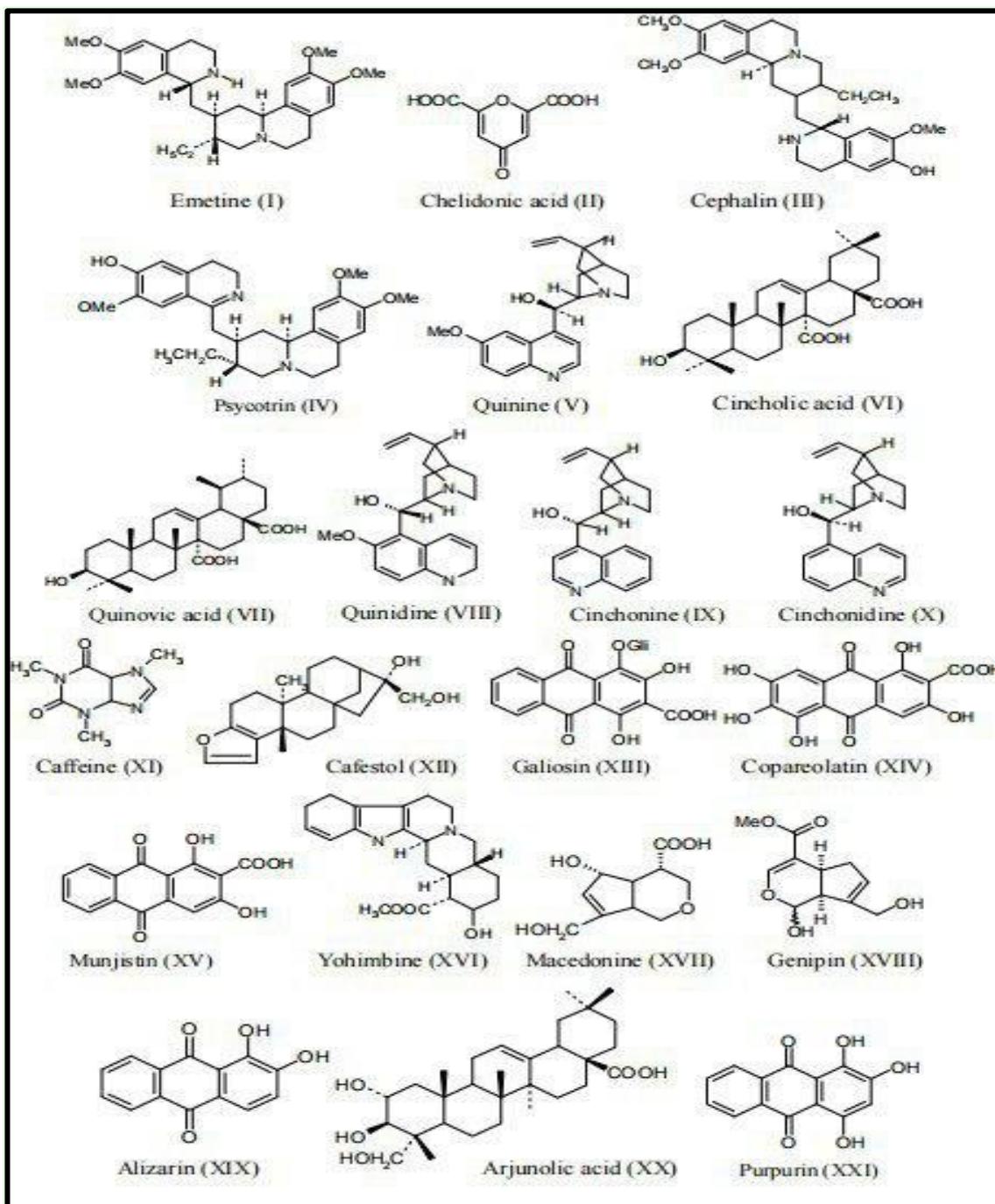
Tableau 5 : Quelques métabolites isolés des Rubiacées

Genre	Classe	Substance	Structure
<i>Cephaelis</i>	Alcaloïde	Emétine	I
	Lactone	Acide chélidonique	II
	Alcaloïde	Céphaline	III
	Alcaloïde	Psycotrine	IV

## Chapitre 2 : les métabolites secondaires

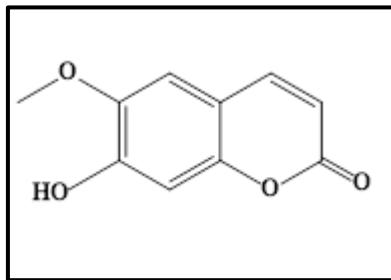
<i>Cinchona</i>	Alcaloïde	Quinine	V
	Triterpène	Acide cinchonique	VI
	Alcaloïde	Acide quinovique	VII
		Quinidine	VIII
		Cinchonine	IX
		Cinchonidine	X
<i>Coffea</i>	Méthylxanthine	Caféine	XI
	Diterpène	Cafestol	XII
	Anthraquinone	Galiosine	XIII
		Coparéolatine	XIV
		Munjistine	XV
<i>Corynanthe</i>	Alcaloïde	Yohimbine	XVI
<i>Galium</i>	Iridoïde	Macédonine	XVII
<i>Genipa</i>	Monoterpène	Génipine	XVIII
<i>Hedyotis</i>	Anthraquinone	Alizarine	XIX
<i>Landenbergia</i>	Alcaloïde	Quinidine	VIII
		Cinchonine	IX
		Cinchonidine	X
<i>Morinda</i>	Anthraquinone	Alizarine	XIX
<i>Mussaenda</i>	Triterpène	Acide arjunolique	XX
<i>Oldenlandia</i>	Anthraquinone	Alizarine	XIX
<i>Psychotria</i>	Alcaloïde	Psycotrine	IV
		Céphaline	III
<i>Relbunium</i>	Anthraquinone	Purpurine	XXI
<i>Remijia</i>	Alcaloïde	Quinidine	VIII
		Cinchonine	IX
		Cinchonidine	X
<i>Rubia</i>	Anthraquinone	Purpurine	XXI
	Anthraquinone	Alizarine	XIX

## Chapitre 2 : les métabolites secondaires



**Figure 14: Différentes classes de composés isolés de Rubiacées (Martins et al., 2015)**

Une étude phytochimique récente, portant sur l'extrait méthanolique des racines de *Xeromphis nilotica* (Rubiacées), a conduit à l'isolement et à la caractérisation de trois composés : la scopoletine (7-hydroxy-6-méthoxycoumarine) et deux de ses dérivés glycosylés (Yolidje et al., 2024)



**Figure 15: structure de la scopoletine**

#### 4. Métabolites secondaires isolés des espèces du genre *Asperula* :

Plusieurs études phytochimiques menées sur le genre *Asperula* ont mis en évidence la présence des iridoïdes, des flavonoïdes, des triterpènes ainsi que des acides phénoliques (**Minareci et al., 2011** ; **Özgen et al., 2018**). Par ailleurs, les coumarines et les anthraquinones ont été rapportées comme les principales classes de métabolites secondaires présentes dans ce genre (**Kırmızıbekmez et al., 2017**).

L’analyse par HPLC de l’extrait méthanolique de l’espèce *Asperula taurina* subsp. *caucasica* a permis l’identification de trois acides phénoliques : l’acide protocatéchique, l’acide *p*-hydroxybenzoïque et l’acide benzoïque. Par ailleurs, la quercétine 3-*O*- galactoside a été isolée à partir de la sous-fraction à l’acétate d’éthyle à l’aide de différentes techniques chromatographiques (**Özgen et al., 2018**).

## Chapitre 2 : les métabolites secondaires

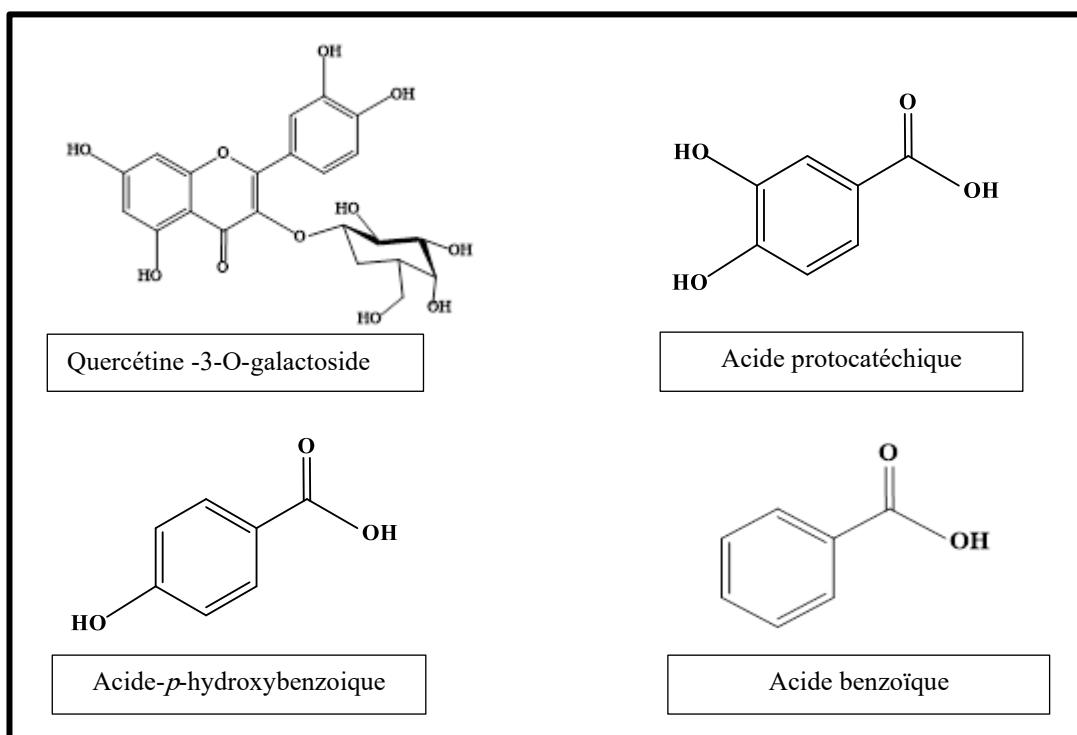


Figure 16: Structures chimiques des composés isolés de l'espèce *Asperula taurina*

## Chapitre 2 : les métabolites secondaires

---

Références bibliographiques :

- Autran, J.-C. (1991). *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires* (3e éd., pp. 115–137). Paris : Technique et Documentation.
- Ali-Dellile, L. (2013). *Les plantes médicinales d'Algérie* (pp. 6–11). Alger : Berti Éditions.
- Ahmad, A., Kaleem, M., Ahmed, Z., & Shafiq, H. (2015). Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections : A review. *Infectious Disorders – Drug Targets*, 15(1), 37–49.
- Badiaga, M. (2011). Étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali [Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand].
- Beddou, F. (2015). Étude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes : Rumex vesicarius L. et Anvillea radiata Coss. et Dur. [Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie].
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd., 1234 p.). Paris : Lavoisier.
- Delattre C. (2005). Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation Enzymatique de glucuronanes. Thèse de doctorat de l'université de Picardie Jules Verne, Valois Santerre.
- Dehak, K. (2013). Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles. Université KASDI Merbah Ouargla.
- Drago Haas. (2015). Métabolisme secondaire de Streptomyces ambofaciens : exploration génomique ET étude du groupe de genes dirigeant la synthèse du sphydrofurane. Biochimie, Biologie moléculaire. Université Paris saud-Pris XI, 2015. Français. NNT : 2015 PA 112052.
- E. Haslam, T.H. Lilley, Y. Cai, R. Martin, D. Mangnolato, (1989). Traditional Herbal Medicines - The Role of Polyphenols, *Planta Med.* 55 .1–8.
- Ferreira, D., & Li, X.-C. (2000). Oligomeric proanthocyanidins: Naturally occurring O-heterocycles. *Natural Products Report*, 17, 193–212.

## Chapitre 2 : les métabolites secondaires

---

Garabeth, F., Bouaoun, D et Elyafi-Elzahri, G. (2007). Étude quantitative des coumarines d'une plante sauvage Prangos asperula Boissier, Phytothérapie, Université de Damas, faculté des sciences, Syrie2 Universite libanaise, 259-263p.

Hernandez -Ochoa L.R., (2005). Substitution de solvants et matières actives

Hopkins, W. G. (2003). Molécules et métabolismes In physiologie végétale. De Boeck et Lacier (S.a). PP : 268-282. ISBN 2-7445-0089-5.

Hennebelle, T., Sahpaz, S. et Bailleul, F., 2004.Hennebelle, T., Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie, s.l. : 1 : 3-6.

Isrin P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soin. Ed: Larousse/ VUEF, 336 p.

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4076–4082.

Kırmızıbekmez, H., Tiftik, K., Kúsz, N., Orban-Gyapai, O., Zomborszki, Z. P., Hohmann, J (2017). Three New Iridoid Glycosides from the Aerial Parts of Asperula involucrata. *Chemistry & Biodiversity*, 14(3), e1600288

Lowe H, Ali A, Steele<sup>1</sup> B, Gordon L, Grantusti. (2024). The potential therapeutic value of terpenes. *INNOSC Theranostics and Pharmacological Sciences*, 7(3), 0332.

Macheix, J. J., Fleuriet, A., jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux (un exemple de métabolites secondaires d'importance économiques). Edition techniques et documentation Lavoisier.

MerghemRachide., (2009). Éléments de biochimie végétale P 95-171

Macheix, J. J. (2013). *Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle*. University of Stellenbosch, Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétales Appliquées, EA 728, Université Montpellier, Place E. Bataillon, F-34095 Montpellier Cedex 5.

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2006). Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In *Les polyphénols en agroalimentaire* (pp. 380–398). Édition Technologie et documentation.

## Chapitre 2 : les métabolites secondaires

---

Martins, D., & Nunez, C. V. (2015). Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules*, 20(7).

Minareci, E., Ergönül, B., Kayalar, H., & Kalyoncu, F. (2011). Chemical compositions and antioxidant activities of five endemic *Asperula* taxa. *Asian Journal of Chemistry*, 23(4), 1743–1746.

Moubasher, H., Abd El-Ghani, M., Al-Wakeel, S., & Bahoor, A. (2016). Chemotaxonomic significance of flavonoids in some species of *Galium* (Rubiaceae) from Libya. *Austin Journal of Plant Biology*, 2(1), 1014.

Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D., Boelens, P., van Norren, K., & van Leeuwen, P. (2001). Flavonoids, a review of probable mechanisms of action and potential application. *American Society for Clinical Nutrition*, 74, 418–425.

Özgen, U., Şener, S. Ö., Badem, M., Seçinti, H., Hatipoğlu, S. D., Gören, A. C., Kazaz, C., & Palaska, E. (2018). Evaluation of HPLC, phytochemical, anticholinesterase and antioxidant profiles of the aerial parts of *Asperula taurina* subsp. *caucasica*. *Records of Natural Products*, 12(2), 145–155.

Paulsen, B. S., Olafsdottir, E. S., & Ingolfsdottir, K. (2002). Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. *Journal of Chromatography*, 967, 163–171.

Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.

Psotová, J., Lasovský, J., & Vicar, J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers*, 147(2), 147–153.

Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices : Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.

Shahidi, F., & Naczk, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals* (pp. 1–558). Boca Raton, FL : CRC Press.

## *Chapitre 2 : les métabolites secondaires*

---

Valnet, J. (2003). Les huiles essentielles, une santé toute naturelle. Phytothérapie de la recherche à la pratique, 1(1), 12.

Yezza, S., & Bouchama, S. (2014). *Index des métabolites secondaires végétaux*. Université Kasdi Merbah Ouargla, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département des sciences biologiques.

Yolidje, I., Keita, D. A., Moussa, I., & Pirat, J.-L. (2024). Activité larvicide de la scopolétine et de son dérivé isolé de l'extrait méthanolique de la racine de *Xeromphis nilotica* (Rubiaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 18(5), 1832–1841.

---

## *Chapitre 3 : Les activités biologiques*

### 1. L'activité antibactérienne

Les propriétés antibactériennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Le terme "agent antibactérien" désigne toute substance utilisée pour détruire les bactéries ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques (**Yala et al., 2001**).

Une attention particulière est accordée aux méthodes utilisées pour évaluer les activités antimicrobiennes. Le choix de la méthode dépend de plusieurs critères, tels que la facilité d'application, la flexibilité, la possibilité d'automatisation, le coût ainsi que la reproductibilité des résultats. Parmi les essais biologiques les plus couramment utilisés figurent la méthode de diffusion sur disque, la dilution en bouillon et la dilution en gélose. Toutefois, il n'existe pas de protocole universellement standardisé pour présenter les résultats de l'activité antibactérienne. Ainsi, certains chercheurs s'appuient sur le diamètre de la zone d'inhibition, tandis que d'autres utilisent la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire la plus faible concentration d'extrait empêchant la croissance bactérienne (**Klančnik et al., 2010**).

Ces dernières années, on observe une augmentation significative des infections locales. Autrefois, les antibiotiques étaient largement utilisés à des fins thérapeutiques, mais l'émergence croissante de résistances chez de nombreuses bactéries pathogènes a fortement compromis leur efficacité. Dans ce contexte, les produits naturels issus des plantes médicinales représentent une alternative prometteuse en tant que source potentielle de nouveaux agents antibactériens (**Panda et al., 2025 ; Woo et al., 2024**).

#### 1.1 Les bactéries

Les bactéries Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires capables de se reproduire de façon autonome, contrairement aux virus qui nécessitent l'exploitation de la machinerie cellulaire d'un hôte pour se multiplier. Leur taille varie généralement de 1 à 10 µm, avec un poids estimé autour de  $10^{-12}$  grammes. Bien qu'environ 8 000 espèces aient été identifiées, on estime qu'il en existerait entre 100 et 1 000 fois plus dans la nature.

Ce sont de véritables systèmes biologiques miniatures, délimités par une membrane, capables de se répliquer fidèlement en utilisant l'énergie et les matières premières de leur environnement (**Cottinet et al., 2013**).

Par ailleurs, les bactéries jouent un rôle important dans de nombreuses applications industrielles, notamment dans la production d'enzymes, d'antibiotiques et d'autres molécules d'intérêt (**Madigan et al., 2018**).

### 1.2 Bactéries Gram positifs/ Gram négatif

Les bactéries sont généralement classées en deux grandes catégories : Gram positif et Gram négatif, en fonction de la structure de leur enveloppe cellulaire (**Silhavy et al., 2010**). Bien que les membranes internes ou cytoplasmiques soient similaires chez les deux groupes (**Yeaman et al., 2003 ; Van Meer et al., 2011**), des différences marquées apparaissent au niveau de leurs enveloppes externes, malgré la présence commune de peptidoglycane (**Li et al., 2017**).

Les bactéries Gram positives sont dites monodermes : elles possèdent une seule membrane plasmique, entourée d'une épaisse couche de peptidoglycane, ce qui leur confère une grande rigidité. En revanche, les bactéries Gram négatives sont didermes, avec deux membranes (interne et externe) séparées par une fine couche de peptidoglycane (**Gupta, 1998**).

La coloration de Gram, réalisée sur une culture jeune (16 à 24 heures), constitue la première étape dans l'identification d'une souche bactérienne inconnue. Elle permet de distinguer les deux groupes tout en fournissant des informations sur la forme et la taille des cellules (**Gregersen, 1978**) :

- **Gram positif** : les bactéries apparaissent violettes au microscope.
- **Gram négatif** : les bactéries apparaissent roses.

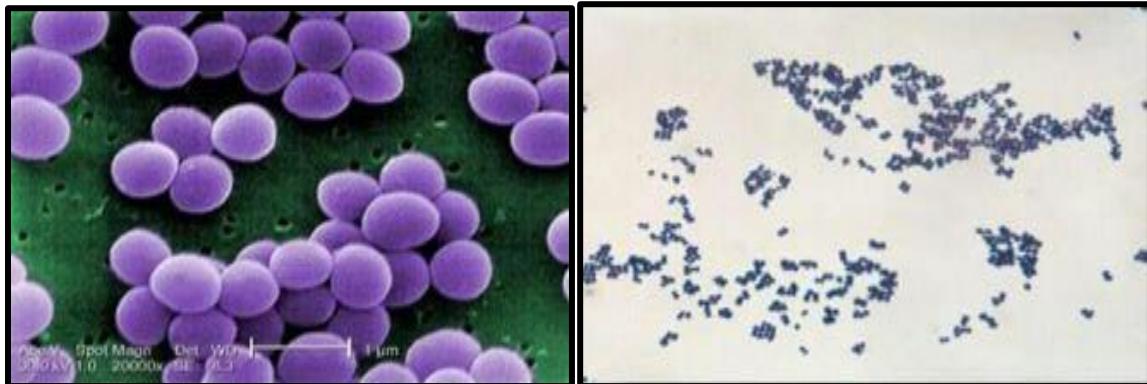
### 1.3 Souches bactériennes testées

#### 1.3.1 *Staphylococcus aureus* :

*Staphylococcus aureus* est une bactérie Gram positive, de forme cocci sphérique, mesurant entre 0,8 et 1 µm de diamètre. Elle est généralement observée en amas caractéristiques rappelant une grappe de raisin. Immobile, non sporulée et habituellement dépourvue de capsule, certaines souches peuvent produire un pigment doré dû à la staphyloxanthine, un caroténoïde antioxydant. (**Tong et al., 2015**).

*Staphylococcus aureus* est un pathogène opportuniste responsable d'un large éventail de maladies chez l'humain, allant d'infections cutanées superficielles à des affections graves voire létales telles que la pneumonie, la septicémie ou l'endocardite. Il figure également parmi les principaux agents de toxi-infections alimentaires, consécutives à l'ingestion d'aliments contaminés par des entérotoxines thermostables. L'intoxication alimentaire se caractérise par une période d'incubation courte (1 à 6 heures, en moyenne 3), suivie de symptômes aigus :

nausées, vomissements, douleurs abdominales, crampes et diarrhée. L'évolution est en général bénigne, avec une résolution spontanée en moins de 24 heures (**Kayser et al,2005**).

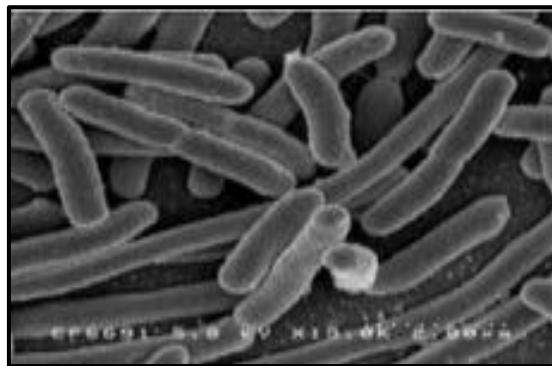


**Figure 17: Aspects caractéristiques en amas de coques à Gram positif de *S. aureus*. (Denis et al, 2007).**

### 1.3.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est une bactérie Gram négatif, en forme de bacille, non sporulée et généralement mobile grâce à des flagelles. Elle est anaérobiose facultative, mesurant entre 2 à 6  $\mu\text{m}$  de long et 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$  de large (**Patrick et al,1988 ; Steven et al,2004**).

*Escherichia coli* constitue une part importante de la flore microbienne aérobie intestinale chez l'être humain et chez de nombreux animaux. Bien que la majorité des souches soient commensales et jouent un rôle essentiel dans l'équilibre intestinal, certaines lignées pathogènes sont à l'origine d'infections digestives, d'infections urinaires, ou encore de méningites néonatales. Par ailleurs, même les souches commensales peuvent devenir opportunistes, en particulier chez les individus immunodéprimés, et provoquer diverses infections extra-intestinales (**Croxen et al, 2013**).



**Figure 18:** Micrographie électronique à balayage d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (Mueller et Tainter, 2023).

### 1.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie Gram-négative, en forme de bâtonnet, asporogène et monoflagellée. Elle a un aspect perlé et une odeur de raisin ou de tortilla.

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie Gram-négative, en forme de bacille, asporogène et monotrichie (à un seul flagelle polaire), souvent reconnaissable par son aspect perlé et une odeur caractéristique rappelant celle du raisin ou de la tortilla. Cette espèce se développe généralement entre 25 et 37 °C, mais sa capacité à croître à 42 °C permet de la différencier de nombreuses autres espèces du genre *Pseudomonas*. Microorganisme ubiquiste, *P. aeruginosa* est capable de survivre dans des environnements très variés. Chez l'humain, il est responsable d'infections sévères, en particulier chez les patients immunodéprimés, notamment ceux atteints de cancer, de brûlures graves, ou de fibrose kystique. (Wu et al, 2015)



**Figure 19 :** *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.3.4 *Klebsiella pneumoniae* :

*Klebsiella pneumoniae* est l'espèce la plus fréquemment isolée en clinique humaine parmi les membres du genre *Klebsiella*, baptisé en l'honneur du bactériologue Theodor Albrecht Edwin Klebs (1877). Cette entérobactérie est capable de survivre dans une grande diversité d'environnements, tels que l'eau, le sol, les surfaces végétales, ainsi que sur ou dans le corps humain, où elle peut coloniser les muqueuses (nasopharynx, tractus gastro-intestinal), la peau et la cavité buccale (Wyres et al., 2020 ; EL Kkoury et al., 2019). Le portage de *Klebsiella pneumoniae* est particulièrement élevé chez les patients hospitalisés, notamment au niveau des mains, ce qui favorise sa transmission croisée en milieu hospitalier (Pavageau, 2017). Il s'agit d'un bacille Gram négatif, immobile, non sporulé, généralement encapsulé, ce qui contribue fortement à sa virulence (Squeglia et al., 2020 ; Victoire, 2019). Cette bactérie pousse aisément sur des milieux de culture ordinaires, avec un métabolisme aérobie-anaérobiose facultatif, formant des colonies muqueuses, lactose positives à 37 °C après 18 h d'incubation (Clave, 2013). Sur le plan biochimique, elle se caractérise par un profil oxydase négatif, indole négatif, mais catalase positif, citrate positif et uréase positif, entre autres propriétés (Clave, 2013). *K. pneumoniae* est un pathogène opportuniste majeur, impliqué dans des infections nosocomiales graves telles que la pneumonie, les infections urinaires ou encore les septicémies, notamment chez les patients immunodéprimés ou hospitalisés en unités de soins intensif (Bachman, 2018 ; D'Apolito et al., 2020).

### 1.3.5 *Enterococcus* :

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont des coques Gram positif, non sporulantes, catalase négative, avec une teneur en GC inférieure à 50 %. Elles sont aéro-tolérantes et halotolérantes (croissance possible avec 6,5 % de NaCl). Leur habitat principal est le microbiote intestinal des animaux à sang chaud. Parmi les espèces les plus courantes figurent *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* et *E. casseliflavus* (Murray, 1990). Certaines souches, notamment celles du complexe clonal CC17 de *E. faecium*, sont impliquées dans des infections nosocomiales et présentent une multirésistance aux antibiotiques (ampicilline, fluoroquinolones), avec la présence de gènes de virulence comme esp et hylEfm (Leavis et al., 2006 ; Top et al., 2008 ; van Schaik et al., 2010). Ces souches peuvent également transférer leur résistance, notamment à la vancomycine (Leclercq et al., 1989).

### 1.3.6 *Serratia marcescens*

Le genre *Serratia* comprend une dizaine d'espèces, dont *Serratia marcescens* est la plus couramment isolée chez l'humain. C'est une espèce ubiquitaire, présente dans la nature (eau, sol, plantes, insectes, animaux), ainsi que dans les environnements hospitaliers et sur le matériel médical (Mahlen et al., 2011). C'est un bacille Gram négatif, mobile, aéro-anaérobie facultatif, formant des colonies lisses et bombées, parfois blanches, rouges ou roses, visibles à 37 °C en 18 h. Sur milieux contenant du lactose, elle est lactose – (Clave et al., 2018). Sur le plan biochimique, *S. marcescens* est catalase +, VP +, citrate +, ONPG +, et produit du gaz à partir du glucose, mais elle est oxydase –, urée – et H<sub>2</sub>S –. C'est une bactérie opportuniste, impliquée dans diverses infections nosocomiales, notamment urinaires, respiratoires, biliaires, cutanées, ainsi que dans des bactériémies, surtout chez les patients sondés ou en réanimation (Clave et al., 2018).

### 1.4 Nature de l'activité antibactérienne

- **Une activité létale (bactéricide)** : c'est la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies.
- **Une inhibition de la croissance (bactériostatique)** : c'est l'inhibition momentanée de la multiplication d'une population (Hammer et al., 1999)

### 1.5 Mode d'action contre les bactéries

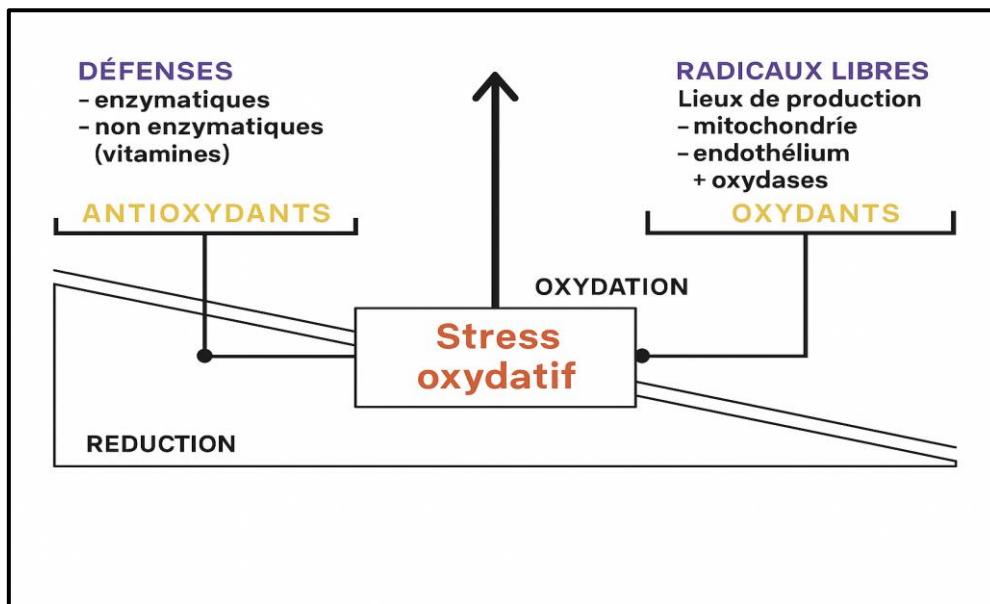
Les extraits végétaux agissent selon plusieurs mécanismes sur les différentes souches bactériennes. De manière générale, leur action se déroule en trois étapes principales (Dorman et al, 2000) :

- **Altération de la paroi bactérienne** : l'extrait végétal attaque la membrane cellulaire, ce qui augmente sa perméabilité et entraîne la perte des constituants intracellulaires.
- **Perturbation du métabolisme cellulaire** : l'acidification du cytoplasme bloque la production d'énergie et la synthèse des éléments structuraux de la cellule
- **Dégénération du matériel génétique** : cette action endommage l'ADN bactérien, menant à la mort cellulaire.

## 2. L'activité antioxydante

### 2.1 Stress oxydatif

Le stress oxydant représente une disproportion entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la faculté du corps à les neutraliser et à corriger les dommages causés par l'oxydation. Ce déséquilibre conduit souvent à des dégradations irréversibles pour les cellules (**Aravodis et al., 2005**). Ce déséquilibre est un facteur contribuant à l'émergence et à l'évolution de diverses pathologies, y compris le cancer, les troubles oculaires et les affections neurodégénératives (**Eddhima et al., 2019**).



**Figure 20:** Le déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Eddhima, 2019)

## 2.2 Les radicaux libres

### 2.2.1 Définition

Les radicaux libres sont des entités chimiques (atomes, ions ou molécules) caractérisées par la présence d'un électron non apparié sur leur orbitale externe (**Goto et al., 2008**). Cette configuration leur confère une grande instabilité et une forte réactivité.

Ces radicaux ont tendance à réagir rapidement avec d'autres molécules pour former de nouveaux radicaux, engendrant ainsi des réactions en chaîne. Ces chaînes réactionnelles ne peuvent être interrompues que par la rencontre de deux radicaux libres. *In vivo*, ces espèces réactives interagissent avec de nombreux constituants cellulaires, notamment les lipides, les protéines et les acides nucléiques, provoquant des altérations fonctionnelles. L'un des exemples

les plus représentatifs de ces réactions est la peroxydation lipidique, un mécanisme bien connu de dégradation des membranes cellulaires (**Durand et al., 2013**).

### 2.2.2 Formes des radicaux libres

#### 2.2.2.1 Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comprennent à la fois des radicaux oxygénés tels que l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), ainsi que des molécules précurseurs de radicaux libres, comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces composés très instables et hautement réactifs sont générés de manière continue dans l'organisme, notamment au cours de divers processus biologiques. En conditions physiologiques normales, leur production reste modérée et ne concerne qu'une faible fraction de l'oxygène utilisé lors de la respiration cellulaire (**Panth et al., 2016**).

#### 2.2.2.2 Espèces réactives de l'azote (RNS)

Le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ), produit par l'oxydation de l'un des groupements azotés de l'acide aminé L-arginine, constitue une espèce réactive de l'azote importante. Ce radical peut interagir avec une large gamme de composés, notamment d'autres radicaux libres. Par exemple, sa réaction avec le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) peut conduire à la formation de nitrite ( $NO_2^-$ ) ou de nitrate ( $NO_3^-$ ). De plus, la combinaison du monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ) avec l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) donne naissance au peroxynitrite ( $ONOO^-$ ). La forme protonée de ce dernier, le peroxynitrite acide ( $ONOOH$ ), est un oxydant puissant capable de provoquer des dommages cellulaires comparables à ceux induits par le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) (**Afkhami et al., 2004**)

**Tableau 6 : Différents types des espèces réactives (Gutowski et Kowalczyk, 2013)**

Espèces Radicalaires		Espèces non Radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^+$	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	$NO^+$	Oxygène singulet	${}^1O_2$
Radical alkoxyle	$RO^+$	Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Radical hydroxyle	$OH^+$	Peroxyde organique	$ROOH$
Radical peroxyde	$ROO^+$	Peroxynitrite	$ONOO^-$

### 2.2.3 Origine des radicaux libres

#### 2.2.3.1 Sources endogènes

Les radicaux libres peuvent être produits naturellement par l'organisme, principalement au cours de réactions enzymatiques. Parmi les enzymes les plus impliquées dans la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS), on peut citer la NADPH oxydase, la lipoxygénase et la xanthine oxydase (présente notamment dans le foie) (**Sumaya, 2004**).

#### 2.2.3.2 Sources exogènes

En plus des sources endogènes, de nombreux facteurs environnementaux et comportementaux contribuent à l'augmentation de la production et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

L'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV) est également une cause importante : elle stimule, via des agents photosensibilisants, la production de diverses espèces réactives telles que  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $^1O_2$  et  $H_2O_2$  (**Sumaya et al., 2004**).

Par ailleurs, des composés présents dans notre environnement quotidien, tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote ( $NO_2$ ), issus du tabagisme, des rayonnements ionisants, des champs électromagnétiques ou encore des polluants industriels, contribuent également à la formation de radicaux libres. Enfin, une alimentation déséquilibrée (riche en graisses saturées, en sucres raffinés ou en alcool) constitue un facteur aggravant (**Mena et al., 2009**).

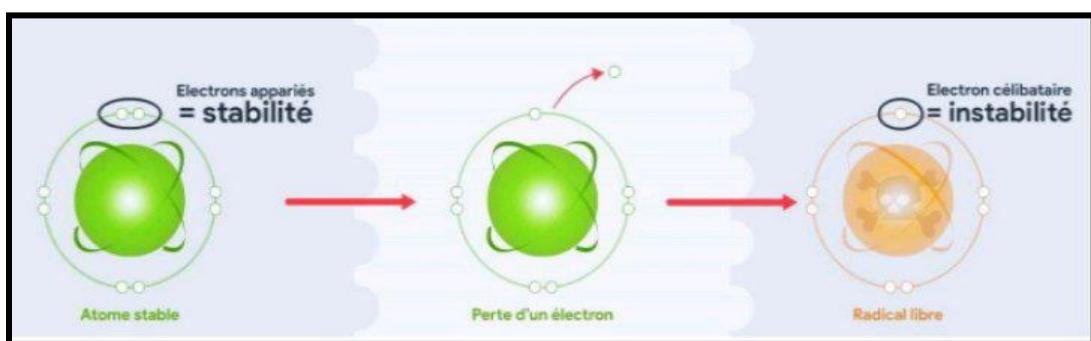


Figure 21: Formation des radicaux libre (Ghouti et Halbige,2019)

### 2.3 Les Antioxydantes

#### 2.3.1 Définition

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de neutraliser ou de limiter les effets néfastes des radicaux libres dans l'organisme. Leur action permet de maintenir des concentrations d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) à des niveaux non toxiques pour les cellules (**Favier, 2003**).

Ces substances jouent un rôle essentiel dans la prévention du vieillissement cellulaire et de diverses pathologies liées au stress oxydatif, notamment les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et les états inflammatoires. En plus de leurs applications biologiques, les antioxydants sont également utilisés dans l'industrie agroalimentaire afin de prévenir le rancissement des graisses ou la décoloration des aliments, des phénomènes généralement induits par l'oxydation sous l'effet de l'air, de la lumière, de la chaleur ou de certaines enzymes (**Scarim et al., 2019**).

Les antioxydants constituent un groupe très diversifié, incluant des petites molécules liposolubles telles que la vitamine E ou le  $\beta$ -carotène, des molécules hydrosolubles comme la vitamine C ou l'acide urique, des protéines enzymatiques, notamment la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase ou la catalase, ainsi que des composés non enzymatiques agissant par chélatation des métaux.

Ils peuvent être d'origine endogène (produits par l'organisme) ou exogène (apportés par l'alimentation ou par voie synthétique) (**Guo et al., 2006**).

#### 2.3.2 Types de substances antioxydantes

##### 2.3.2.1 Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont produits naturellement par l'organisme et constituent la première barrière de défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Baba et McGrath, 2008 ; Bensakhria, 2018**).

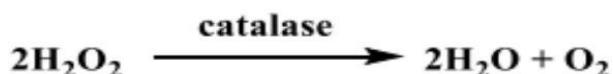
###### a) Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène, contribuant ainsi à réduire la toxicité des ERO (**Hocine et Gorine, 2017**).



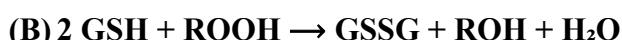
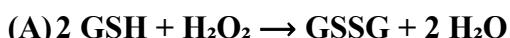
### b) Catalase (CAT)

Présente principalement dans les peroxysomes, les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales, la catalase transforme rapidement le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (**Matés et al., 1999**).



### c) Glutathion peroxydase (GPx)

Les glutathion peroxydases catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène (A) en oxydant deux molécules de Glutathion GSH réduites en GSSG. Elle assure plus largement la conversion des hydroperoxydes organiques, notamment des lipides de type ROOH, en alcools (ROH) (B) (**Dubois, 2015**).

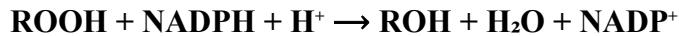


### d) Glutathion réductase (GR)

La glutathion réductase contribue indirectement à la défense antioxydant en régénérant le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction (**Garait et al., 2006**).

### e) Thioredoxine peroxydase (Trx)

Il s'agit d'une sélénoenzyme dépendante du NADPH, qui élimine des radicaux tels que  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ROOH}$  et  $\text{ONOO}^-$  par réduction (**Bensakhria et al., 2018**).



### 2.3.2.2 Antioxydants non enzymatiques

Ce sont de petites molécules qui agissent comme antioxydants sans catalyse. On les distingue en deux catégories : les antioxydants non enzymatiques endogènes (si la cellule eucaryote est capable de les synthétiser) et les antioxydantes non enzymatiques exogènes (apportées par l'alimentation) (Sharifi et al., 2020).

#### a) Antioxydants non enzymatiques endogènes

Ils existent plusieurs réducteurs endogènes capable de protéger l'organisme contre les ROS, les plus importantes sont le glutathion, la bilirubine, l'acide urique, la coenzyme Q, la mélatonine et l'acide lipoïque. (Sharifi et al., 2020).

- **Glutathion (GSH) :**

Le glutathion est un tripeptide intracellulaire majeur, intervenant dans la détoxicification du peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes a été bien établi (Delattre et al., 2005), et la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation (Stamler et Slivka, 1996).

- **Acide urique :**

L'acide urique est le produit final du catabolisme des purines chez l'homme. Il est présent en concentrations significatives dans le plasma, principalement sous forme d'urate, en raison du pH physiologique (~7,4), avant d'être éliminé principalement par voie rénale (Lacolley et al., 2007). L'urate possède également des propriétés antioxydantes importantes. *In vitro*, il s'est avéré capable de neutraliser des radicaux libres tels que le radical hydroxyle ( $\text{HO}^\cdot$ ) et le radical peroxyde ( $\text{RO}_2^\cdot$ ) (Delattre et al., 2005).

- **Bilirubine :**

La bilirubine est un produit terminal du catabolisme de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules du système réticuloendothéliale (foie, rate et moelle osseuse) chez les mammifères. La bilirubine est capable de piéger  $\text{ROO}^\cdot$  et l'oxygène

singulet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (**Algeciras-Schimnick et al., 2007**)

- **Acide lipoïque**

Il existe dans deux formes, oxydé et réduit, il est capable de piéger le HO<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup>, HOCl<sup>•</sup> et O<sub>2</sub> (**Packer et al., 2001**) de chélater les métaux lourds comme le fer et le cuivre et de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes comme les vitamines C et E (**David et al., 2015**).

### b) Antioxydants non enzymatiques exogènes

Étant donné que leurs principales voies de synthèse ne se trouvent souvent que dans les cellules microbiennes ou végétales, les antioxydants exogènes doivent être apportés en permanence par l'alimentation (**Sharifi et al., 2020**).

De nombreuses substances présentes dans notre alimentation, telles que les vitamines, les nutriments, les composés naturels, ... etc. sont considérées comme des antioxydantes (**Laib et al, 2020**), les plus populaires sont :

- **Vitamine E :**

La vitamine E appartient à la famille des tocophérols, molécules naturelles lipophiles, apportées par la nourriture (**Toussaint et al., 2003**). La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres en empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (**Evans et al., 2002**).

- **Vitamine C**

L'acide ascorbique, souvent connu sous le nom de vitamine C, est un puissant antioxydante aux propriétés hydrosolubles. Il inhibe la peroxydation des lipides dans le plasma (**Gaté et al., 1999**). Elle se trouve dans le cytosol et dans le liquide extracellulaire et possède des capacités de capter directement l'O<sub>2</sub><sup>•</sup> et l'OH<sup>•</sup>. Outre son rôle dans la production de vitamine E, la vitamine C a la capacité de réduire d'autre biomolécules oxydées et d'agir comme un piégeur direct de radicaux libres (**Evans et al., 2002**).

- **β-carotène**

En plus de son activité pro-vitamine A, elle est également capable de capter les molécules d'oxygène singulet. On la trouve dans les légumes verts, les épinards, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, la papaye et d'autres fruits jaunes (**Ahmet, 2003**).

- **Sélénum**

Le sélénum (Se) est un élément minéral crucial pour l'organisme. Il joue un rôle important dans la protection des cellules et des éléments qui les composent contre une attaque radicale. Il joue également un rôle de détoxication et de neutralisation des métaux lourds (cadmium, mercure, plomb) ou agit comme activateur de l'oxydation des xénobiotiques organiques. Le (Se) est présent dans les aliments riches en protéines animales (viandes, œufs, poissons, lait), dans les céréales et certains fruits secs (**Delattre et al., 2005**).

- **Polyphénols**

Ils peuvent agir en tant qu'antioxydants. Ils empêchent la formation des espèces radicalaires par inhibition les enzymes impliquées dans la formation de radicaux libres (comme la xanthine oxydase et la protéine kinase C), par chélation de métaux lourds ou agissent comme donneurs d'hydrogène dans les phases aqueuses ou lipidiques (**Rocha-Guzman et al., 2007**). Les plus répandus sont les anthocyanes, les tanins et les flavonoïdes (**Boizot et Charpentier, 2006**). Ces derniers ont une forte activité biologique qui est influencée par le type et le positionnement des substituts, en particulier la quantité de groupes hydroxyles (**Bouchouka et al., 2016**).

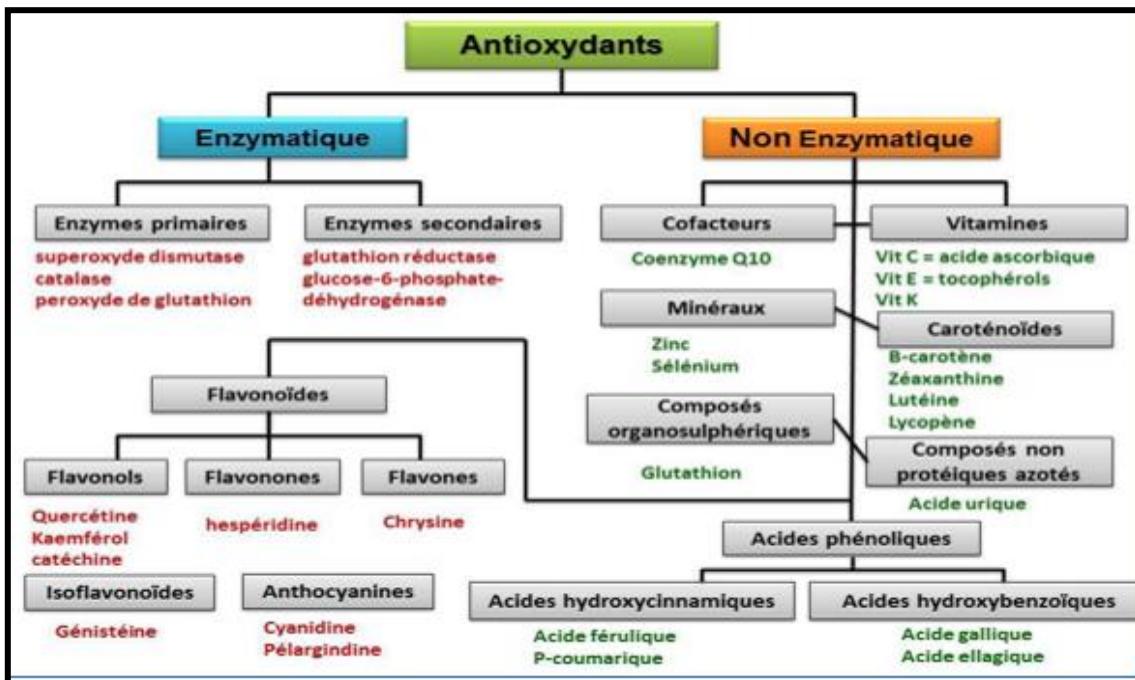
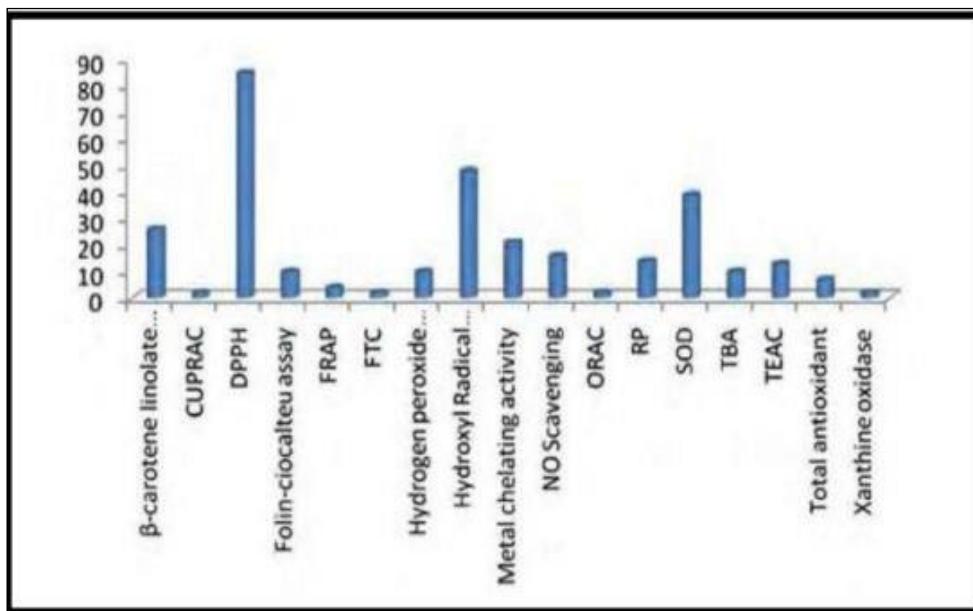


Figure 22: Les différentes classes des antioxydants (Pietta, 2000) (Ratnam et al., 2006) (Goodman., 2011).

#### 2.4 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant :

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer l'activité antioxydante, chacune étant choisie en fonction du type de radicaux libres utilisés comme source. Parmi les plus couramment employées figurent l'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), le FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), le TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), l'ABTS (2,2-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)) ainsi que le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), ect (Georgéva et al., 2010). Selon Alam et al. (2013), il existe actuellement 19 méthodes in vitro pour estimer la capacité antioxydante d'un échantillon, parmi lesquelles le test au DPPH est le plus fréquemment utilisé.

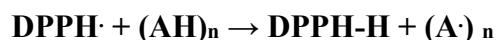


**Figure 23:** Fréquence d'utilisation des méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante (Alam et al., 2013).

Parmi les tests simples les plus fréquemment utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* par le biais d'une méthode spectrophotométrique, nous citons :

#### 2.4.1 Activité anti-radicalaire au DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$ ) est un radical libre stable, de couleur violette en solution, caractérisé par une absorbance maximale à 517 nm. Lorsqu'il entre en contact avec un antioxydant donneur de protons ou d'électrons, il est réduit en DPPH-H (diphényl picrylhydrazine), ce qui entraîne une diminution de l'intensité colorée de la solution. L'ampleur de cette décoloration est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante de l'échantillon testé. Cette réaction est fréquemment utilisée pour évaluer l'activité antiradicalaire des extraits naturels ou de composés purs (Halimi et al., 2015) :



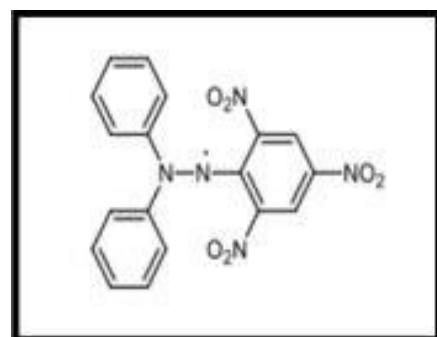


Figure 24: Structure chimique du radical libre DPPH (Cristina et al., 2009)

Où  $(AH)_n$  représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en Diphényle picryl hydrazine (jaune). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

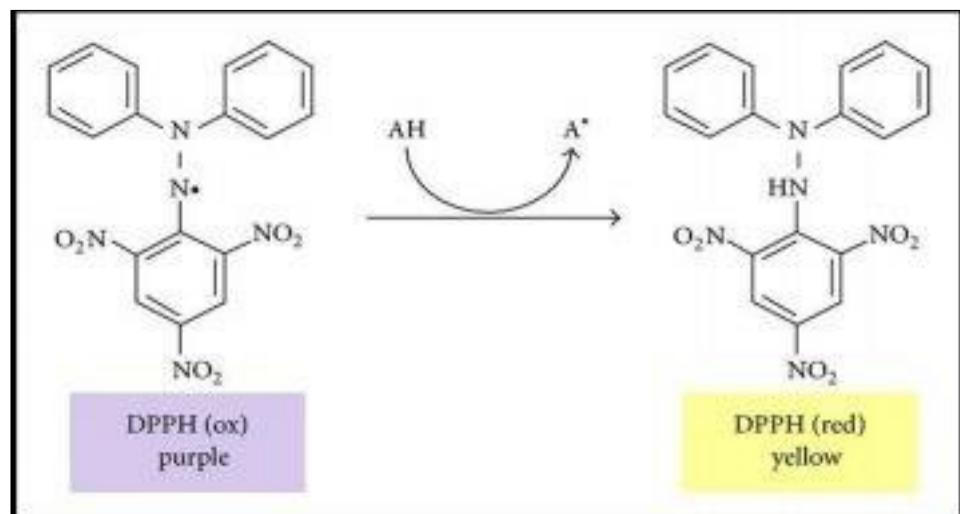


Figure 25: Piégeage du radical DPPH avec l'antioxydant (AH) (José et al., 2013).

#### 2.4.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS<sup>·+</sup>

L'ABTS incolore est d'abord oxydé avec du persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ) pour former le radical cationique ABTS<sup>·+</sup> de coloration bleu – vert. L'ajout d'antioxydant réduit le radical ABTS<sup>·+</sup> en ABTS<sup>+</sup>. L'activité antioxydante est déterminée par la couleur de la solution et exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) de l'absorbance à 734 nm, la longueur d'onde à laquelle le radical ABTS<sup>·+</sup> présente une bande d'absorption caractéristique (Sadeer et al., 2022).

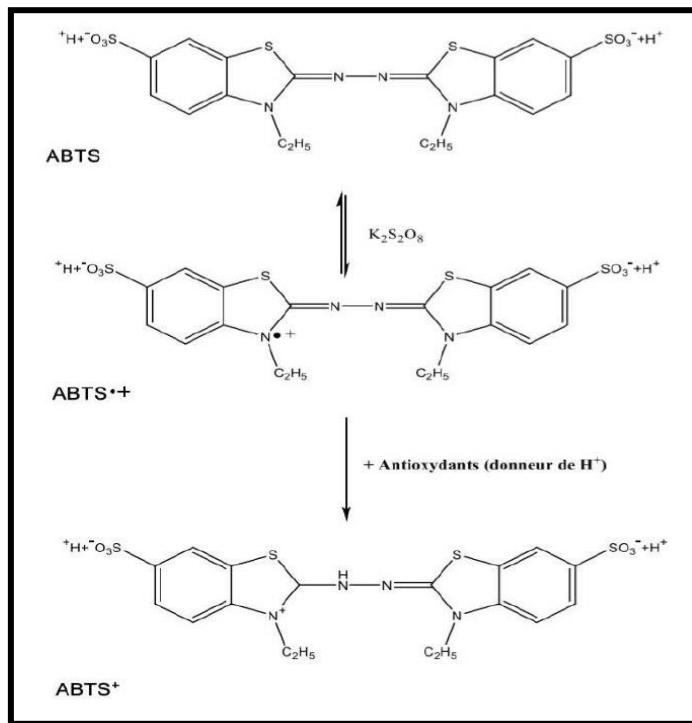


Figure 26: Formation et piégeage du radical ABTS $^{\bullet+}$  par un antioxydant (Sadeer et al., 2022).

#### 2.4.3 Réduction du fer par la méthode de FRAP

Cette méthode mesure la capacité des extraits à réduire le fer ferreux (Fe $^{3+}$ ) dans le complexe de ferricyanure de potassium (Fe $^{2+}$ ). La couleur du fer ferreux passe du jaune au bleu ou au vert en présence d'un atome d'électron (Habibou et al., 2019), le changement de la coloration du jaune au bleu ou au vert est proportionnel à l'activité antioxydant. Le pouvoir réducteur est déterminé par une simple mesure l'absorbance à 700 nm (Romanet et al., 2019)

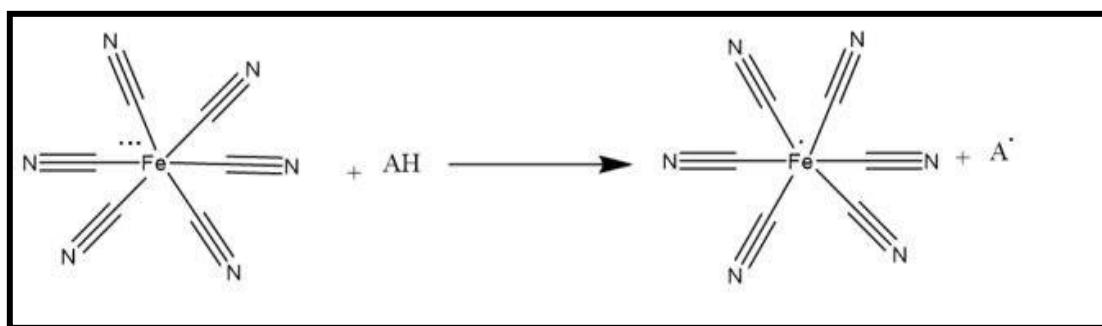


Figure 27: Schéma de la réaction de test FRAP (Dorman et al., 2000)

### **2.4.4 Piégeage du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Le test de piégeage du peroxyde d'hydrogène repose sur la capacité de certains composés antioxydants à neutraliser le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mesurée par la diminution de l'absorbance à 230 nm. En effet, le peroxyde d'hydrogène absorbe fortement dans l'ultraviolet, et sa concentration peut être suivie spectrophotométriquement. Lorsqu'un composé test interagit avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sa concentration diminue, entraînant une réduction proportionnelle de l'absorbance. Cependant, comme les échantillons peuvent eux-mêmes absorber à cette longueur d'onde, il est impératif de réaliser des blancs analytiques rigoureux pour corriger les interférences. L'exactitude de cette méthode dépend fortement de la précision des manipulations et du contrôle des conditions expérimentales (**Sadeer et al., 2022**)

### Références bibliographiques

- Afkhami, A., Nematollahi, D., Khalafi, L., & Rafiee, M. (2004). Kinetic study of the oxidation of some catecholamines by digital simulation of cyclic voltammograms. *International Journal of Chemical Kinetics*, 37(1), 17324.
- Ahamet, S. (2003). Étude phytochimique et des activités biologiques de Balanites aegyptiaca L. (Balanitaceae) [Thèse de pharmacie]. Bamako, 117 p.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143–152.
- Algeciras-Schimnich, A., Cook, W.-J., Milz, T.-C., Saenger, A.-K., & Karon, B.-S. (2007). Evaluation of haemoglobin interference in capillary heel-stick samples collected for determination of neonatal bilirubin. *Clinical Biochemistry*, 40, 1311–1316.
- Aravodis, E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(2), 128–133.
- Baba, L. M., & Grath, I. M. (2008). Oxygen free radicals: effects in the newborn period. *Advances in Neonatal Care Journal*, 8, 256–264.
- BELBEL, Z. (2014). Évaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de Klebsiella pneumoniae isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba [Thèse de doctorat]. Université Badji Mokhtar, Annaba, 146 p.
- Bensakhria, A. (2018). *Toxicologie générale – Stress oxydatif*. Université Catholique Saint Antonio de Murcia.
- Boizot, N., & Charpentier, J.-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des techniques de l'INRA*, 79–82.
- Bouchouka, E. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes sahariennes [Thèse de doctorat]. Université Badji Mokhtar, Annaba, 17 p.
- Brantner, A., & Grein, E. (1994). Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 44(1), 35–40.

## *Chapitre 3 : Activités biologiques*

---

Clave, D. (2013). *Fiche technique bactériologique : Enterobacter cloacae*. Toulouse : Centre Toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique.

Clave, D. (2018). *Fiche technique bactériologique : Serratia marcescens*. Toulouse : Centre Toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique.

Cottinet, D. (2013). Diversité phénotypique et adaptation chez *Escherichia coli* étudiées en millifluidique digitale [Thèse de doctorat]. Université Pierre et Marie Curie, Paris, 165 p.

Cristina, P., Ilonka, S., & Bartek, T. (2009). Évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 4, 25–39.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880.

Denis, F., Cécile, P., Martin, C., Bingen, E., & Quentin, R. (2007). *Bactériologie médicale*.

D'Apolito, D., Arena, F., Cont, V., De Angelis, L. H., Di Mento, G., Carreca, A. P., Cuscino, N., Russelli, G., Iannolo, G., Barbera, F., Pasqua, S., Monaco, F., Cardinale, F., Rossolini, G. M., Conaldi, P. G., & Douradinha, B. (2020). Évaluation phénotypique et moléculaire du potentiel de virulence des isolats cliniques de *Klebsiella pneumoniae* ST392 producteurs de KPC-3. *Recherche Microbiologique*, 240, 26551.

Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316.

Durand, D., Damon, M., & Gobert, M. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48(5), 218–224.

Dubois, B. (2015). Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète : Revue bibliographique [Thèse de doctorat]. Université Claude-Bernard Lyon I, France.

Delattre, J., Beaudeux, J.-L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Antioxydants et nutrition. In *Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques* (pp. 45–60, 261–276). Paris : Éd. Tec & Doc, Lavoisier.

David, G.-W. (2015). Encyclopedia of Mind Enhancing Foods, Drugs and Nutritional Substances (2nd ed.). Jefferson : McFarland & Company.

## Chapitre 3 : Activités biologiques

---

- El Khoury, J. (2019). Étude de la résistance aux bêta-lactamines chez *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* par des approches omiques [Thèse de doctorat]. Université du Canada, 224 p.
- Eddhima, Z. (2019). Les radicaux libres : effets, mécanisme et approches thérapeutiques [Thèse de doctorat].
- Evans, J.-L., Goldfine, I.-D., Maddux, B.-A., & Grodsky, G.-M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signalling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23, 599–622.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité Chimique*, 108–117.
- Garait, B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxyie) et effet de la Glisodin [Thèse de doctorat]. Université Joseph Fourier – Grenoble 1, pp. 123–125.
- Georgieva, S., Boyadzhiev, R., & Angelov, G. (2010). Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydante. *Revue de Génie Industriel*, 5, 124–132.
- GHOUDI, M., & Halbigue, H. (2019). Simulation du pouvoir antioxydant de deux anticancéreux de la famille des antimétabolites.
- Gregersen, T. (1978). Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5, 123–127.
- Guo, L., Xie, M.-Y., Yan, A.-P., Wan, Y.-Q., & Wu, Y.-M. (2006). Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC–MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 1881.
- Gupta, R. S. (1998). Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1435–1491.
- Goto, M., Ueda, K., & Hashimoto, T. (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(9), 1318–1325.

### **Chapitre 3 : Activités biologiques**

---

- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985–990.
- Hocine, F. M., & Gorine, M. A. (2017). Évaluation de l'exposition au plomb et cadmium et impact sur quelques paramètres du statut oxydant/antioxydant chez les ouvriers exposés aux fumées de soudage. [Thèse de doctorat non publiée].
- Habibou, H. H., Idrissa, M., Ikhiri Khalid, P., & Benjamin, O. (2019). Activité antioxydante des extraits méthanoliques de différents organes de *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. *European Scientific Journal*, 15(12), 159–171.
- Halmi, S. (2015). Étude botanique et phytochimique. Approche biologique et pharmacologique d'*Opuntia ficus indica*. [Thèse de doctorat, Université des frères Mentouri de Constantine].
- José, T., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants : An electrochemical overview. *BioMed Research International*, Article ID 251754.
- Kayser, M. D. F. H., Bienz, K. A., Eckert, Ph. D. J., & Zinkernagel, M. D. M. R. (2005). *Medical Microbiology* (p. 698). Thieme.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S. (2010). Évaluation des méthodes de diffusion et de dilution pour déterminer l'activité antibactérienne d'extraits végétaux. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 121–126.
- Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beuerman, R. W. (2017). Membrane active antimicrobial peptides : Translating mechanistic insights to design. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 1–18.
- Leavis, H. L., Willems, R. J. L., Top, J., & Bonten, M. J. M. (2006). High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1059–1064.
- Leclercq, R., Derlot, E., Weber, M., Duval, J., & Courvalin, P. (1989). Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(1), 10–15.

## *Chapitre 3 : Activités biologiques*

---

- Sadeer, N. B., Montesano, D., & Mahomoodally, M. F. (2022). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 11(3), 426.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), 1–16.
- Steven, P., Rachel, C., Martha, E., Paul, H., Jane, S., & Peter, W. J. (2004). *Microbiology of Waterborne Diseases*. Elsevier Academic Press, 71–132.
- Squeglia, F., Maciejewska, B., Łatka, A., Ruggiero, A., Briers, Y., Kawa, Z. D., & Berisio, R. (2020). Études structurelles et fonctionnelles d'un pic de queue de capsule de phage dépolymérase de Klebsiella : aperçus mécanistes de la dégradation capsulaire. *Structure*, 28, 613–624.
- Sumaya Martinez, M. T. (2004). Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation. Thèse de doctorat, Microbiologie.
- Scarim, C. B., Jornada, D. H., Machado, M. G. M., Ferreira, C. M. R., Santos, J. L., & Chung, M. C. (2019). Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malaria. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 162, 378–395.
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., & Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants : Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 694.
- Stamler, J. S., & Slivka, A. (1996). Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutrition Reviews*, 54(1), 1–30.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). Staphylococcus aureus infections : Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.
- Top, J., Willems, R., & Bonten, M. (2008). Emergence of CC17 Enterococcus faecium : From commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(1), 297–304.

## *Chapitre 3 : Activités biologiques*

---

Toussaint, J.-F., Jacob, P., Lagrost, L., & Chapman, J. (2003). *L'athérosclérose : physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques*. Éditions Masson, 776 p.

Van Meer, G., & de Kroon, A. I. (2011). Lipid map of the mammalian cell. *Journal of Cell Science*, 124(1), 5–8.

Victoire, G. (2019). Épidémiologie moléculaire des entérobactéries productrices de Bétalactamases à spectre élargi résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d'Abidjan, Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat, Université Félix Houphouët-Boigny, 152

Van Schaik, W., Top, J., Riley, D. R., Boekhorst, J., Vrijenhoek, J. E., Schapendonk, C. M., Hendrickx, A. P., Nijman, I. J., Bonten, M. J., Tettelin, H., & Willems, R. J. (2010). Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics*, 11, 239.

Woo, S., Marquez, L., Crandall, W., Risener, C., & Quave, C. L. (2024). Recent advances in the discovery of plant-derived antimicrobial natural products to combat antimicrobial resistant pathogens : Insights from 2018–2022. *Natural Product Reports*, 40(7), 1271–1290.

Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. In Molecular Medical Microbiology, 753–767.

Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Génomique des populations de *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiologie, Australie*.

Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55.

Yala, D., Merad, A. S., Mohamedi, D., & Ouar Korich, M. N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91.

---

## *Chapitre 4 : Matériels et méthodes*

## **Chapitre 4 : Materials et méthodes**

---

Notre travail a été effectué au laboratoire de l'Unité de Valorisation des ressources naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physico-Chimiques et biologiques, du département de Chimie, Université Constantine 1 et au laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Constantine pendant une durée de 4 mois

### **1. Préparation des extraits :**

Notre travail porte sur une étude phytochimique, suivie de l'évaluation de l'activité antibactérienne et de l'activité antioxydante des extraits issus de l'espèce *Asperula*, récoltée de la région de Batna.

#### **1.1 Séchage de la plante**

Le matériel végétal (parties aériennes) a été séché à température ambiante, à l'abri de la lumière directe du soleil, afin de préserver au mieux l'intégrité des composés bioactifs. Les échantillons séchés d'*Asperula* (parties aériennes) sont découpés en petits morceaux.



**Figure 28: Parties aériennes séché de l'*Asperula***

#### **1.2 Extraction et séparation de l'espèce étudiée :**

##### **1.2.1 Extraction solide-liquide (macération)**

Après le séchage du matériel végétal, 200g des parties aériennes sont macérés à température ambiante dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pendant 24 heures. Après filtration, l'extrait obtenu a été évaporé et concentré sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor) réglé à 35 °C. Cette opération a été répétée trois fois, avec renouvellement du solvant à chaque extraction.



**Figure 29:** Evaporation de l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  par l'évaporateur rotatif

Le marc des parties aériennes de la plante a été macéré à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol/ eau : 8/2) pendant 24h. Après filtration l'extrait récupéré est évaporé et concentré sous pression réduite dans un évaporateur (Rotavapor) rotatif à 40°C. Cette opération a été répétée 3 fois avec renouvellement du mélange.



**Figure 30:** Filtration de l'extrait hydrométhanolique des parties aériennes et des racines

### **1.2.2 Extraction liquide/liquide**

C'est une extraction basée sur le transfert de composés d'une phase liquide vers une autre phase liquide à condition que ces deux phases ne soient pas miscibles. Cette étape a débuté par la préparation de la phase aqueuse suivie d'extractions en utilisant des solvants de polarité croissante l'acétate d'éthyle (AcOEt), puis le n-butanol (n-BuOH).

L'extrait hydro alcoolique sec est dilué avec de l'eau distillée, une décantation pendant une nuit permet le dépôt de la chlorophylle, des cires... etc. Une solution aqueuse a été obtenue après filtration.

- Affrontement par AcOEt :

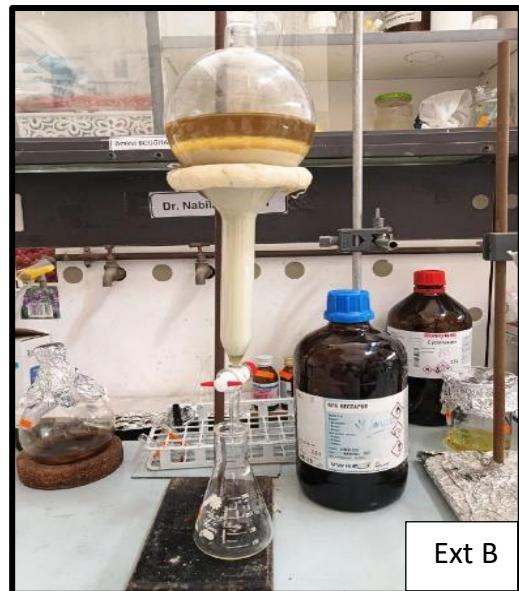
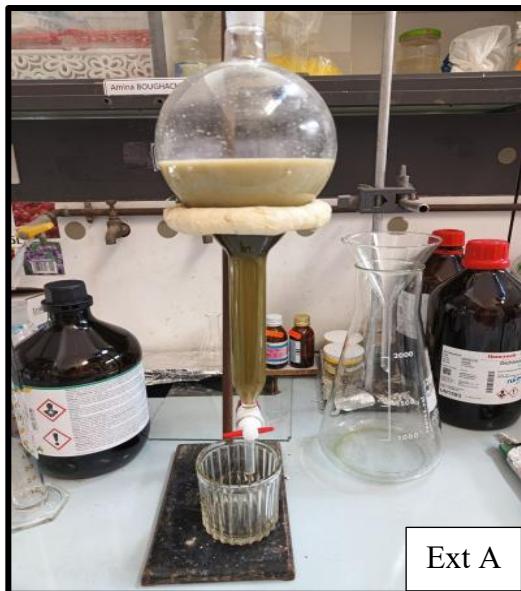
La solution aqueuse obtenue subi une extraction de type liquide-liquide dans une ampoule à décantée. 30 ml d'AcOEt sont ajoutés, puis laisser reposer pendant 30 min jusqu'à obtenir 2 phases :

- ✓ Une phase supérieure : la phase aqueuse.
- ✓ Une phase inférieure : la phase organique (la phase AcOEt),
- ✓ Cette opération est répétée 3 fois.

La phase organique récupérée est concentrée pour obtenir un extrait acétate d'AcOEt (Ext A) de masse (0,250g).

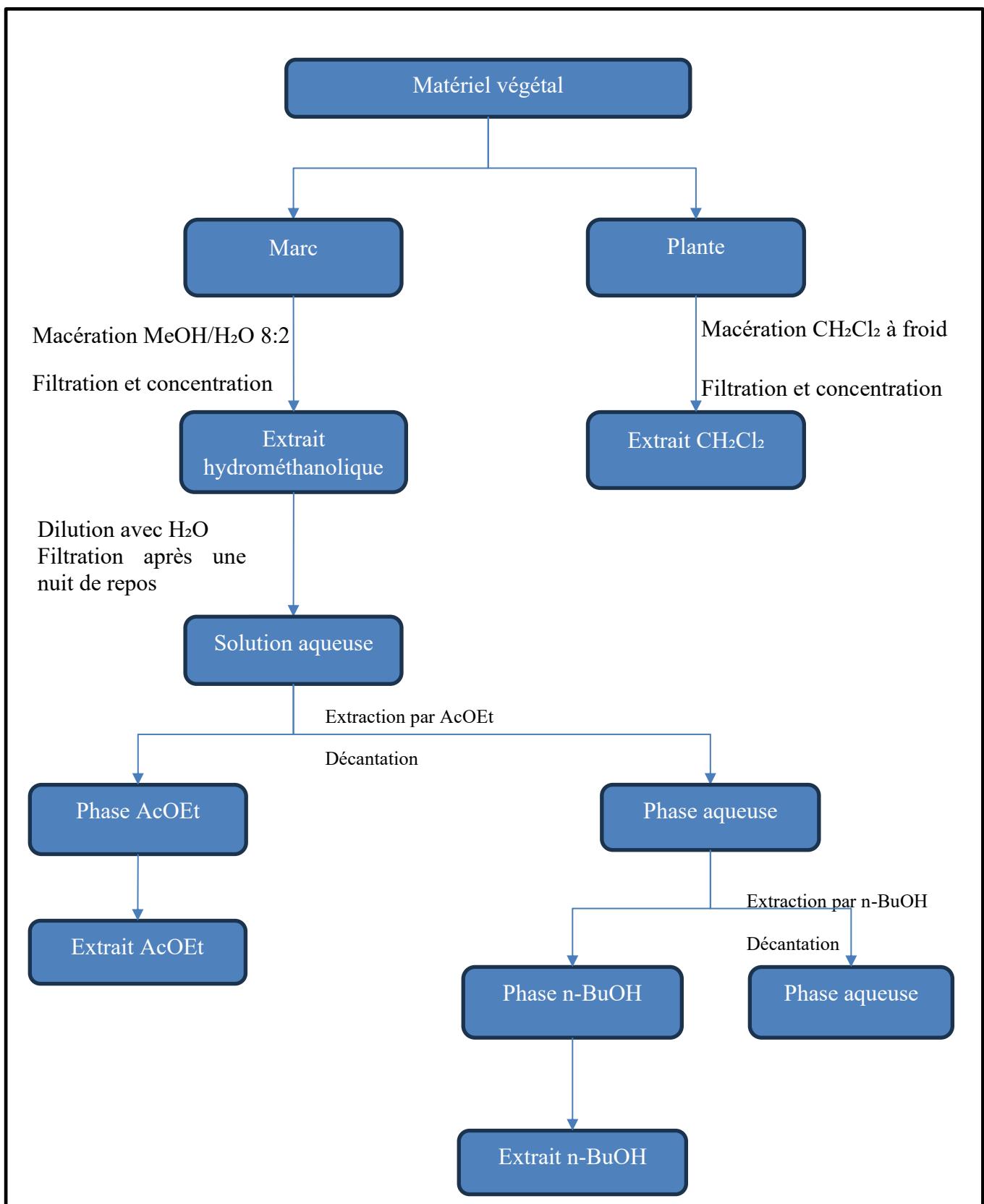
Affrontement par n-BuOH :

En suivant les mêmes étapes précédentes pour obtenir un extrait n-BuOH (Ext B) de masse (2,429g).



**Figure 31: Affrontements par les deux solvants AcOEt (Ext A) et n-BuOH (Ext B)**

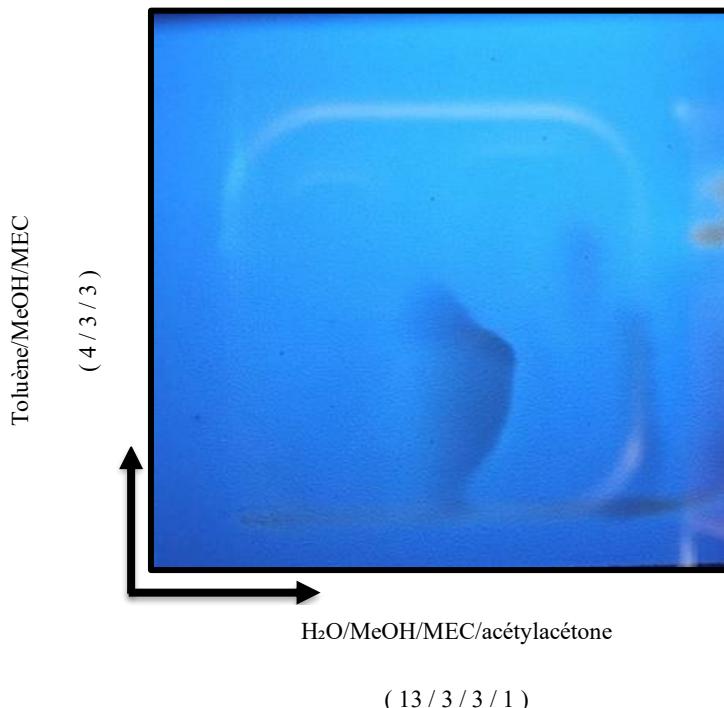
Le protocole d'extraction est représenté dans le Schéma 1.



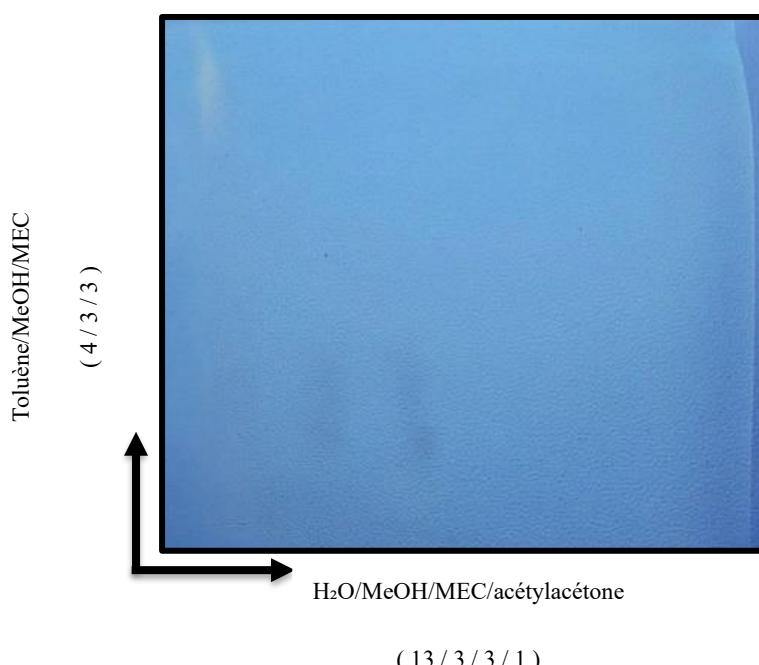
**Figure 32 : Schéma des différentes étapes d'extraction des parties aériennes de la plante étudiée.**

## 2. L'étude phytochimique de la plante étudiée

Afin de déterminer la composition des extraits polaires des parties aériennes de l'espèce étudiée, une CCM bidimensionnelle de polyamide DC6 pour chaque extrait a été réalisée en utilisant deux systèmes d'élutions différents puis la CCM est visualisée sous lampe UV à 365 nm.



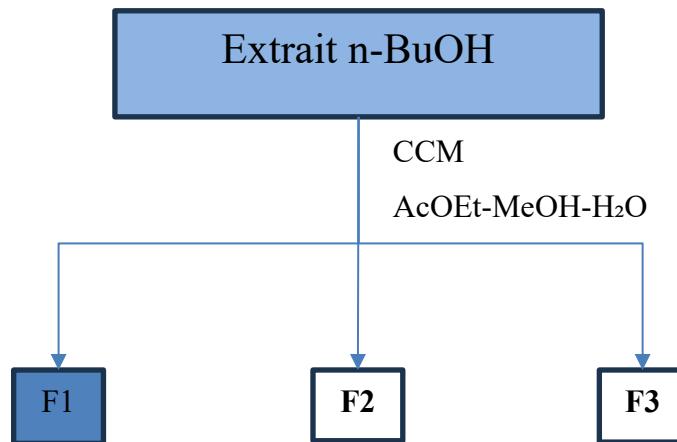
**Figure 33: CCM bidimensionnelle de polyamide de l'extrait n-BuOH des PA**



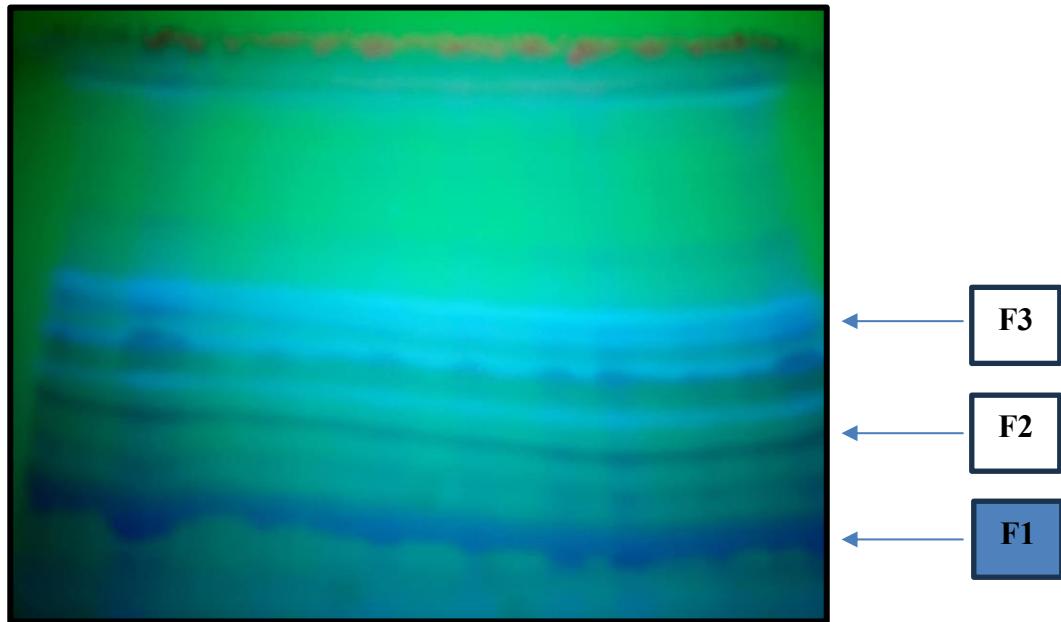
**Figure 34: CCM bidimensionnelle de polyamide de l'extrait AcOEt**

### 3. Séparation et purification de l'extrait n-BuOH

La séparation de l'extrait n-BuOH a été réalisé par une chromatographie sur couche mince (gel de silice) préparative, en utilisant un système d'élution (AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O) 8-2-2.

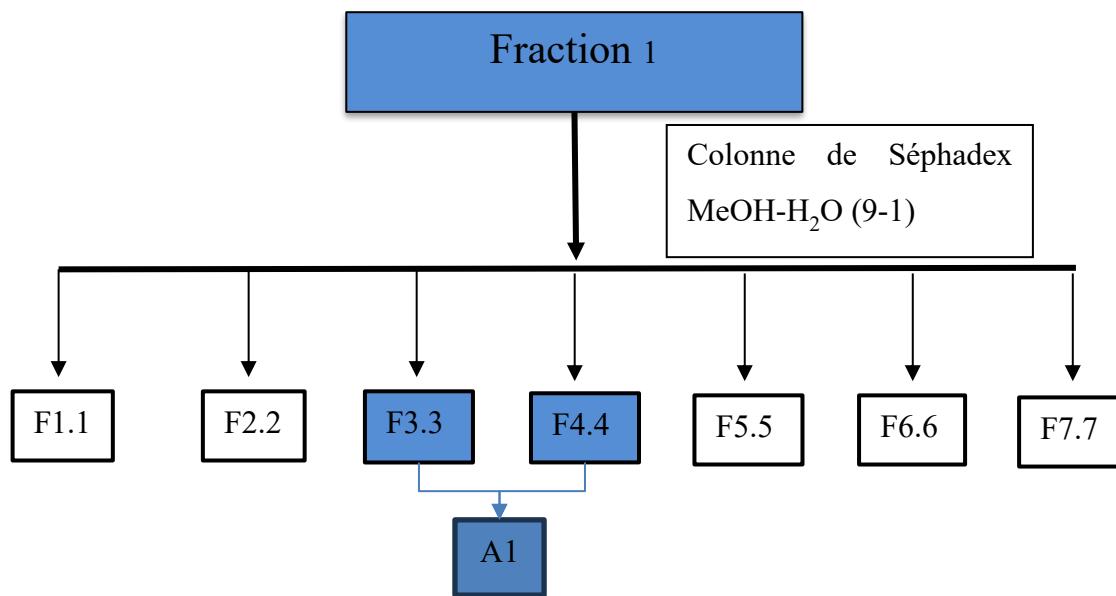


**Figure 35 :** Schéma de fractionnement de l'extrait n-BuOH

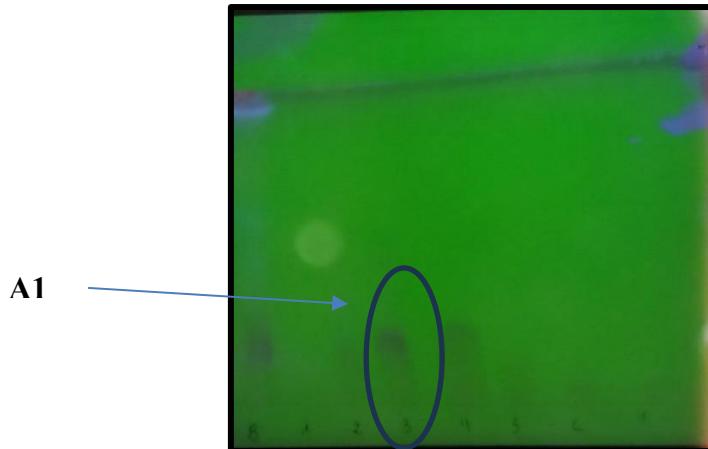


**Figure 36:** une CCM de l'extrait n-BuOH

La fraction F1 a été purifiée par une colonne de Sephadex, en utilisant le MeOH/H<sub>2</sub>O (9-1) comme solvant, pour donner le composé A1.



**Figure 37:** Schéma de séparation de la fraction F1



**Figure 38:** Les sept fractions obtenues par la chromatographie sur colonne de gel de Séphadexe.

#### 4. Analyse qualitative (screening phytochimique) :

L'analyse qualitative des extraits constitue une étape essentielle pour identifier la présence des principaux groupes de composés bioactifs responsables des propriétés pharmacologiques. Cette

phase de criblage (screening) permet de détecter la présence de métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les coumarines et les terpènoïdes.

### **4.1 Détection des alcaloïdes**

Les extraits ont été dissous séparément dans de l'acide chlorhydrique dilué, puis filtrés. Les filtrats ainsi obtenus ont été traités avec le réactif de Wagner, préparé en dissolvant 1,27 g d'iode et 2 g d'iodure de potassium dans 100 mL d'eau distillée. L'apparition d'un précipité brun ou brun rougeâtre indique la présence d'alcaloïdes (**Hussen et al., 2023**)

### **4.2 Détection de polyphénols**

On dissout 0,05 g de l'extrait dans un petit volume de solvant (généralement de l'eau ou de l'éthanol). On ajoute quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 5 % (m/v). L'apparition d'une couleur bleu-noir, bleue, verte, violette ou rouge indique la présence de composés phénoliques dans l'extrait (**Hussen et al., 2023**).

### **4.3 Détection des tanins**

Les trois extraits ont été mélangé à 2 ml d'une solution à 2% de  $\text{FeCl}_3$ . Une coloration bleu-vert ou bleu-noir a indiqué la présence de polyphénols et de tanins (**Shrestha et al, 2015**).

### **4.4 Détection des flavonoïdes**

Les extraits ont été mélangés avec quelques fragments de ruban de magnésium et du HCl concentré a été ajouté goutte à goutte. Une couleur rose ou rouge magenta est apparue après quelques minutes, ce qui indiquait la présence de flavonoïdes (**Shrestha et al ,2015**).

### **4.5 Détection des coumarines**

Un ml de chaque extrait a mélangé à quelques gouttes de NaOH et 1 mL d'alcool a été ajouté. Une formation de couleur jaune indique la présence de coumarines (**Senthilmurugan, et al 2013**).

### **4.6 Détection de terpènes**

A un millilitre de chaque extrait a été ajoutés à deux millilitres de chloroforme et traités avec de l'acide sulfurique concentré. Une couleur jaune à rouge brique indique la présence de terpènes (**Mascahenas et al, 2017**).

### 4.7 Détection des saponines

Un échantillon de 0.05 g d'extrait a été diluée dans 20mL d'eau distillée, puis vigoureusement agité dans un tube pendant 15 minutes. La formation d'une couche de mousse d'environ 1 cm d'épaisseur indique la présence de saponines (**Hussen et al., 2023**).

### 4.8 Détection des quinones

Une petite quantité d'extrait a été traitée avec de l'HCL concentrée et observée pour la formation de précipité jaune (ou coloration) (**Sushama, 2017**).

## 5. Analyse quantitative :

L'analyse quantitative des métabolites secondaires représente une étape cruciale dans l'évaluation du potentiel pharmacologique des extraits végétaux. Contrairement au criblage phytochimique qualitatif, qui se limite à détecter la présence ou l'absence de certaines classes de composés, le dosage quantitatif permet de déterminer avec précision la teneur en substances bioactives, fournissant ainsi des données essentielles pour la corrélation entre composition chimique et activité biologique.

### 5.1 Teneur en polyphénols totaux (TPC)

#### 5.1.1 Principe

La teneur en composés phénoliques des trois extraits a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon (**Li et al., 2007**) cette méthode colorimétrique utilise le réactif de Folin-Ciocalteu de couleur jaune qui est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ).

Son principe est basé sur la réduction en milieux alcalin de la mixture phosphotungstique phosphomolybdique de réactif de Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Georgé et al., 2005**)

#### 5.1.2 Mode opératoire :

Un volume de 300  $\mu$ L de chaque extrait, dissous dans le méthanol, a été ajouté à 1500  $\mu$ L de réactif de Folin-Ciocalteu préalablement dilué au 1/10. Après homogénéisation, les mélanges ont été incubés pendant 4 minutes à température ambiante. Ensuite, 1200  $\mu$ L d'une solution de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 7,5 % ont été ajoutés. Le mélange final a été agité, puis incubé dans l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante (**Boulacel et al., 2019**).

L'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage ( $Y = aX + b$ ), établie à l'aide de l'acide gallique comme. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).

### 5.2 Dosage des flavonoïdes (TFC)

#### 5.2.1 Principe

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée selon la méthode décrite par **Djeridane et al, (2006)**. Cette méthode repose sur la formation de complexes flavonoïdes-chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), mesurables par spectrophotométrie. La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Lagnika, 2005**). Les complexes formés sont de couleur jaune avec une absorption maximale dans le domaine visible à 430 nm.

#### 5.2.2 Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée selon la méthode décrite par **Ayad et al, (2018)**. Un volume de 1 mL de chaque extrait (préparé à 1 mg/mL dans le méthanol) a été mélangé avec 1 mL d'une solution de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) à 2 % dans le méthanol. Le mélange a été agité, puis incubé à température ambiante pendant 10 minutes à l'obscurité. L'absorbance a ensuite été mesurée à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait mg (EQ/g)

## 6. Evaluation des activités biologiques

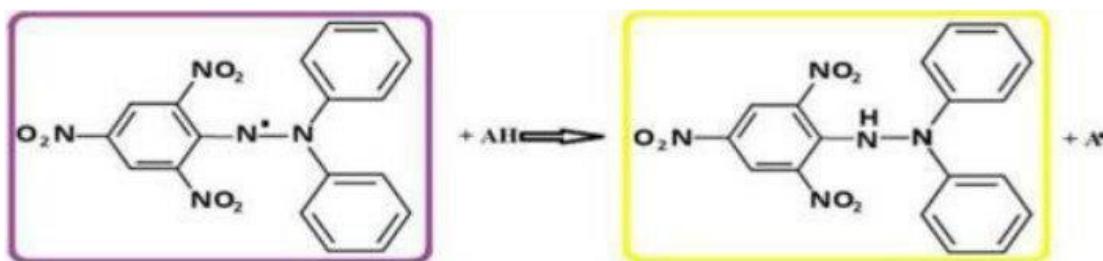
### 6.1 L'activité antioxydante

#### 6.1.1 Test de Piégeage du radical libre 2,2- diphenyle-1-picrylhydrazyl (DPPH)

##### 6.1.1.1 Principe

Le test est basé sur la mesure de la capacité de piégeage des antioxydants. L'électron impair de l'atome d'azote dans le DPPH est réduit en recevant un atome d'hydrogène des antioxydants pour former l'hydrazine correspondante (**Kedare et Singh, 2011**).

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical stable se présentant sous forme de poudre noire, soluble dans l'éthanol ou le méthanol. Ce composé possède un électron non apparié localisé sur un atome d'azote, dont la délocalisation est responsable de la coloration violette intense caractéristique du réactif. En présence d'un antioxydant, le radical DPPH capte un atome d'hydrogène, entraînant ainsi sa réduction et une décoloration progressive de la solution. Cette diminution d'absorbance est mesurée par spectrophotométrie, généralement à une longueur d'onde comprise entre 515 et 518 nm (**El Babili et al., 2020**).



**Figure 39 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• (entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)) (Molyneux, 2004)**

#### 6.1.1.2 Mode opératoire

L'évaluation de l'effet scavenger des extraits vis-à-vis au radical DPPH a été évaluée selon le protocole décrit par (**Lefahal et al., 2022**). Pratiquement, 400 µl de chaque extrait à une concentration (1mg/ mL dans le MeOH) sont mélangées avec 1600 µl d'une solution méthanolique de DPPH (0.004%). L'absorbance est lue à 517nm après une période d'incubation de 30 minutes à l'abri de la lumière et à une température ambiante. L'effet de piégeage du radical DPPH est exprimé en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/ g)

### 6.1.2 Méthode de la capacité antioxydante totale (TAC) par le test phosphomolybdène

#### 6.1.2.1 Principe :

La détermination de la Capacité antioxydante totale TAC des différents extraits est estimée par la méthode de **Prieto et al., (1999)**. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> à molybdène Mo (V) MoO<sup>2+</sup> en présence d'un antioxydant pour former un complexe vert de phosphate/Mo(V) à pH acide (**MarkowiczBastos et al, 2007**). Le test phosphomolybdène a été utilisé à l'origine pour quantifier la vitamine E dans les graines, mais compte tenu de sa simplicité et de sa sensibilité, son application a été étendue aux extraits de plante

### 6.1.2.2 Mode opératoire

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits a été déterminée selon la méthode de phosphomolybdène décrite par (**Cherfia et al., 2020**). Un volume de 300µl de chaque extrait (1mg/ mL dans le MeOH) est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mm de phosphate de sodium et 4 mm de molybdate d'ammonium). Les tubes contenant le mélange réactionnel sont incubés à 95C° pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695nm. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/ g)

### 6.1.3 Activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>- phénanthroline

#### 6.1.3.1 Principe

La méthode à la phénanthroline est basée sur le transfert des électrons par la réduction d'ion Fe<sup>3+</sup> en ion Fe<sup>2+</sup>par un antioxydant. Il se forme le Fe<sup>2+</sup> qui réagit avec l'ortho - phénanthroline qui agit comme un ligand pour former un complexe rouge-orange (1,10-phénanthroline-Fe<sup>2+</sup>Tris) (**Yefrida et al, 2018**)

#### 6.1.3.2 Mode opératoire

L'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>-phenanthroline a été réalisée selon la méthode décrite par **Yefrida et al, 2018** avec de quelques modifications. Un volume de 0,6 mL de chaque extrait (1mg/ mL dans le MeOH) a été ajouté à un volume de 1 mL de FeCl<sub>3</sub> (0.2%) et 0,5 mL phénanthroline (0.5%), ensuite le volume est complété à 10 mL par le méthanol. Le mélange a été agité vigoureusement et incubé pendant 20 min à température ambiante. L'absorbance a été déterminée à 510 nm. L'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>-phenanthroline est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/ g).

## 7. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait végétal

Nous avons testé l'activité antibactérienne des extraits : Dichlorométhane et acétate d'éthyle vis-à-vis de six souches de références (Gram+ et Gram-) :

Escherichia coli (ATCC 25922),

Staphylococcus aureus (ATCC 25923)

Serratia marcescens (ATCC® 14756™)

Klebsiella pneumoniae (ATCC® 33495™)

## Chapitre 4 : Materials et méthodes

Enterococcus faecium (ATCC 19434)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

Le choix des souches bactériennes était dû à leur importance clinique et pharmacologique.

Ces souches appartiennent au laboratoire d'hygiène de wilaya de Constantine

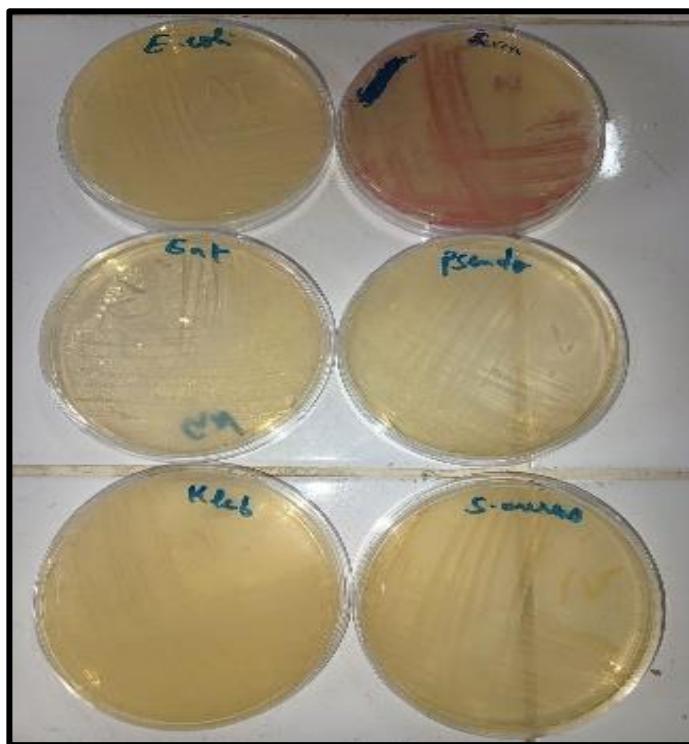


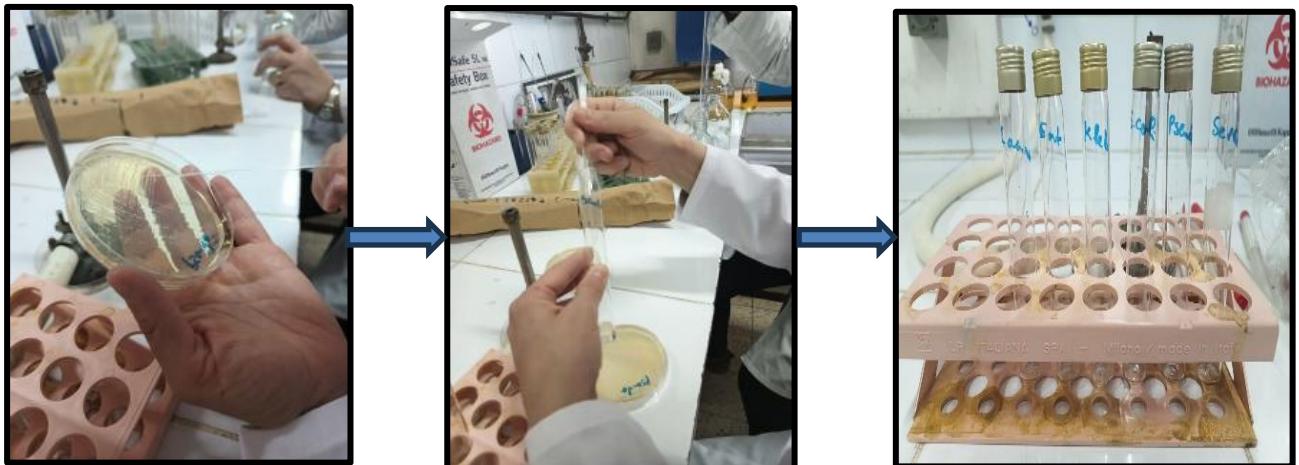
Figure 40: les souches bactériennes de référence utilisées

### 7.1 Milieux de culture

Les tests antibactériens ont été réalisés sur le milieu Mueller Hinton gélose. Ce milieu gélosé est régénéré au bain à 100°C et maintenu en surfusion. Ensuite il est reparti dans des boites de pétri stérile convenablement marqué et laisser refroidir à température ambiante.

### 7.2 Préparation des suspensions bactériennes (l'inoculum)

Des colonies bien isolées issues des cultures pures ont été repiquées dans du bouillon Mueller-Hinton (BMH), puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Cette étape a permis d'obtenir des suspensions de cultures jeunes pour chaque souche, destinées à servir d'inoculum, tout en assurant le maintien et la croissance optimale des bactéries.



**Figure 41: Préparation des suspensions bactériennes**

### 7.3 Ensemencement des souches conservées

Dans des conditions stériles, l'ensemencement a été effectué à partir de la souche conservée, sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose Mueller-Hinton (MH), à l'aide d'un écouvillon stérile. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures.



**Figure 42: Ensemencement des souches conservées**

### 7.4 Préparation des différentes concentrations des extraits AcOEt et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Les deux extraits ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Ainsi, 100 mg de l'extrait au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et 50 mg de l'extrait à l'acétate d'éthyle AcOEt, issus des parties aériennes, ont été solubilisés séparément dans 1 mL de DMSO. Ce dernier a été utilisé comme témoin négatif dans les tests biologiques.

### 7.5 Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne des extraits

L'évaluation de l'effet antibactérien de différents extraits comprend deux méthodes différentes :

- ◆ **Méthode de diffusion sur gélose avec trous**
- ◆ **La méthode de macrodilution** afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) (Billerbeck et al. 2002).

#### 7.5.1 Méthode de diffusion sur gélose avec trous

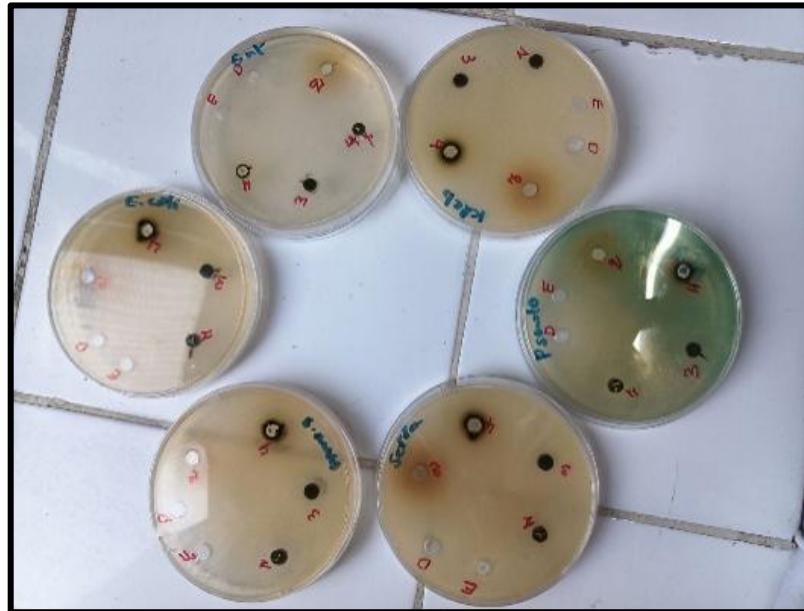
Dans cette méthode bien établie, les boîtes de Pétri contenant la gélose sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon stérile avec un inoculum standardisé du micro-organisme testé. Après l'inoculation, des trous de 6 mm de diamètre sont creusés dans la gélose solidifiée à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Une solution de l'extrait dans le DMSO, est ensuite déposée dans chaque trou. Avant l'incubation à 37 °C, les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes afin de permettre la diffusion des substances bioactives (Magaldi et al., 2004 ; Valgas et al., 2007).

#### Lecture des résultats

La lecture des résultats a été effectuée après 24 heures d'incubation. L'activité antibactérienne a été évaluée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne autour des trous. La mesure, exprimée en millimètres, a ensuite été interprétée selon l'échelle de concordance proposée par Ponce et al. (2003), permettant de classer la sensibilité des souches comme suit :

- Souche résistante : D < 8 mm
- Souche sensible : 9 mm ≤ D ≤ 14 mm
- Souche très sensible : 15 mm ≤ D ≤ 19 mm
- Souche extrêmement sensible : D > 20 mm

Toute extension de la zone d'inhibition autour des puits, même de petit diamètre, a été considérée comme un résultat positif. Il convient de noter que trois répétitions ont été effectuées et que les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en millimètres.



**Figure 43: Méthode de diffusion sur gélose avec trous (puits)**

### 7.5.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'un antibiotique et/ou d'un principe actif nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme.

Pour déterminer la CMI, une série de sept tubes à essai numérotés de C1 à C7 a été préparée. Dans le premier tube (C1), 1 mL de bouillon Müller-Hinton (BMH) a été ajouté, suivi de 1 mL d'un extrait préparé à une concentration de 100 mg/mL. Une série de dilutions successives au demi a ensuite été réalisée afin d'obtenir une gamme de concentrations décroissantes (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64).

Dans le dernier tube (C7), servant de témoin de croissance, 1 mL d'eau distillée stérile a été ajouté à la place de l'extrait. Les six premiers tubes (C1 à C6) sont désignés comme « tubes expérimentaux », tandis que le dernier (C7) est appelé « tube témoin de croissance » (TC).

Ensuite, 10 µL d'une suspension bactérienne ont été ajoutés dans chaque tube.

De plus, pour les échantillons témoins, trois tubes à essai différents ont été autoclavés et nommés M (milieu), M+I (milieu + inoculum) et M+AC (milieu + composé antibactérien).

## Chapitre 4 : Materials et méthodes

Pour le contrôle négatif, 1 mL de milieu NB stérile et 10 µL d'inoculum dilué de  $1,5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> de suspension bactérienne ont été ajoutés dans un tube à essai témoin (M+I) pour observer la croissance des bactéries en présence de milieu. De même, pour le contrôle positif, 1 mL de composé antibactérien dilué et un milieu NB stérile ont été ajoutés dans un tube à essai (M+AC) pour vérifier la transparence de la solution. En outre, 1 mL de milieu NB stérile a été versé dans le tube à essai témoin à blanc (M) pour vérifier la stérilité du milieu et de l'équipement. Après un mélange homogène, les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 24 heures.



Figure 44: la préparation des concentrations décroissantes des extraits testés

---

Références bibliographiques :

- Ayad, R., Cakmak, Y. S., Ozusaglam, M. A., Medjroubi, K., & Akkal, S. (2018). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of aerial parts of Algerian *Jurinea humilis* DC (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(12), 2903.
- Billerbeck, G. (2002). Les contaminations biologiques des biens culturels : Essai d'utilisation d'huile essentielle en traitement de l'aire. *Elsevier*, 357–365.
- Boulacel, I., Harkati, B., Ayad, R., Demirtas, I., Laouer, H., & Akkal, S. (2019). Phytochemical studies, antibacterial and antioxidant activities of aerial parts of *Ferula lutea* (Poir.). *Scientifica Naturalis*, 6(1), 17–25.
- Cherfia, R., Zaiter, A., Akkal, S., Chaimbault, P., Abdelwahab, A. B., Kirsch, G., & Kacem Chaouche, N. (2020). New approach in the characterization of bioactive compounds isolated from *Calycotome spinosa* (L.) Link leaves by the use of negative electrospray ionization LITMS, LC-ESI-MS/MS, as well as NMR analysis. *Bioorganic Chemistry*, 96, 103535.
- De Billerbeck, V. G., Roques, C., Vanière, P., & Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes (Lyon)*, 10(3), 248–251.
- Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660.
- El Bibili, F., Nicole, L.-M., Caroline, V., Romain, L., & Arthur, H. (2020). ICH validation of DPPH assay method: Some interesting medicinal drugs. *Volume 6, Issue 2*.
- Essawi, T., & Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3), 343–349.
- Farooq, S., et al. (2022). Preliminary phytochemical analysis: In-vitro comparative evaluation of anti-arthritis and anti-inflammatory potential of some traditionally used medicinal plants. *Dose-Response*, 20(1), 15593258211069720.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370–1373.

---

Guignard, J. L. (1998). *Abrégé de botanique* (11ème éd.). Masson.

Hussen, E. M., & Endalew, S. A. (2023). In vitro antioxidant and free-radical scavenging activities of polar leaf extracts of *Vernonia amygdalina*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23, 146.

Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.

Lefahal, M., Makhloifi, E., Ayad, R., Boussetla, A., Elhattab, M., Keskin, M., & Akkal, S. (2022). Highlighting the cosmeceutical potential of the edible *Bunium alpinum* Waldst & Kit (Apiaceae) growing in Algeria : In vitro antioxidant and photoprotective effects. *Gazi University Journal of Science*.

Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, 771–776.

Lagnika, L. (2005). Étude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises [Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur Strasbourg / Université d'Abomey-Calavi].

Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung De Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8, 39–45.

Markowicz Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A. C. H. F., Cunha, I. B. S., Carvalho, P. O., & Eberlin, M. N. (2007). Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from *Yerba Maté* (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Molecules*, 12, 423–432.

Mascahenas, M. E., Mandrekar, C. R., Marathe, P. B., & Moraes, L. J. (2017). Phytochemical screening of selected species from *Convolvulaceae*. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(6), 94–97.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.

- 
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337–341.
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of oils on the native microflora of organic swiss chard. *Food Science and Technology (Elsevier)*, 36, 679–685.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2003). *Microbiologie. De Boeck Supérieur*.
- Qiu, Z., & Li, C. J. (2020). Transformations of less-activated phenols and phenol derivatives via C–O cleavage. *Chemical Reviews*, 120(18), 10454–10515.
- Senthilmurugan, G., Vasanthe, B., & Suresh, K. (2013). Screening and antibacterial activity analysis of some important medicinal plants. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 2(2), 146–152.
- Shrestha, P., Adhikari, S., Lamichhane, B., & Shrestha, B. G. (2015). Phytochemical screening of the medicinal plants of Nepal. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)*, 1(6), 11–17.
- Singh, S. K., Madhu, V., Amit, R., & Rajesh, K. S. (2016). Antibacterial activity and preliminary phytochemical screening of endophytic fungal extract of *Rauvolfia serpentina*. *The Open Conference Proceedings Journal*, 7, 104–113.
- Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1011–1022.
- Sushama Raj, R. V. (2017). Preliminary phytochemical screening of *Lantana camara* L., a major invasive species of Kerala, using different solvents. *Annals of Plant Sciences*.
- Valgas, C., De Souza, S. M., Smania, E. F. A., & Smania, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369–380.
- Yefrida, Suyani, H., Alif, A., Efdi, M., & Hermansyah, A. (2018). Modification of phenanthroline method to determine antioxidant content in tropical fruits methanolic extract. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 22(4), 28–35.

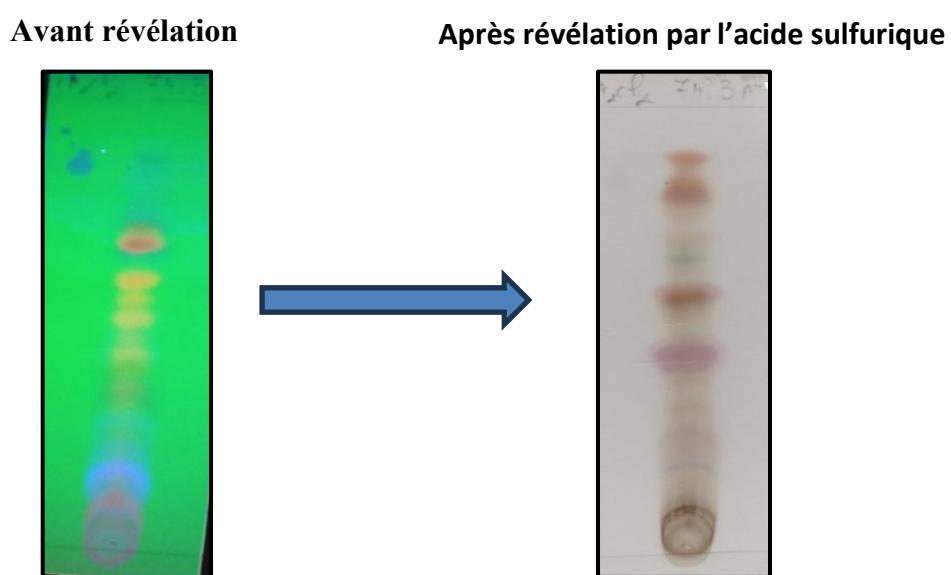
---

*Chapitre 5 : Résultats et  
discussions*

### 1. Étude phytochimique de genre étudié

#### 1.1 Résultats des CCM de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Afin de déterminer la composition de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, une chromatographie sur couche mince de gel de silice sur feuille d'aluminium a été réalisée, en utilisant le système d'élution (Hexane-AcOEt) avec les proportions 7-3. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 nm) puis révélées avec l'acide sulfurique et chauffées à 100°C. La figure suivante (figure 44) montre les résultats de cette analyse chromatographique.



**Figure 45: Plaque CCM de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sur de gel de silice dans le système Hexane – AcOEt (7-3)**

Le profil chimique de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se caractérise par l'apparition de taches violettes après révélation, indiquant la présence probable de terpènes.

#### 1.2 Détermination du composé A1

Le produit A1 est soluble dans le méthanol (MeOH) et présente une fluorescence noire sous lumière UV à 365 nm. Par ailleurs, la bande I observée à 323 nm dans le spectre UV-visible enregistré dans le MeOH suggère la présence d'un flavonoïde. Toutefois, la présence d'une bande II à 217 nm, plutôt que dans la plage habituelle des flavonoïdes (environ 250–280 nm),

## Chapitre 5 : Résultats et discussion

indique que le composé n'est probablement pas pur et pourrait contenir des impuretés absorbant à basse longueur d'onde.

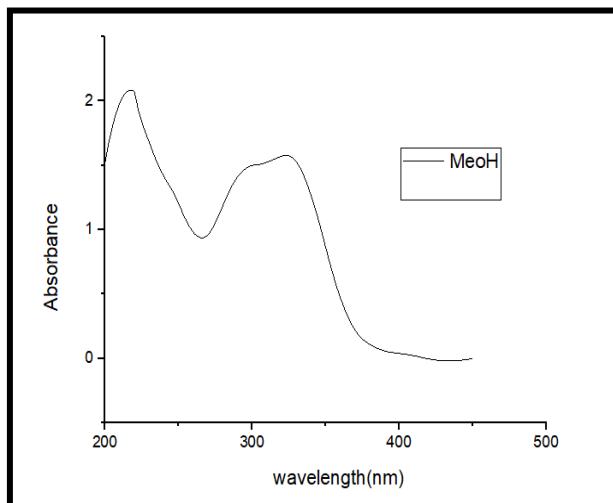


Figure 46: spectre UV-visible du composé A1

### 1.3 Screening phytochimique

Les résultats de la mise en évidence de certaines classes de métabolites secondaires présentes dans les trois extraits des parties aériennes de la plante étudiée sont présentés dans le (Tableau 7)

Tableau 7: Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires des parties aériennes d'*Asperula*

Test	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	n-BuOH
Alcaloïdes	+	+	+
Phénols	-	+	+
Tannins	-	+	+
Flavonoïdes	-	+	+
Coumarines	-	+	+
Terpènes	+	+	-
Saponines	-	-	+
Quinones	-	-	+

## Chapitre 5 : Résultats et discussion

+ : Présent, - : Absent

Les résultats du criblage phytochimique effectué dans le cadre de cette étude révèlent que l'extrait n-BuOH est particulièrement riche en plusieurs classes de métabolites secondaires, à l'exception notable des terpènes, qui sont absents. L'extrait AcOEt présente également une diversité de composés, notamment des alcaloïdes, des composés phénoliques, des tanins, des flavonoïdes, des coumarines et des terpènes, bien que sa richesse globale soit inférieure à celle de l'extrait n-BuOH. En revanche, l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ne révèle que la présence des terpènes et des alcaloïdes.

Ces observations sont en concordance avec les résultats de l'étude phytochimique menée sur les extraits méthanolique et aqueux d'*Asperula hirsuta*, qui ont mis en évidence la présence de divers métabolites secondaires, notamment les tanins, les flavonoïdes, les polyphénols, les terpènes, les saponines et les quinones (Kouachi M, 2021)

### 1.4 Teneur en polyphénols totaux TPC :

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. En effet, les résultats sont exprimés en µg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide gallique (Figure 46).

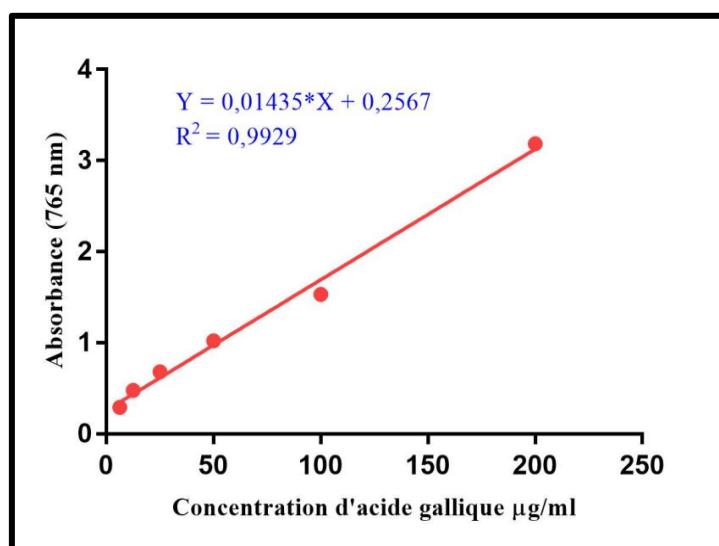


Figure 47: Courbe d'étalonnage d'acide gallique

L'analyse des résultats met en évidence une teneur élevée en composés phénoliques dans l'extrait n-BuOH, atteignant  $138,35 \pm 0,21$  µg EAG/mg d'extrait, tandis que l'extrait AcOEt se distingue par une teneur beaucoup plus faible, estimée à  $24,53 \pm 0,24$  µg EAG/mg d'extrait.

## Chapitre 5 : Résultats et discussion

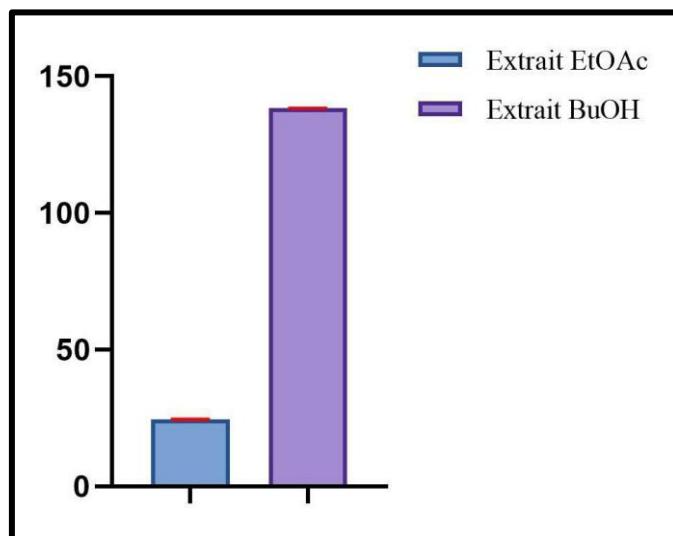


Figure 48: Résultats de teneur en polyphénols totaux (TPC) de genre étudié

### 1.5 Teneur en flavonoïdes totaux TFC

La teneur en flavonoïdes totaux (TFC) a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage de la quercétine (Figure 48), et les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g EQ}/\text{mg}$  d'extrait.

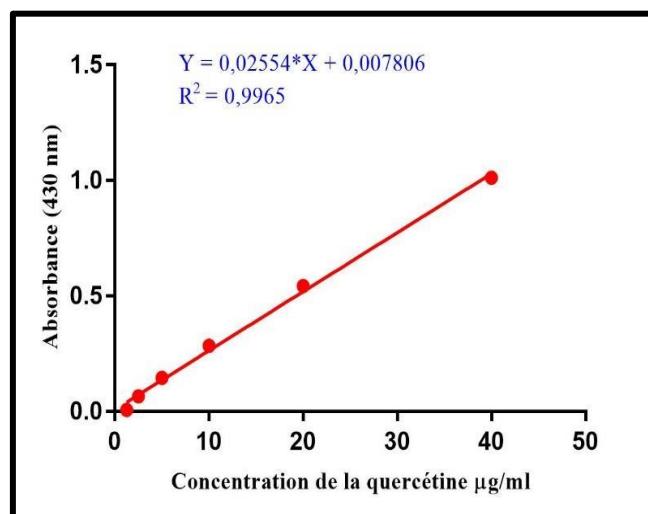


Figure 49: Courbe d'étalonnage de quercétine

L'analyse des résultats présentés dans le (Tableau 08) révèle clairement que l'extrait AcOEt affiche une teneur relativement faible en flavonoïdes, avec une valeur de  $20.61 \pm 0.59 \mu\text{g EQ}/\text{mg}$  d'extrait, en comparaison avec l'extrait n-BuOH qui enregistre une teneur nettement plus élevée, atteignant  $61.65 \pm 1.88 \mu\text{g EQ}/\text{mg}$ . Cette différence traduit une meilleure capacité du butanol à extraire les flavonoïdes notamment ceux de nature plus hydrophile.

## Chapitre 5 : Résultats et discussion

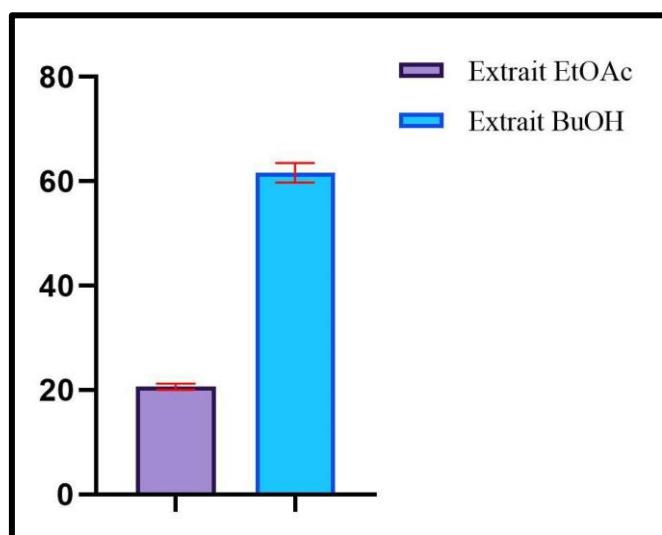
En comparaison avec les résultats rapportés pour *Asperula hirsuta*, nos extraits présentent des différences notables. Selon l'étude de Mouissat et al. (2022), l'extrait méthanolique de *A. hirsuta* contient  $144.68 \pm 10.87 \mu\text{g EAG/mg}$  de polyphénols et  $32,78 \pm 2,06 \mu\text{g EQ/mg}$  de flavonoïdes, tandis que l'extrait aqueux présente des teneurs inférieures, soit  $109,36 \pm 19,41 \mu\text{g EAG/mg}$  en polyphénols et  $14.77 \pm 1.23 \mu\text{g EQ/mg}$  en flavonoïdes.

La teneur en polyphénols de notre extrait n-BuOH ( $138.35 \pm 0.21 \mu\text{g EAG/mg}$ ) se rapproche de celle observée pour l'extrait méthanolique de *A. hirsuta*, tandis que sa teneur en flavonoïdes ( $61.65 \pm 1.88 \mu\text{g EQ/mg}$ ) est nettement plus élevée que celle des deux extraits (méthanolique et aqueux) de *A. hirsuta*.

Ces écarts peuvent s'expliquer d'une part par la différence de polarité des solvants utilisés, influençant l'extraction des composés, et d'autre part par la diversité structurale de chaque espèce au sein du genre *Asperula*, soulignant ainsi la variabilité phytoconstituante interspécifique.

**Tableau 8 : Résultats de Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux de genre étudiée**

Ext	TPC ( $\mu\text{g EAG /mg}$ )	TFC ( $\mu\text{g EQ /mg}$ )
Ext AcOEt	$24.53 \pm 0.24$	$20.61 \pm 0.59$
Ext n-BuOH	$138.35 \pm 0.21$	$61.65 \pm 1.88$



**Figure 50: Résultats de teneur en flavonoïdes totaux (TFC) de genre étudié**

### 2. Activités biologiques

L'activité biologique des extraits des parties aériennes de la plante étudiées a été réalisé par l'évaluation *in vitro* des activités antioxydantes, antibactériennes.

Ces tests ont été réalisés systématiquement au moins 3 fois pour chaque échantillon.

#### 2.1. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

L'activité antioxydante des deux extraits (n-BuOH et AcOEt), obtenus à partir des parties aériennes de la plante étudiée, a été évaluée à l'aide de trois méthodes complémentaires : le test au radical DPPH, la méthode de la capacité antioxydante totale (TAC), ainsi que le test à la phénanthroline.

##### 2.1.1 Test de piégeage du radical 2-diphényl-picrylhydrazyl (DPPH) :

Le pouvoir antiradicalaire des extraits a été évalué à l'aide du test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydazole (DPPH). Dans ce test, l'acide ascorbique (vitamine C) a été utilisé comme standard, et sa courbe d'étalonnage est présentée dans la (Figure 50).

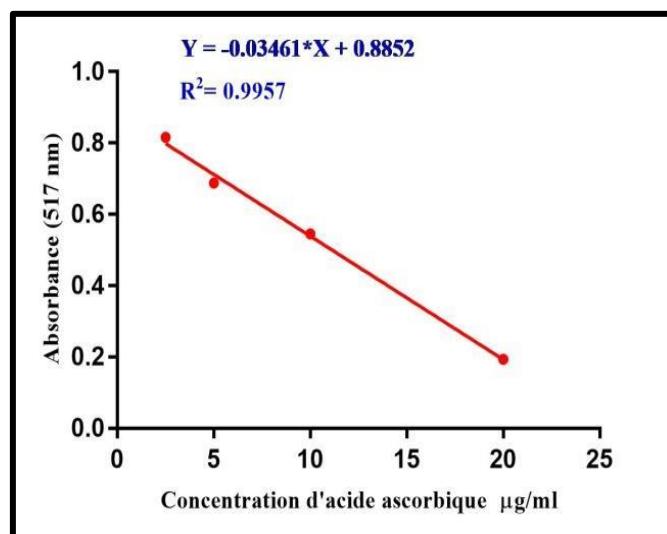


Figure 51: Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique (test DPPH)

D'après les résultats obtenus (Tableau 09), l'extrait n-BuOH présente une activité antiradicalaire élevée, atteignant  $22.07 \pm 0.07$  ( $\mu\text{g EAA/mg}$ ) d'extrait, suivie de l'extrait AcOEt avec  $19.68 \pm 0.15$   $\mu\text{g EAA/mg}$ . Ces deux extraits surpassent nettement l'activité enregistrée pour le BHT (butylhydroxytoluène), utilisée comme antioxydant standard, dont la valeur est de  $17.15 \pm 1.01$   $\mu\text{g EAA/mg}$ .

## Chapitre 5 : Résultats et discussion

### 2.1.2 Capacité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante des extraits étudiés a été évaluée par la méthode de Phosphomolybdène. Dans ce test l'acide ascorbique est pris comme standard dont la courbe d'étalonnage est sous représentée (Figure 51), et les résultats sont exprimés en µg EAA /mg.

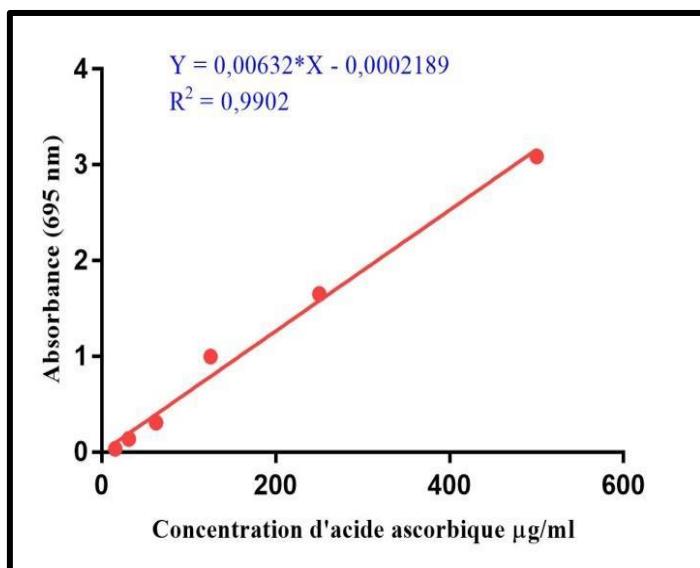


Figure 52: Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique

Les résultats du test du pouvoir réducteur (Tableau 09) révèlent que l'extrait à l'acétate d'éthyle (AcOEt) présente une activité antioxydante élevée, avec une valeur de  $300.14 \pm 2.45$  µg EAA/mg, surpassant nettement celle de l'extrait au n-butanol (n-BuOH), qui affiche néanmoins une activité notable de  $220.13 \pm 3.48$  µg EAA/mg. Ces deux extraits se distinguent ainsi par un pouvoir réducteur significatif, l'AcOEt étant le plus performant dans ce test. Il est également intéressant de souligner que l'extrait n-BuOH dépasse l'antioxydant de référence, le BHT, dont la valeur est de  $127.04 \pm 7.34$  µg EAA/mg.

### 2.1.3 Activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>+2</sup> phénanthroline

Le pouvoir réducteur des extraits étudiés a été évalué par le test Phénanthroline. Dans ce test l'acide ascorbique est pris comme standard dont la courbe d'étalonnage est sous représentée (Figure 52), et les résultats sont exprimés en µg EAA /mg

## Chapitre 5 : Résultats et discussion

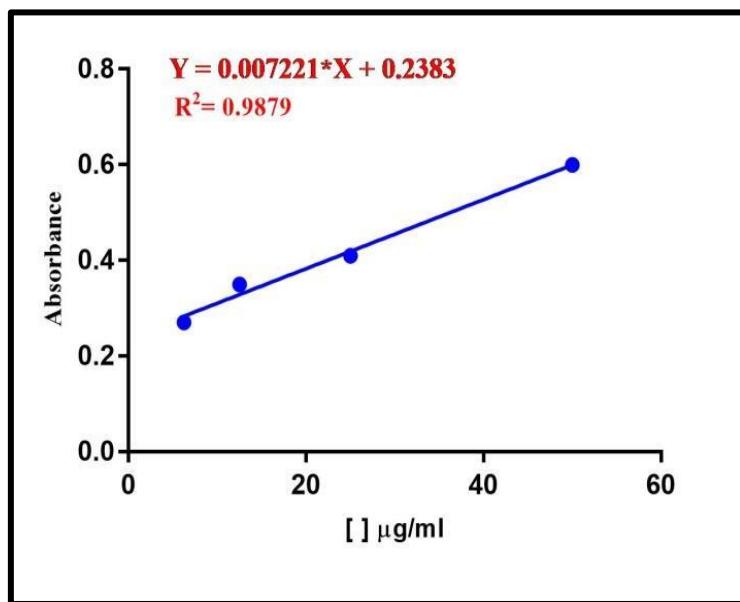


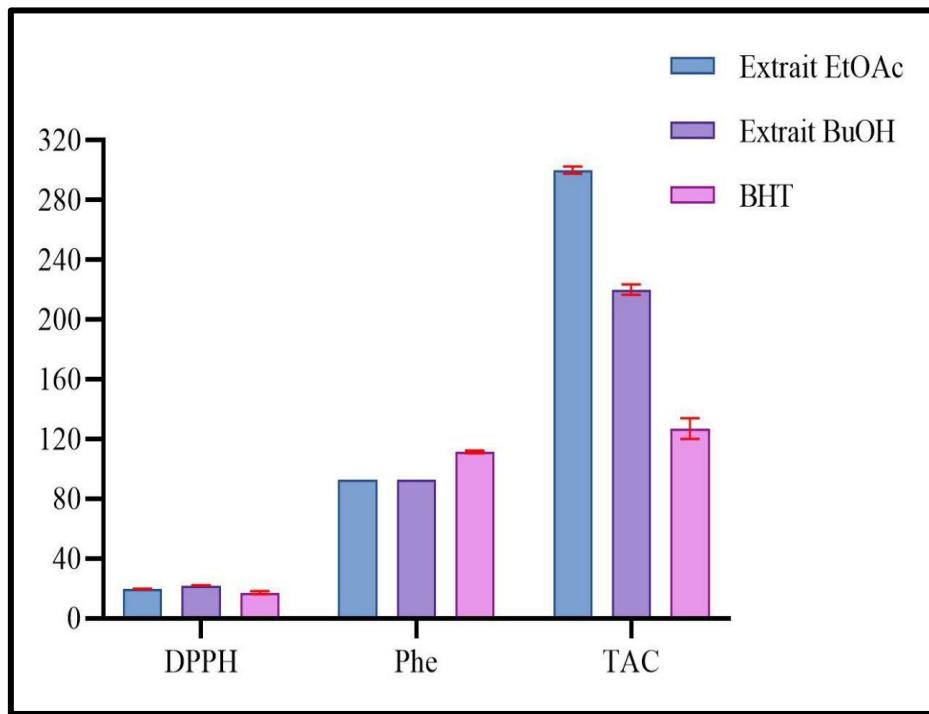
Figure 53: Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique (test Phénanthroline)

Les résultats obtenus par la méthode de réduction fondée sur la formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -phénanthroline (Tableau 09) indiquent que l'extrait AcOEt présente un pouvoir réducteur de  $92.92 \pm 0.00 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ , très proche de celui de l'extrait n-BuOH, évalué à  $92.77 \pm 0.00 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ . Ces deux extraits affichent donc une activité comparable, bien que légèrement inférieure à celle du BHT, antioxydant standard, dont la valeur est de  $111.51 \pm 0.92 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ .

Tableau 9: Résultats de l'activité antioxydante de genre étudié

Ext	DPPH ( $\mu\text{g EAA}/\text{mg}$ )	TAC ( $\mu\text{g EAA}/\text{mg}$ )	Phénanthroline ( $\mu\text{g EAA}/\text{mg}$ )
Ext AcOEt	$19.68 \pm 0.15$	$300.14 \pm 2.45$	$92.92 \pm 0.00$
Ext n-BuOH	$22.07 \pm 0.07$	$220.13 \pm 3.48$	$92.77 \pm 0.00$
BHT	$17.151 \pm 1.01$	$127.039 \pm 7.34$	$111.51 \pm 0.92$

## Chapitre 5 : Résultats et discussion



**Figure 54: Résultats de l'activité antioxydante (DPPH, TAC, Phénantroline) de l'espèce étudiée**

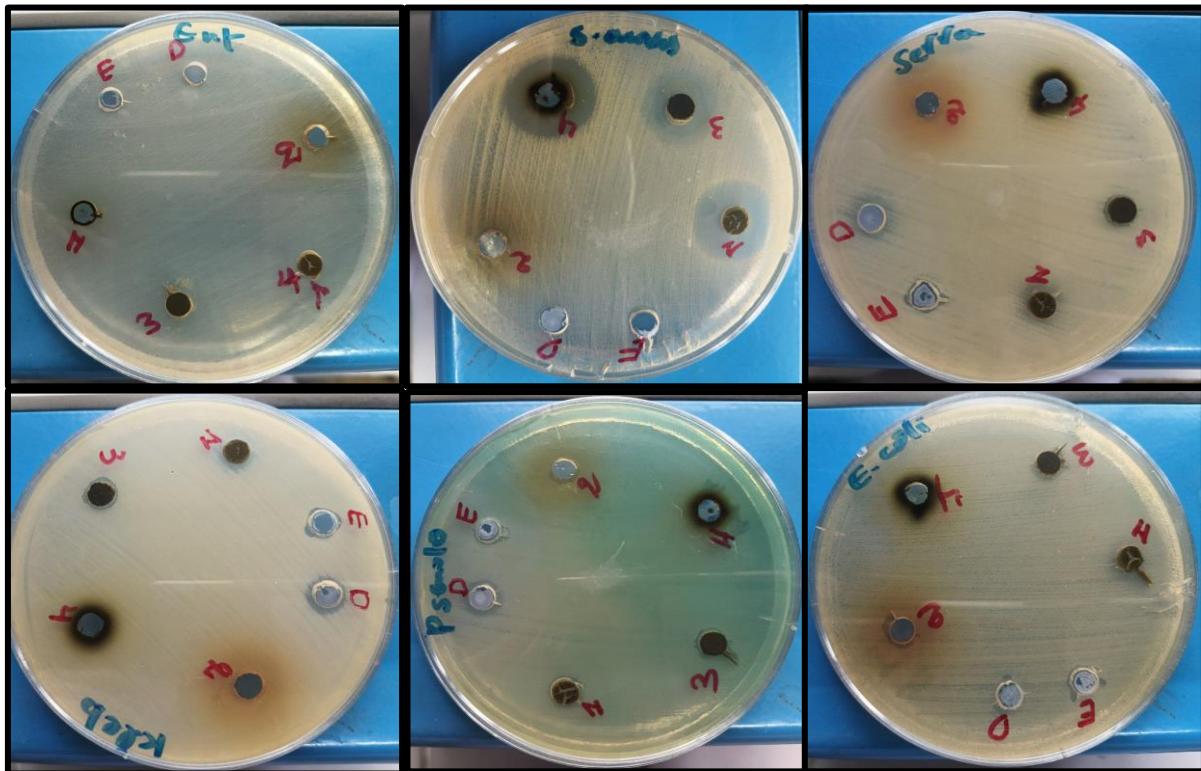
L'activité antioxydante observée pour les extraits du genre étudié est attribuable à leur richesse en composés polyphénoliques. Nos résultats concordent avec les données de la littérature, qui soulignent une corrélation positive entre la capacité antioxydante des extraits végétaux et leur teneur en composés phénoliques (**Lefahal et al., 2022, Azzouzi et al., 2024**)

### 2.2 Étude de l'activité antibactérienne :

#### 2.2.1 Méthode de diffusion sur gélose par trous :

L'effet antibactérien des extraits se traduit par une zone d'inhibition autour du trou, l'extrait est considéré comme bactériostatique selon le diamètre de la zone d'inhibition les résultats obtenus sont représentés dans la figure ci-dessus.

## Chapitre 5 : Résultats et discussion

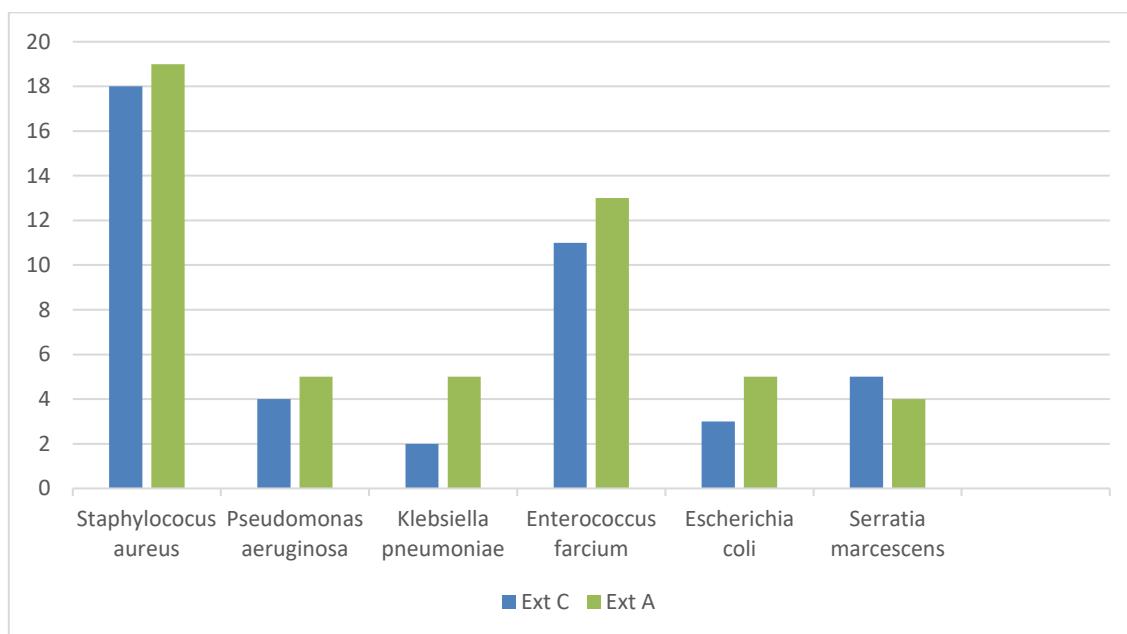


**Figure 55:** la sensibilité des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium* avec l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Ext C) et l'extrait AcOEt (Ext A)

Les résultats obtenus montrent que la meilleure activité antibactérienne a été observée contre *S. aureus*, avec des zones d'inhibition de 19 mm pour l'Ext A et de 18 mm pour l'Ext C. Une bonne activité a également été enregistrée contre *Ent. faecium*, avec des diamètres de 13 mm pour l'Ext A et de 11 mm pour l'Ext C, indiquant une sensibilité notable de ces souches (**gram positif**) aux extraits testés.

La plus faible zone d'inhibition, inférieur à 6 mm, a été observé pour *E. coli*, *Kleb. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *Ser. marcescens* (**gram négatif**) avec les deux extraits, ce qui traduit une forte résistance de ces souches aux extraits testés.

## Chapitre 5 : Résultats et discussion



**Figure 56:** les différents diamètres des zones d'inhibition des extraits  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Ext C) et AcOEt (Ext A) sur les souches antibactériennes

### 2.2.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

L'activité antibactérienne des extraits AcOEt et  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de la plante étudiée a également été évaluée par la détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) qui a été évaluée suivant la technique de macrodilution.

Selon les résultats présentés dans le (Tableau 10), l'Ext A révèle une activité antibactérienne significative vis-à-vis *S. aureus*, avec une CMI de 25 mg/mL. Une activité comparable a été observée pour l'extrait C, qui présente également une CMI identique de 25 mg/mL, suggérant une efficacité équivalente de ces deux fractions vis-à-vis de cette bactérie à Gram positif.

**Tableau 10: Concentration minimal inhibitrices des extraits d'*Asperula* pour *Staphylococcus aureus***

Dilution \ Ext	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	M	M+I	M+AC
Ext A	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
Ext C	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-

M : Milieu

- : Inhibition

M+I : Milieu + inoculum

+ : Croissance

M+AC : Milieu + composé antibactérien

## Chapitre 5 : Résultats et discussion

---

D'après le tableau 11, l'Ext A des parties aériennes d'*Asperula* présente une activité antibactérienne marquée contre *Ent. farcium* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 12.50 mg/mL. L'Ext C montre également une activité intéressante, bien que légèrement inférieure, avec une CMI de 25 mg/mL. Ces résultats suggèrent que les extraits apolaires et semi-polaires contiennent des composés capables d'inhiber efficacement la croissance de cette souche bactérienne à Gram positif.

**Tableau 11 : Concentration minimal inhibitrices des extraits d'*Asperula* vis-à-vis**

*Enterococcus farcium*

Concentration \ Ext	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	M	M+I	M+AC
Ext A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Ext C	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-

M : Milieu

- : Inhibition

M+I : Milieu + inoculum

+ : Croissance

M+AC : Milieu + composé antibactérien

Les extraits ont démontré une activité antibactérienne plus marquée à l'encontre des bactéries à Gram positif, telles que *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium*, comparativement aux bactéries à Gram négatif, notamment *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette différence d'efficacité s'explique principalement par la structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif, caractérisée par une membrane externe complexe qui agit comme une barrière limitant la pénétration des composés bioactifs.

## *Chapitre 5 : Résultats et discussion*

---

Références bibliographiques :

- Azzouzi, S., Lefahal, M., Louaar, S., Makhloufi, E. H., Medjroubi, K., & Akkal, S. (2025). *Centaurea dimorpha* Viv. (Asteraceae) growing in Algeria extracts as a promising natural cosmetic active ingredient: Broad-spectrum photoprotection and antioxidant efficacy. *Journal of Agriculture and Applied Biology*, 6(1), 1–12.
- Kherbache, A., Laouicha, S., Senator, A., & Bouriche, H. (2024). Antioxidant properties and total phenolic contents of *Asperula hirsuta* extracts. *African Journal of Biological Sciences*, 6(16), 1641–1651.
- Kouachi, M., & Mouissat, S. (2022). Screening phytochimique et évaluation des activités antioxydante et analgésique d'*Asperula hirsuta*, Mémoire de master, Université Mohamed Boudiaf - M'Sila.
- Lefahal, M., Makhloufi, E., Ayad, R., Boussetla, A., Elhattab, M., Keskin, M., & Akkal, S. (2022). Highlighting the cosmeceutical potential of the edible *Bunium alpinum* Waldst & Kit (Apiaceae) growing in Algeria : In vitro antioxidant and photoprotective effects. *Gazi University Journal of Science*.

# *Conclusion*

## **Conclusion :**

L'étude des métabolites secondaires et l'évaluation de leurs activités biologiques, tant *in vitro* qu'*in vivo*, constituent aujourd'hui un champ de recherche fondamental pour la valorisation du potentiel thérapeutique des plantes médicinales. Cette démarche permet non seulement de découvrir de nouveaux composés bioactifs, mais également d'en évaluer l'efficacité, la toxicité et les perspectives d'application dans le développement de médicaments d'origine naturelle.

Dans ce contexte, notre travail a été consacré à l'étude phytochimique et à l'évaluation des activités biologiques *in vitro* d'une espèce médicinale appartenant au genre *Asperula* (famille des Rubiacées), collectée dans la région de Batna (Nord-Est de l'Algérie).

Trois extraits, préparés à partir des parties aériennes de la plante à l'aide de solvants de polarités croissantes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt et n-BuOH), ont été soumis à des tests d'activité antibactérienne et antioxydante.

Le screening phytochimique préliminaire a révélé la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires, notamment les alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes, phénols, quinones, tanins, saponines et terpènes. L'extrait n-BuOH a ensuite été soumis à des techniques de séparation et de purification (chromatographie sur couche mince puis sur colonne), permettant l'isolement d'un flavonoïde, désigné A1.

Sur le plan biologique, les extraits à l'acétate d'éthyle (AcOEt) et dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ont révélé une activité antibactérienne marquée, en particulier contre *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium*. Par ailleurs, les extraits polaires ont présenté une activité antioxydante significative, corrélée à une teneur élevée en flavonoïdes et en polyphénols.

Ces résultats soulignent le potentiel thérapeutique prometteur de l'espèce étudiée du genre *Asperula*, et confirment son intérêt en tant que source potentielle de nouvelles molécules antibactériennes et antioxydantes d'origine naturelle.

# Résumé

**Abstrat :**

We focused on the phytochemical and biological study of a species from the genus *Asperula*, belonging to the Rubiaceae family. Following hydromethanolic maceration, concentration, and successive fractionation with dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), ethyl acetate (AcOEt), and n-butanol (n-BuOH) from 200 g of the aerial parts of the plant, three distinct extracts were obtained.

Phytochemical screening of the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt, and n-BuOH extracts revealed the presence of several classes of secondary metabolites.

The antioxidant activity of the AcOEt and n-BuOH extracts was evaluated using three complementary assays: DPPH, total antioxidant capacity (TAC), and the phenanthroline method. Both extracts exhibited particularly strong antioxidant activity in the TAC and DPPH assays, exceeding that of BHT, a reference antioxidant.

Furthermore, the AcOEt and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extracts demonstrated notable antibacterial activity against Gram-positive bacteria, particularly *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*.

**Keywords:** Rubiaceae, *Asperula*., phytochemical screening, antibacterial activity, antioxidant activity,

## التلخيص:

لقد ركّزنا في هذا العمل على الدراسة الكيميائية النباتية والبيولوجية لنوع نباتي ينتمي إلى جنس *Asperula*, من فصيلة *Rubiaceae*.

بعد إجراء عملية النقع باستخدام مزيج هيدروميثانولي، تلتها عملية التركيز ثم الفصل المتالي باستخدام كل من ثنائي كلوروميثان( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ، وأسيتات الإيثيل( $\text{AcOEt}$ ) ، و-بيوتانول( $n\text{-BuOH}$ ) على 200 غرام من الأجزاء الهوائية للنبة، تم الحصول على ثلاثة مستخلصات مختلفة.

أظهر التحليل الكيميائي النباتي الأولى (screening) لمستخلصات  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ،  $\text{AcOEt}$  و  $\text{BuOH}$  وجود عدة فئات من المركبات الثانوية.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصي  $\text{AcOEt}$  و  $\text{BuOH}$  باستخدام ثلاثة اختبارات تكميلية: اختبار DPPH ، واختبار السعة المضادة للأكسدة الكلية(TAC) ، وطريقة الفينانترولين. وقد أظهر المستخلصان نشاطاً مضاداً للأكسدة قرياً خصوصاً في اختاري TAC و DPPH ، منقوفين على BHT ، الذي استُخدم كمضاد أكسدة مرجعي.

من جهة أخرى، أظهرت مستخلصات  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $\text{AcOEt}$  و  $\text{BuOH}$  نشاطاً مضاداً للبكتيريا ملحوظاً تجاه البكتيريا موجبة الغرام، خاصة *Enterococcus faecium* و *Staphylococcus aureus*

الكلمات المفتاحية: Screening phytochimique ، *Rubiacees* ، *Asperula* ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للبكتيريا

<b>Année universitaire :</b> 2024-2025	<b>Présenté par :</b> KHELLAF Rahil BOUTAHRA Nesrine
<b>Investigation phytochimique et biologique d'une plante de la famille Rubiacées</b>	
<b>Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie</b>	
<p>Nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique d'une espèce du genre <i>Asperula</i>, appartenant à la famille des Rubiacées. Après une macération hydrométhanolique, suivie d'une concentration et de fractionnements successifs au dichlorométhane (<math>\text{CH}_2\text{Cl}_2</math>), l'acétate d'éthyle (AcOEt) et n-butanol (n-BuOH) de 200 g des parties aériennes de la plante, trois extraits distincts ont été obtenus.</p> <p>L'étude phytochimique, réalisée à l'aide d'un screening phytochimique des extraits <math>\text{CH}_2\text{Cl}_2</math>, AcOEt et n-BuOH, qui a révélé la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires. L'activité antioxydante des extraits AcOEt et n-BuOH a été évaluée à l'aide de trois tests complémentaires : DPPH, TAC (capacité antioxydante totale) et phénanthroline. Les deux extraits ont montré une activité antioxydante particulièrement marquée dans les tests TAC et DPPH, surpassant celle du BHT utilisé comme antioxydant de référence.</p> <p>Par ailleurs, les extraits AcOEt et <math>\text{CH}_2\text{Cl}_2</math> ont présenté une activité antibactérienne notable à l'encontre des bactéries à Gram positif, notamment <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Enterococcus faecium</i>.</p>	
<p><b>Mots-clés :</b> Rubiacée, <i>Asperula</i>, screening phytochimique, activité antibactérienne, activité antioxydante</p>	
<p><b>Laboratoires de recherche :</b> Laboratoire de Phytochimie et analyse physico-chimiques et biologiques du l'université Mentouri- Constantine 1</p>	
<p><b>Président du jury :</b> Dr. RAMLI Iman (MC(A) - UConstantine1 Frères Mentouri).</p>	
<p><b>Encadrant :</b> Dr. ZABAAT Nabila (MC(A) - UConstantine1 Frères Mentouri).</p>	
<p><b>Examinateur :</b> Dr. ZEHANI Lamia (MC(B) - UConstantine1 Frères Mentouri),</p>	