

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° :



DOMAINE SCIENCE DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

OPTION : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Intitulé

**Extraction, screening, dosages et activité
antibactérienne d'une espèce du genre *Linaria*
(Plantagenaceae)**

Présenté Par : Khemissa Aya

Sous la direction : Dr Thamere Cheriet

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. MERATATE Faiza

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Présidente

Dr. BENZEGGOUTA Nairouz

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Examinatrice

2021 / 2022

Dedication

Je dédie ce modeste travail

À mes Chers parents pour leurs soutiens inconditionnels, leurs encouragements et leurs sacrifices. Sans eux je n'en serais pas là, que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infallible. Je vous aime que Dieu vous garde pour moi.

À mes chères sœurs Anfel, Amani, Teqwa, Hala.

À mes chers frères Aymen, Ayham, Assil.

À toute ma famille Dieu vous garde pour moi.

À mes défunts grands parents Dilmi, Baya, Ibrahim, Erebh, et ma défunte tante Yamina, Que Dieu vous accueille dans son vaste paradis. J'aurais aimé que vous soyez là à ma remise de diplôme mais dieu a voulu autrement.

À mes très chers Rania, Cheyma, Hamida, Arwa, merci pour les beaux moments que nous avons passés ensemble.

Une dédicace spéciale pour mes chers meilleures amies depuis le lycée Hadjer, Imane, Mina, Khawla.

À tous mes amis et collègues.

À tous ceux qui m'aiment. À tous ceux que j'aime.

Remerciements

Je remercie tout d'abord Allah le tout puissant qui m'a donné la force et le courage de continuer et de finir mes études et concrétiser ce travail.

Je tenais tout d'abord à adresser toute mes reconnaissances au directeur de ce mémoire, Monsieur Thamere cheriet pour son patience, son disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion, et aussi pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans de meilleures conditions tout en me laissant une grande liberté.

J'ai eu la chance et le plaisir que Mme. Faiza Meratate et Mme. Nairouz Benzeggouta acceptent d'être des membres de jury pour ce projet.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à tous les enseignants pour m'avoir apporté toutes les connaissances et le soutien nécessaires, en particulier Mr.Bouleghlam hocine.

j'aimerais remercier ma nouvelle rencontre et pas des moindres la doctorante Zeyneb Benramdane Pour son aide et sa bienveillance.

Mes sincères remerciements au le monsieur Hichem HAZMOUNE pour leur aide et leur disponibilité. Un merci tout particulier à toute l'équipe de l'unité de recherche :

Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses

Physicochimiques et Biologiques, Faculté des Sciences Exactes, Université Frères
Mentouri Constantine 1.

Merci également aux ingénieurs du laboratoire de chimie et de biologie de l'Université de
Mohamed Boudiaf M'Sila, pour toutes les facilités et leurs services.

je voudrais remercier laborantine de l'institut de pasteur à M'sila pour les facilités qu'elle
m'a apportées.

Un remerciement spécial à celle qui est spéciale, ma tante, Pr.Debbi Latifa pour toute
son aide, son encouragement, pour tout ce qu'elle a fait pour moi.

Je tiens enfin à exprimer toute ma gratitude à ma famille dont le soutien a été essentiel
tout au long de mes études.

Table des matières

Dedication	i
Remerciments	ii
Résumé	vii
Liste des Symboles	ix
Table des figures	xii
Liste des tableaux	xiii
Introduction	1
1 Description Botaniques, Biologiques et Pharmacologiques du Genre <i>Li-</i> <i>naria</i>	5
1.1 Données Botaniques	6
1.1.1 Introduction de la Famille	6
1.1.2 Présentation du Genre	6
1.2 Propriétés Biologiques et Pharmacologiques du Genre	8
1.2.1 L'utilisation en Médecine Traditionnel	8
1.2.2 L'activité Biologique Observée du Genre	11

1.3	Les Investigations Phytochimiques du Genre <i>Linaria</i>	13
1.3.1	Généralité	13
1.3.2	Les Iridoïdes	14
1.3.3	Les Flavonoïdes	16
1.3.4	Les Terpènes	18
2	Matériels et Méthodes	21
2.1	A propos de <i>linaria gharbensis</i>	22
2.1.1	Description de la Plante <i>linaria gharbensis</i>	22
2.1.2	La Place dans la Systématique	22
2.1.3	Critères de Sélection de la Plante	23
2.1.4	La Récolte de la Plante	23
2.2	Matériels utilisés	24
2.3	L'Étude Phytochimique	26
2.3.1	Procédure d'Extraction	26
2.4	Les Techniques d'Analyses	30
2.4.1	Screening Phytochimique	30
2.4.2	Analyses par Chromatographie	31
2.4.3	Dosages Polyphénols et les Flavonoïdes	32
2.4.4	L'activité biologique	35
3	Résultats Et Discussions	37
3.1	Détermination du rendement d'extraction	38
3.2	Screening phytochimique	40
3.3	Screening CCM	40
3.4	Dosage Polyphénols et les Flavonoïdes	43
3.4.1	Les Polyphénols	43
3.4.2	Les Flavonoïdes	45
3.5	L'activité Biologique	46
3.5.1	L'activité antibactérienne	46
3.6	Comparaison entre les extraits	50

Conclusion	51
Bibliographie	52

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source riche et diversifiée de métabolites secondaires, qui ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux. Notre travail s'inscrit dans le cadre de réaliser une étude comparative entre les différentes techniques d'extraction pour déterminer la relation entre l'extraction, le rendement, la quantité des polyphénols et pour trouver les meilleures conditions pour extraire une plante du Genre *Linaria* nommée *Linaria Gharbensis* qui n'a pas été étudiée auparavant, et d'enquêter sur une éventuelle présence d'une activité antibactérienne ou non.

Les mots clés : optimisation d'extraction, ultrason, soxhlet, *Linaria*, flavone glycosylés

Abstract

Medicinal plants constitute a rich and diversified source of secondary metabolites, which have commercial application in pharmaceutical and biomedical fields.

Our work is part of a comparative study between different extraction techniques to determine the relationship between extraction, yield, quantity of polyphenols and to find the best conditions to extract a plant of the genus *Linaria* named *Linaria Gharbensis* which has not been studied before. And to investigate if it has an antibacterial activity.

Keywords: Extraction optimization, ultrasound, soxhlet, *Linaria*, glycosylated flavone.

الملخص

تشكل النباتات الطبية مصدرا غنيا ومتنوعا للمستقلبات الثانوية، والتي لها تطبيقات تجارية في المجالات الصيدلانية والطبية الحيوية.

الهدف من هذا العمل هو تطوير وتحسين شروط وظروف استخراج المركبات الفينولية باستخدام تقنيات مختلفة.

كما قمنا في هذا العمل بدراسة مقارنة بين تقنيات الاستخراج المختلفة لتحديد العلاقة بين الاستخراج، المرود، كمية البوليفينول وإيجاد أفضل الظروف لاستخراج نبات من جنس ليناريا اسمه ليناريا غاربينسيس الذي لم تتم دراسته من قبل. والتحقق من إذا كان لديه نشاط مضاد للجراثيم.

الكلمات المفتاحية: تحسين الاستخراج، الموجات فوق الصوتية، Soxhlet، ليناريا، فلافون غليكوزيلي

Liste des Symboles

Abréviations

- APG Angiosperm phylogénique groupe
- EtOH Ethanol
- MeOH Methanol
- H_2O Eau
- AcEOt Acétate d'éthyl
- HCl Acide chlorhydrique
- $AlCl_3$ Trichlorure d'aluminium
- Na_2CO_3 Carbonate de Sodium
- H_2SO_4 Acide sulfurique
- $C_2H_4O_2$ Acide Acétique
- $CHCl_3$ Chloroform
- $C_8H_8O_2$ Anisaldehyde

- CCM Chromatographie sur couche mince
- MH Milieu de Muller Hinton
- UV Ultra violet

Unités

- μl Microlitre
- μg Microgramme
- M Masse
- g gramme
- mm millimetre
- nm nanometre
- $^{\circ}\text{C}$ Température en degré celsius
- Hz Hertz
- h heure
- EAG/g Equivalent Acide gallique par un gramme
- EQ/g Equivalent Quercetine par un gramme

Table des figures

1	2
1.1	Distribution géographique du genre <i>Linaria</i>	7
1.2	Quelques formes de la plante <i>Linaria</i>	8
1.3	<i>Linaria Cymbalaria</i>	9
1.4	<i>Linaria reflexa</i> Desf	9
1.5	<i>Linaria Japonica</i>	10
1.6	<i>Linaria Buriatica</i>	10
1.7	<i>Linaria Triphylla</i>	11
1.8	Acide Oléanolique.	13
1.9	Antirrhinoside.	14
1.10	Quelques Iridoïdes isolés du genre <i>Linaria</i>	15
1.11	Autres iridoïdes	15
1.12	Dautres iridoïdes isolés	16
1.13	les Flavonoïdes isolés à partir du genre <i>Linaria</i>	17
1.14	la quercétine-7-O-rutinoside	17
1.15	Quelques diterpènes isolés à partir du Genre <i>Linaria</i>	19
1.16	Les Titerpènes isolés à partir du genre <i>Linaria</i>	19
2.1	<i>linaria gharbensis</i>	22

2.2	Quelques Appareillages Utilisés	26
2.3	Schéma représente les étapes d'extraction par Macération.	27
2.4	Extraction par Infusion.	27
2.5	Montage Soxhlet.	28
2.6	les cartouches de la matière végétale	29
2.7	Différentes étapes de l'extraction par Ultrason	29
2.8	Coloration de quelques dosages	31
2.9	l'étape de migration	32
2.10	la plaque avant et après la révélation	32
2.11	dosage des polyphénols totaux (PPT).	33
2.12	Différentes étapes du Dosage PPT	33
2.13	dosage des Flavonoïdes (TFC).	34
2.14	Différentes étapes du dosage des Flavonoïdes (TFC).	34
2.15	Boîtes de Pétri des trois souches bactériennes utilisées après incubation. . .	36
2.16	Préparation de l'inoculum des extraits	36
3.1	Le graphe de rendement.	39
3.2	Plaque CCM des extraits de <i>L. gharbensis</i> avant révélation.	41
3.3	Plaque CCM des extraits de <i>L. gharbensis</i> après révélation.	41
3.4	La courbe d'étalonnage d'acide gallique.	44
3.5	La courbe d'étalonnage de la quercétine.	46
3.6	L'activité antibactérienne des extraits-Soxhlet AcEOt-	48
3.7	L'activité antibactérienne des extraits-Soxhlet MeOH-	48
3.8	L'activité antibactérienne des extraits-Infusion H_2O -	48
3.9	L'activité antibactérienne des extraits-Macération EtOH-	49
3.10	L'activité antibactérienne des extraits-Ultrason MeOH-	49
3.11	L'activité antibactérienne des extraits-Macération MeOH-	49

Liste des tableaux

1.1	Quelques Flavonoïdes isolés à partir du genre <i>Linaria</i>	18
2.1	Classification botanique de l'espèce étudiée	23
2.2	Tableau des appareillages et des produits utilisés au Laboratoire	25
3.1	Les Rendements des Extraits	38
3.2	Les Résultats du Screening	40
3.3	Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavo- niques.	42
3.4	Identification de la coloration par les structures flavoniques Possible.	43
3.5	Teneur en polyphénols (chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± écart-types).	44
3.6	Teneur en flavonoïdes (chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± écart-types)	45
3.7	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) des extraits de <i>Linaria gharbensis</i>	47

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies (**Athamena, (2009)**). En effet, toutes les cultures et les civilisations, de l'Antiquité à nos jours, dépendent entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de son efficacité, de la disponibilité des plantes et de leur faible toxicité (**Akharaiyi et Boboye, (2010)**)

Plusieurs plantes peuvent guérir de nombreux maux quotidiens qui vont des simples troubles digestifs jusqu'au traitement des maladies chroniques comme le cancer, l'ulcère, le diabète et les calculs rénaux.

Ces plantes doivent leur pouvoir thérapeutique à des composés, dits alors actifs (principes actifs), qu'elles renferment. Parmi ces composés potentiellement intéressants, les composés phénoliques qui sont particulièrement utilisés comme antioxydants dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé). Notons aussi leurs diverses propriétés biologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective, vasodilatatoire. (**HIRASA et TAKEMASA, (1998)**)

Au cours des dernières années, des études sur les activités antioxydantes et microbiennes des plantes médicinales ont augmenté de façon remarquable due à un intérêt accru pour leur potentiel d'être utilisé en tant que source d'antioxydants riche et naturel.

Ce travail constitue une modeste, mais efficace contribution à la valorisation de la Flore de notre pays qui possède une biodiversité immense et pour laquelle chaque espèce peut être considérée comme un réservoir important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques potentielles, qui ne demandent qu'à être exploitées et valorisées par les recherches.



FIGURE 1 :

Parmi les plantes médicinales, Nous avons sélectionné dans cette recherche l'étude des différents aspects de l'espèce du genre *Linaria*.

La présentation de notre travail est réalisé en trois parties principales plus ; une Introduction, un résumé, une Conclusion et une liste de Références.

Le Chapitre 1 ; **Description Botaniques, Biologiques et Pharmacologiques du Genre *Linaria***, comme le titre l'indique, est consacré à l'étude du Genre *Linaria* selon les trois principaux axes : Botaniques, Biologiques et Pharmacologiques. Au premier lieu, on définit et identifie le Genre de la plante *Linaria*. Plus précisément, on donne la classification botanique et la description morphologique de la plante plus une distribution géographique sur le Globe. Un survol sur les différents usages de certaines espèces du genre *Linaria* en médecine traditionnelle a été présenté. La présentation est visualisée par des photos réelles de la plante en temps de fluorescence.

Au seconde lieu, ce chapitre est consacré à des investigations phytochimiques du genre *Linaria*.

Le Chapitre 2, intitulé **Matériels et Méthodes**, est consacré à la description des Méthodes, Techniques et Matériels utilisés à cette étude. On a commencé par une description de la plante *Linaria Gharbensis*, sa place dans la Systématique, les crières de sélection et la manière de la récolte. L'étude phytochimique concerne la procédure d'extraction, Techniques d'analyse utilis . De plus, on a provisioné ce chapitre par plusieurs photos de tous les appareillages prises pendant l'exécution des expériences.

L' étude expérimentale est faite au niveau du Laboratoire de Chimie à l'Université Mohamed Boudiaf, M'sila et au niveau du Laboratoire l'unité de recherche à l'Université Mentouri, Constantine1. et l'activité biologique au niveau de l'institut de Pasteur,M'sila

Le Chapitre 3 est le chapitre principale où, on décrit nos expériences, présente et discute nos résultats.

Remarque : Ce travail a été réalisé à l'aide du logiciel la TEX.

Partie Théorique

———— Chapitre 1 ————

Description Botaniques, Biologiques
et Pharmacologiques du Genre
Linaria

1.1 Données Botaniques

1.1.1 Introduction de la Famille

Depuis l'Antiquité, la plante herbacée Plantaginaceae a été reconnue et proposée à l'étude grâce à ses avantages médicaux et diététiques. La famille des Plantaginacées, celle du plantain, représente des plantes florifères provenant de 90 genres à l'ordre des Lamiales, répartis en 1900 espèces différentes. Ce sont des arbustes et des herbes [1].

1.1.2 Présentation du Genre

Le nom de genre *Linaria* vient du latin *linum* signifiant lin en référence aux feuilles ressemblant à celle du lin [2]. C'est un grand genre qui contient 200 espèces de plantes à floraison [3]. Ce genre de petites plantes à fleurs brillantes est en fait l'un des plus grands vivaces herbacées et annuelles genres de la tribu des Antirrhineae. *Linaria* fait partie de la famille Plantaginaceae [4]. Ils sont endémiques aux climats tempérés en Europe, en Asie et en Afrique du Nord. Néanmoins, la plus grande variété d'espèces est présente dans les régions méditerranéennes. Il est représenté par 39 espèces en Algérie [5], 20 en Turquie [6], 20 en Italie [7] et 24 en Espagne [8].

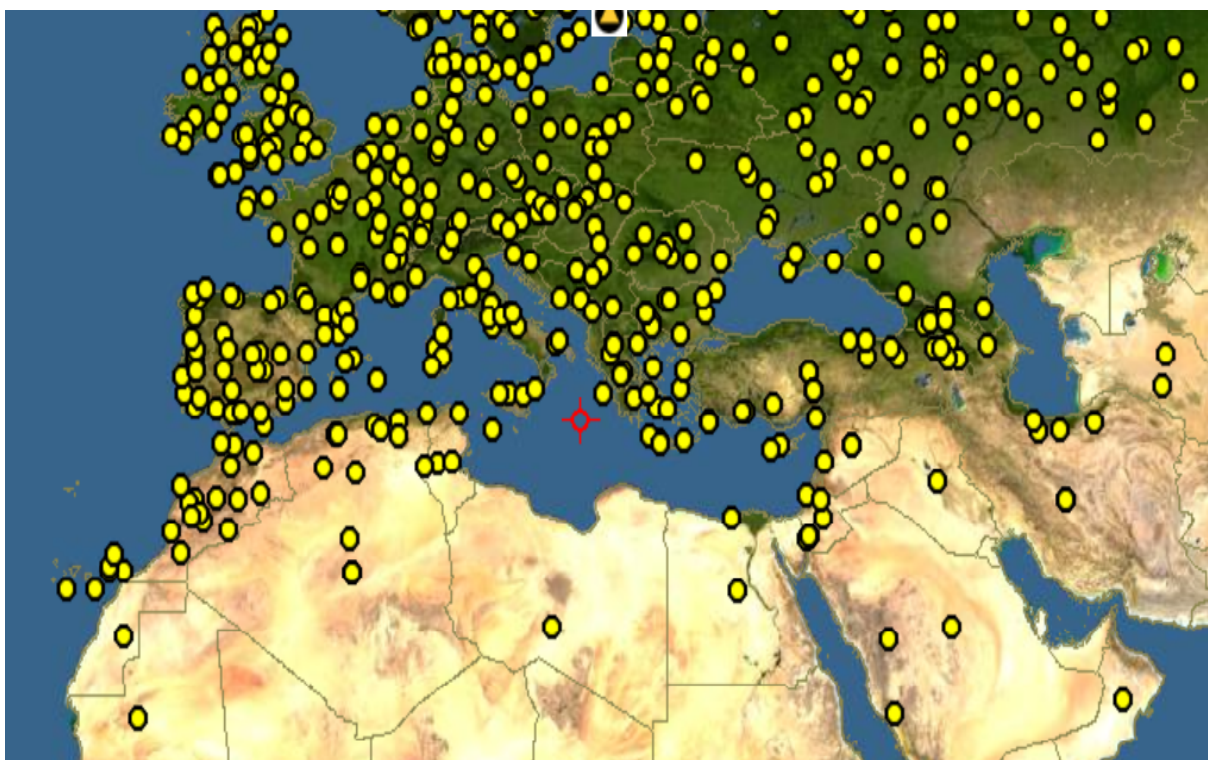


FIGURE 1.1 : Distribution géographique du genre *Linaria*.

Plantes de ce genre sont des herbes dressées ou rampantes plante annuelle ou vivace, de 10 à 30 cm de long, aux feuilles simples et étroites (généralement linéaires, rarement lobées ou dentées). Fleurs solitaires, axillaires, groupées ou en épis terminaux. Le calice est profondément divisé en cinq lobes de longueur inégale, généralement très courts. Corolle à deux lèvres avec un tube gonflé et un éperon allongé à la base. La lèvre supérieure se compose de deux lobes légèrement réfléchis et la lèvre inférieure se compose de trois lobes. Cette labelle présente un palais proéminent, fermant la gorge, bilobé, vivement coloré et souvent poilu. Quatre étamines. Le fruit est une capsule polysperme ovale [5].



FIGURE 1.2 : Quelques formes de la plante *Linaria*.

1.2 Propriétés Biologiques et Pharmacologiques du Genre

1.2.1 L'utilisation en Médecine Traditionnel

Plusieurs espèces *Linaria* étaient utilisées en médecine traditionnelle a suscité l'attention pour des études chimiques et biologiques. Comme usage toniques, antiscorbutiques, ainsi que pour le traitement des plaies, des hémorroïdes et des troubles vasculaires (Pahlow 1979 ; Eret al. 2004). Laxatifs, antidiabétiques et diurétiques (Rosa,2005 ; Cheriet.2013). Parmi ces espèces :

- ***Linaria Cymbalaria*** : Dans la médecine traditionnelle de certains pays, l'infusion de cette plante est utilisé pour ses propriétés anti-hémorroïdaires, astringentes et vulnéraires. On s'en servait aussi pour traiter l'eczéma, les excoriations, les gelures, les brûlures, la gale et la teigne [9].

FIGURE 1.3 : *Linaria Cymbalaria*

- ***Linaria Vulgaris*** : poussant dans le Nord-Est de la chine, elle est utilisée par la population locale dans le traitement de la toux, de l'asthme et comme expectorant [10].
- ***Linaria Reflexa Desf*** : est une petite plante médicinale utilisée dans la médecine populaire Nord-Africaine sous le nom de "Oum lajrah"(mère des plaies) en raison de son pouvoir de guérison, et dans le traitement topique de certaines dermatoses (Boukef 1986). [4].

FIGURE 1.4 : *Linaria reflexa Desf*

- ***Linaria Japonica*** (nom Japonais : Unran) : Est une plante vivace qui pousse dans les zones côtières. Elle est utilisée en médecine populaire comme un agent diurétique, purgative [11] et laxative [12].



FIGURE 1.5 : *Linaria Japonica*

- ***Linaria Buriatica*** : Des recherches ethnobotaniques en Mongolie sur *Linaria buriatica* montrent que les fleurs de cette espèce étaient utilisées comme remède pour le traitement de la fièvre et de l'oedème [13].



FIGURE 1.6 : *Linaria Buriatica*

- ***Linaria Scariosa Desf*** : est une plante médicinale utilisée par les populations locales de la région des Aurès (Algérie) pour la cicatrisation des plaies. Elle est aussi utilisée dans des applications pharmaceutiques et cosmétiques [14].
- ***Linaria Triphylla (l.) mil*** : En usage externe, elle est utilisée contre la conjonctivite, les engelures et les hémorroïdes. En interne, elle est utilisée contre les infections de la peau, ictère [15].



FIGURE 1.7 : *Linaria Triphylla*

1.2.2 L'activité Biologique Observée du Genre

Les plantes sont une excellente source de certains métabolites secondaires à effets thérapeutiques, ce qui est le cas des espèces du genre *Linaria*. Ces derniers possédant une large variété des activités biologiques, tel que antioxydante, antidiabétique, anti-inflammatoire, anti microbienne, anti cancéreuse et antiviral. Donc les activités les plus remarquables sont :

Activité Anti Oxydantes

Des études faites sur les extraits éthanoïques de *L. purpurea* [3], cosmétique de *L. japonica* [20], chloroforme, acétate d'éthyle et n-botanique de *L. tingitana* [16, 17], ont montré d'importantes propriétés anti-oxydantes liées à leurs compositions chimique riches en po-

lyphénols et en composés terpéniques. L'extrait méthanoïque de *L. scariosa* Desf a une grande capacité d'absorption des radiations UV et possède une activité antioxydante remarquable [18].

Activité Anti Inflammatoire

Pendant plusieurs années, Marina Gordaliza et ses collaborateurs ont étudiés la composition chimique de certaines sous-espèces de *Linaria saxatilis*. Il s'avère que *L. saxatilis* var. *saxatilis*, une espèce végétale originaire du nord et du centre de la péninsule ibérique, a fait l'objet d'une étude chimique qui a conduit à l'isolement de diterpénoïdes. Ces derniers ont montré une activité cytotoxique importantes contre une série de cellules cancéreuses cultivées in vitro [19]. Une autre étude effectuée sur l'espèce *L. saxatilis* var. *glutinosa*, par Terencio et al., a révélée que certains diterpénoïdes inhibent les enzymes impliquées dans les processus inflammatoires [20]. Parmi les études récentes qui ont montrés que la plante possède des effets anti-inflammatoires ; l'étude biologique réalisée sur l'extrait préparée à partir de l'espèce *L. reflexa* desf [21], *L. purpurea* [3], *L. grandiflora*, *L. genistifolia*, *L. aucheri* [22] et *L. buriatica* [24]. Les analyses profonds ont prouvent que l'agent responsable sur les activités observées était les flavonoïdes, en particulier, pectolarine et pectolarigenine.

Activité Antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait éthanoïque de *L. scariosa* montre qu'il possède des propriétés antibactériennes intéressantes [25]. Une autre étude effectuée sur l'espèce *L. ventricosa* (Coss. et Bal.2019) a montré une activités antimicrobiennes de sa propre huile essentielle [14].

Autres Activités

- **Anti-tumorale** : D'après les études sur l'activité anticancéreuse des extraits éthanoïques de *L. purpurea* [3] et *L. alpina* [26], ces deux espèces ont des propriétés antitumorales exceptionnelles contre leukemia et le carcinome pulmonaire.

Une investigation sur les propriétés anticoagulantes, neuroprotectrices, hépatopro-

tectrices, anti-nociceptives et antidiabétiques de l'extrait hydro-alcoolique de *L. purpurea* a révélé qu'il possède des propriétés anticoagulantes, neuroprotectrices, hépatoprotectrices, anti-nociceptives et antidiabétiques [3].

Le test in vivo de l'activité antidiabétique de la plante *Linaria reflexa* desf avec les extraits aqueux (AQ) et méthanolique assisté par ultrason (AU) à la dose 300 mg/kg de poids corporel, a montré une activité forte (donné une hypoglycémie (-72,09%)) que celle du médicament référence (300 mg/kg de pc) utilisé pour traiter le diabète (Glibenclamide) [27].

- **Anti Virale** : une autre investigation sur l'extrait éthanoïques de *L. alpina* a abouti principalement à l'isolement de certains triterpènes penta-cycliques tels que l'acide oléanolique [26], qui a été identifié comme un principe anti-VIH [28].

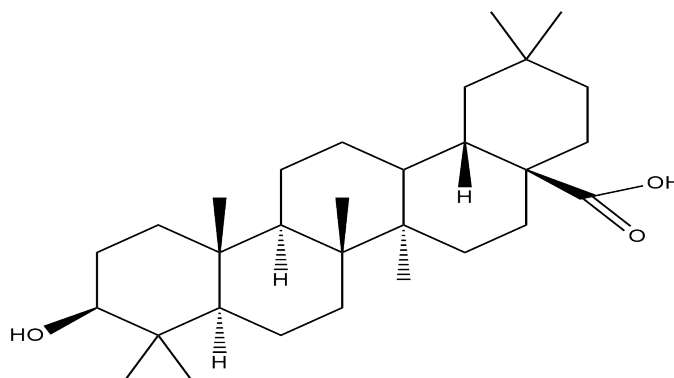


FIGURE 1.8 : Acide Oléanolique.

1.3 Les Investigations Phytochimiques du Genre *Linaria*

1.3.1 Généralité

Les métabolites secondaires des plantes constituent un groupe diversifié de molécules qui sont impliquées dans l'adaptation des plantes à leur environnement, mais qui ne font pas partie des voies primaires de la croissance et de la reproduction des cellules (Makkar 2007), mais les plantes interagissent avec l'environnement en utilisant de telles molécules, soit pour résister aux parasites, soit pour favoriser la pollinisation.

Pendant des années, ce genre a été la source de nombreuses sortes de composés dont des iridoïdes, des flavonoïdes, des diterpénoïdes, des alcaloïdes et des phényléthanoïdes. Les activités pharmacologiques rapportées d'extraits végétaux et de composés naturels isolés se réfèrent à l'inhibition antiproliférante, cytotoxique, l'acétylcholinestérase (AChE), antibactérienne, anti-inflammatoire, antioxydante et diurétique [22].

1.3.2 Les Iridoïdes

Les Iridoïdes se trouvent dans les végétaux, en particulier chez les angiospermes dicotylédones, notamment dans l'ordre des gamopétales, lamiales..

Antirrhinoside (1) et ces dérivés sont les marqueurs chimiques pour les genres de la tribu Antirrhineae de la famille Plantaginaceae.

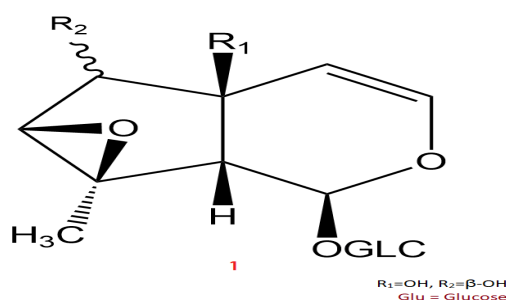
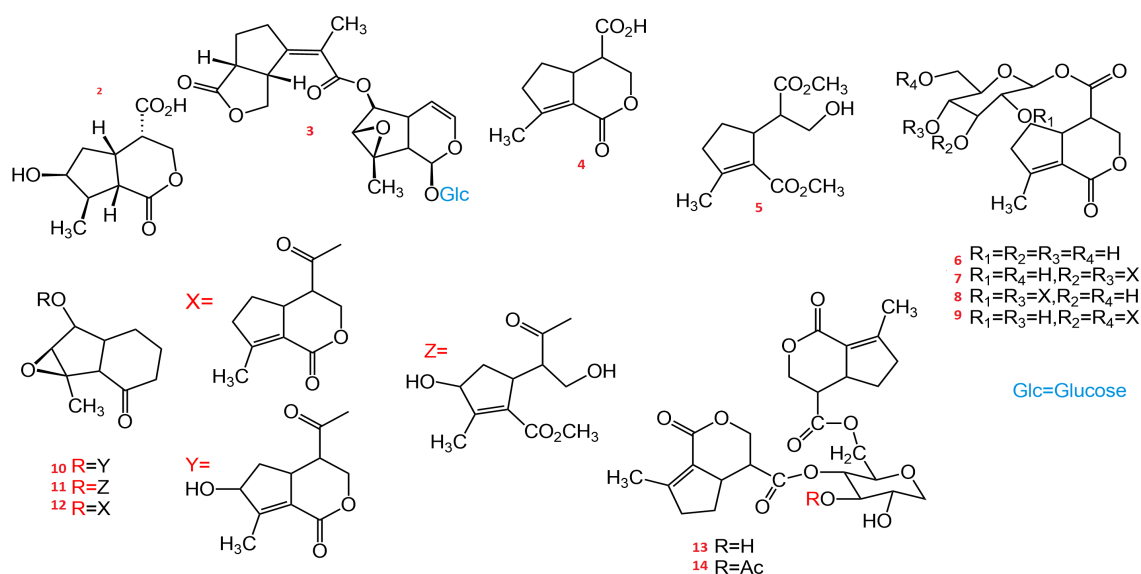


FIGURE 1.9 : Antirrhinoside.

Les études phytochimiques antérieures sur les plantes du genre *Linaria* permis l'identification de plusieurs iridoïdes tels que le 4-carboxy-boonein (2) de *L. vulgaris* [36], un bi-iridoïde nommé l'arcusangeloside (3) de *L. arcusangelii* [29], l'acide 7-deoxyiridolactonique (4) et ses dérivés : l'acide 7-deoxyiridolactonique diméthyles ester (5), l'iridolinaroside A, B, C et D (6-9)[30] et l'iridolinarine A, B et C (10-12) [31] de *L. japonica* ainsi que le 4,6-Di-(7-deoxyiridolactonyl) D-glucopyranose (13) et le 3-Acetyl-4,6-di-(7-deoxyiridolactonyl)-D-glucopyranose (14) de *L. canadensis* [33].

FIGURE 1.10 : Quelques Iridoïdes isolés du genre *Linaria*

L'analyse phytochimique de l'extrait éthanoïque de *L. Cymbalaria* a montrée la présence de deux nouveaux iridoïdes nommés l'acide 8-epiloganiquen (15) et 7, β -hydroxy-8-epi-iridodial glucoside (16) accompagné par l'antirrhinoside [34, 35].

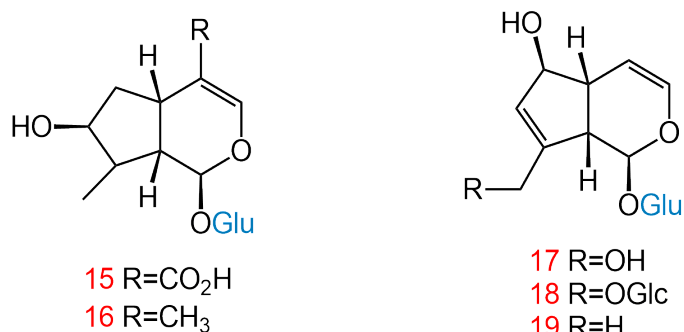


FIGURE 1.11 : Autres iridoïdes

Un autre Iridoïde est présent dans le genre *Linaria*, il s'agit de l'aucubine (17), trouvé dans *L. vulgaris* [36] et *L. macroura* [37] avec ses deux dérivés, 10-O- β -glucosylaucubine (18) dans *L. vulgaris* [36, 39] et *L. purpurea* [38] et la linaride (10-deoxyaucubine) (19), un nouveau iridoïde isolé à partir de *L. muralis* [40].

Une étude sur *L. purpurea*, a montré la présence d'un nouveau iridoïde avec une structure de type nepeta-lactone et une unité de sucre lié au cycle cyclopentène nommé purpureoside (20) [38]. D'autres iridoïdes ont été isolés à partir de *L. japonica* en particu-

lier antirrhide (21), un constituant très connu dans le genre *Linaria* et ses deux dérivés le 6- β -hydroxyantirrhide (22) et la linariolose (23), ainsi que le 5-deoxyteuhircoside (24) et le seco-linariolose (25).

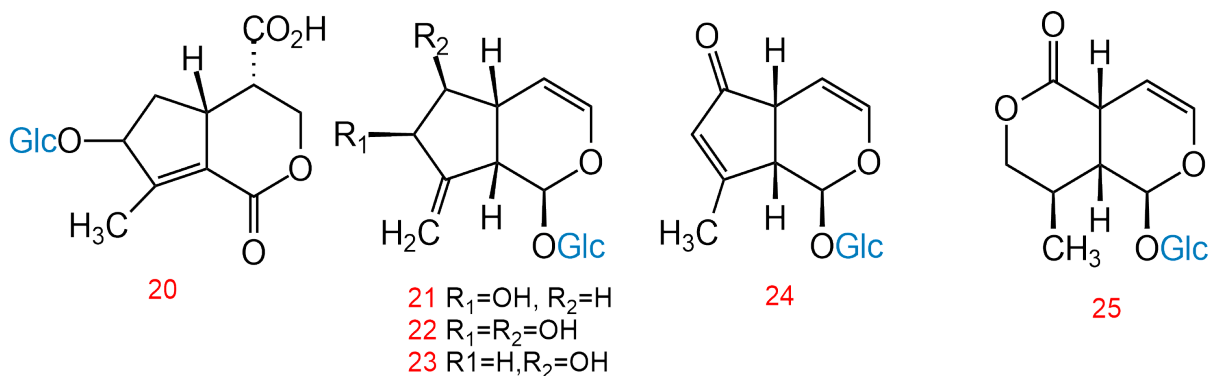


FIGURE 1.12 : D'autres iridoïdes isolés

1.3.3 Les Flavonoïdes

Les Flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [41]. Ils représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans la nature. On attribue à ces flavonoïdes divers effets biologiques tels que l'antitumoral, l'anti-cancérigène, l'anti-inflammatoire, l'hypotenseur et l'antioxydante [42]. Les flavonoïdes sont très communs dans le genre *Linaria*, y compris les Flavones, les Flavonols et leurs dérivés glycosylés.

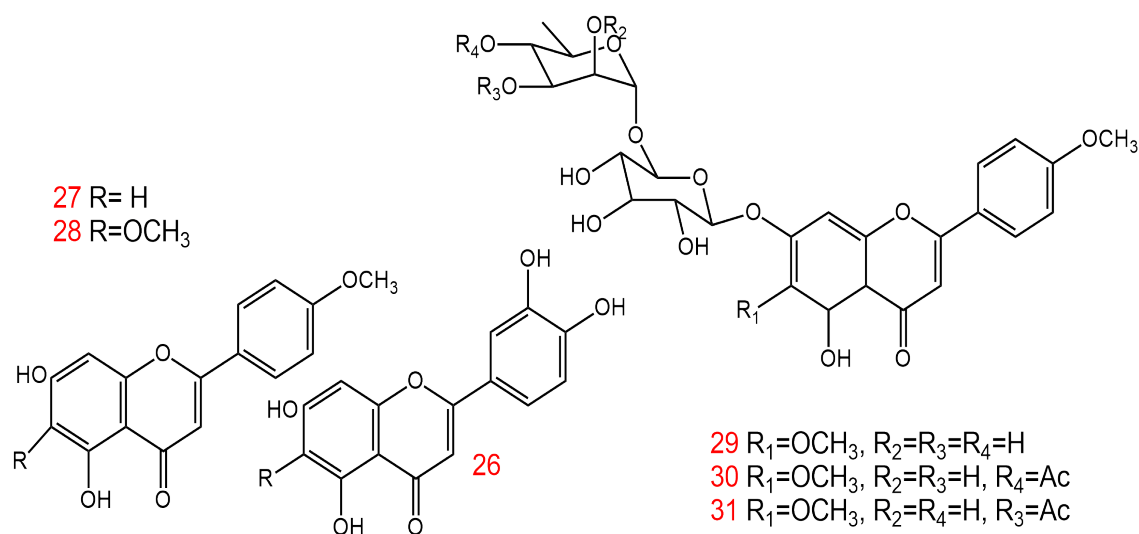


FIGURE 1.13 : les Flavonoïdes isolés à partir du genre *Linaria*.

Seule la quercétine-7-O-rutinoside (32) des Flavonoles glycosylés a été isolée à partir de *L. canadensis* [33].

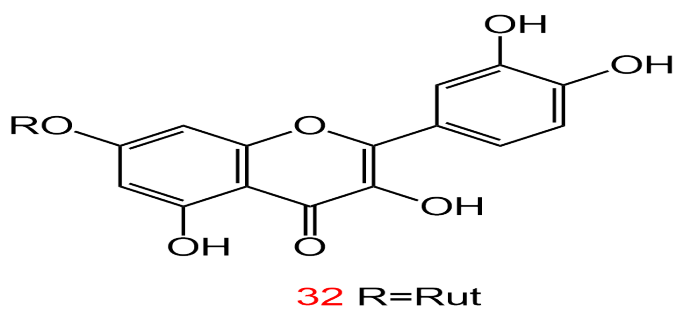


FIGURE 1.14 : la quercétine-7-O-rutinoside

Composés	Espèces	Refs
Tuteoline (26)	<i>L. vulgaris</i> <i>L. japonica</i>	[43] [44]
Acacétine (27)	<i>L. vulgaris</i>	[43]
Pectolinarigenine (28)	<i>L. canadensis</i> <i>L. japonica</i> <i>L. reflexa</i> <i>L. kurdica</i>	[33] [45] [46] [47]
Pectolinarine (29)	<i>L. japonica</i> <i>L. reflexa</i>	[44] [27]
Linariine (30)	<i>L. vulgaris</i> <i>L. japonica</i> <i>L. reflexa</i>	[11] [48] [49]
Isolinariin B (31)	<i>L. reflexa</i>	[49]

TABLE 1.1 : Quelques Flavonoïdes isolés à partir du genre *Linaria*.

1.3.4 Les Terpènes

Les terpènes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux, notamment les plantes supérieures. Ils sont également rencontrés dans les autres types d'organismes vivants (algues, mousses, champignons, insectes). La majorité fonctionne comme des métabolites secondaires et contribue à l'adaptation des espèces à leur niche écologique. Ils sont d'origine végétale et constituent, entre autres, principe odoriférant des plantes, Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles.

Diterpènes

L'espèce *L. saxatilis* a été étudiée pour sa composition chimique et ses activités biologiques intéressantes. Il s'avère que *L. saxatilis*, a fait l'objet d'une investigation phytochimique qui a conduit à l'isolement de diterpénoïdes à squelette néo-clérodane. Ces derniers ont montré une bonne activité cytotoxique contre une série de cellules cancéreuses in vitro [19].

Seulement deux espèces du genre *Linaria* sont connus pour la présence de diterpénoïdes, ils'agit de *L. saxatilis* et *L. japonica* (Dialdéhyde linaridial(33), Linarienone(34)) [12, 50].

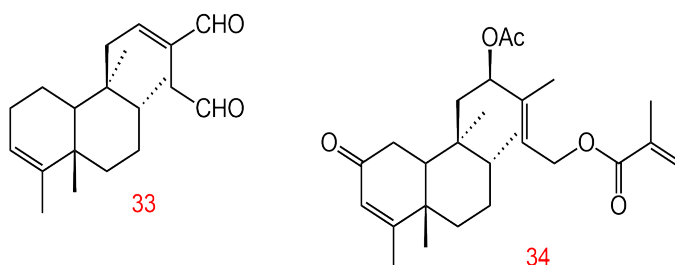


FIGURE 1.15 : Quelques diterpènes isolés à partir du Genre *Linaria*

Triterpènes

Les Triterpénoïdes ne sont pas bien commun dans le genre *Linaria*, la majorité ont été isolés à partir de *L. vulgaris*. La plupart d'entre eux sont des stéroïdes avec la présence de certaines structures correspondant aux squelettes oléane et lupane.

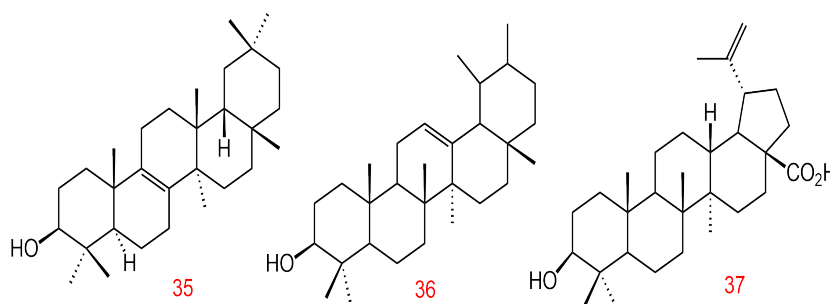


FIGURE 1.16 : Les Triterpènes isolés à partir du genre *Linaria*

Les composés isolés à partir de *L. vulgaris* sont isomultiflorenol (35) [50], α -amyrin (36) et l'acide betulique (37) [53].

Partie Expérimentale

———— Chapitre 2 ————

Matériels et Méthodes

2.1 A propos de *linaria gharbensis*

2.1.1 Description de la Plante *linaria gharbensis*



FIGURE 2.1 : *linaria gharbensis*

C'est une plante annuelle de 10 à 40 cm de hauteur, glabre et glauque, à tiges grêles, dressées, souvent rameuses. Feuilles inférieures verticillées par 4, les supérieures alternes, toutes linéaires-étroites, à 1 nervure. Inflorescence poilue-glanduleuse. Fleurs d'un bleu pâle à palais blanchâtre, petites, subsessiles, en grappes d'abord très courtes, à la fin longues et lâches. Bractées linéaires, réfléchies. Calice poilu-glanduleux, à lobes linéaires-obtus. Corolle de 4 à 5 mm, à éperon linéaire en alêne, recourbé, égalant à peine son tiers. Capsule (fruit) subglobuleuse, dépassant le calice. Graines de 1 mm, grisâtres, lisses, orbiculaires-ailées.

2.1.2 La Place dans la Systématique

La taxonomie botanique selon la classification APG III **Chase & Reveal (2009)** est décrite comme suit :

Rène	Plantea
Classe	Magnoliopsida
Order	Lamiales
Famille	Plantaginaceae
Tribu	Antirrhineae
Genre	<i>Linaria</i>
Espèce	<i>Linaria gharbensis</i>

TABLE 2.1 : Classification botanique de l'espèce étudiée

2.1.3 Critères de Sélection de la Plante

Le choix de cette plante comme sujet d'investigations phytochimiques et biologiques a été motivé par :

- Les nombreuses utilisations des espèces de *Linaria* dans la médecine itinérante pour traiter différentes problèmes de santé.
- La recherche bibliographique que nous avons menée sur l'espèce *L.Gharbensis* a montré que cette plante n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique auparavant.

2.1.4 La Récolte de la Plante

Les parties aériennes de *L.gharbensis* ont été récoltée durant le mois de Mars 2022 , dans la chaîne montagneuse Edough à Séraïdi, Annaba par Dr. Hamel Tarek.

2.2 Matériels utilisés

En plus du Matériel régulièrement utilisés dans le laboratoire (Verreries, Balance électrique, agitateur, plaque chauffante...) nous avons utilisé des appareillages et des produits résume dans le tableau suivant :

Méthodes d'Extraction	-Rotavapeur -Papier filtre -Montage de soxhlet -Ultrason	- Méthanol MeOH - Ethanol EtOH - Acétate d'éthyle AcEOt - H_2O
Techniques d'Analyses	-d'hydroxyde de sodium -Chloroforme -Acide acétique -Quercétine - Acide sulfurique H_2O_4 -Chlorure de fer -Folin-Ciocalteu - Acide gallique	- Tubes capillaires - Tubes à essai - Plaque CCM - Spectrophotomètre UV -HCl - Anysaldehyde -Carbonate de sodium - Trichlorure d'Aluminium
Activité Antibactérienne	-Les écouvillons -Micropipette -Boittes pétries -DMSO -L'autoclave	-Les embouts -Tubes à essai -Disques (papier wattman) -Voltex -la gélose (MHA)

TABLE 2.2 : Tableau des appareillages et des produits utilisés au Laboratoire



FIGURE 2.2 : Quelques Appareillages Utilisés

2.3 L'Étude Phytochimique

2.3.1 Procédure d'Extraction

La matière végétale collectée a été séchée à température ambiante pendant 15 jours à l'air libre. La plante sèche a été découpée en petits morceaux. Afin d'extraire les composants de la plante. Nous avons utilisé différentes techniques d'extraction.

Macération

La plante (50gx2) a été macérée avec deux mélanges hydroalcoolique à une température ambiante, un mélange hydro-méthanoïque (MeOH/Eau ;80/20 %), et un mélange hydroéthanoïque (EtOH/Eau ;70/30%). Cette macération a été répétée 3 fois, à chaque fois avec renouvellement du solvant chaque 72h. Après la filtration des mélanges, les extraits ont été évaporés à 38°C avec un évaporateur rotatif, sous pression réduite jusqu'à la concentration de l'extrait.

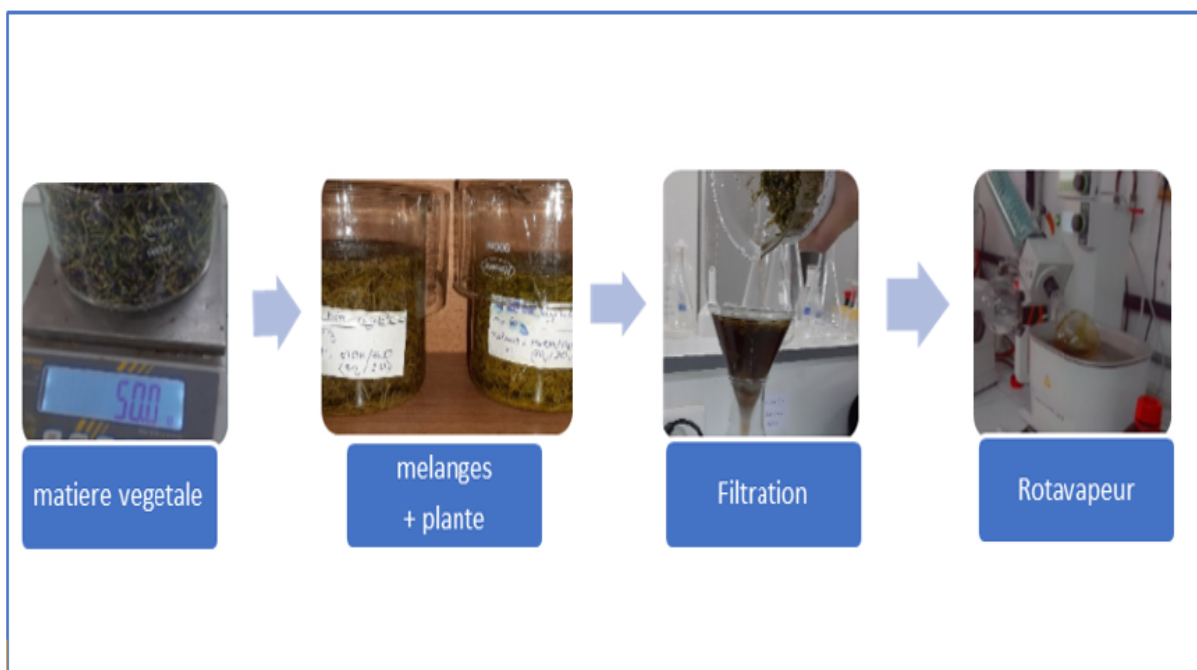


FIGURE 2.3 : Schéma représente les étapes d'extraction par Macération.

Extraction par l'Infusion

On a versé 600 ml de l'eau bouillante à 80°C sur la plante (50g). On a laissé le mélange pour une heure du temps. Après on a filtré le mélange, puis l'évaporé jusqu'à la concentration.



FIGURE 2.4 : Extraction par Infusion.

Extraction par Soxhlet

L'extraction de *L.gharbensis* par cette technique a été effectuée en utilisant deux solvants différents :

- **Soxhlet par Methanol** : 50 g des parties aériennes ont été mises dans six cartouches et extraire avec 800ml de MeOH (divisé en deux volumes; 400 ml pour chaque 3 cartouches, 6h pour chaque une), à 40°C. L'extraction a été répétée jusqu'à l'épuisement de la matière végétale pour obtenir un extrait méthanolique.

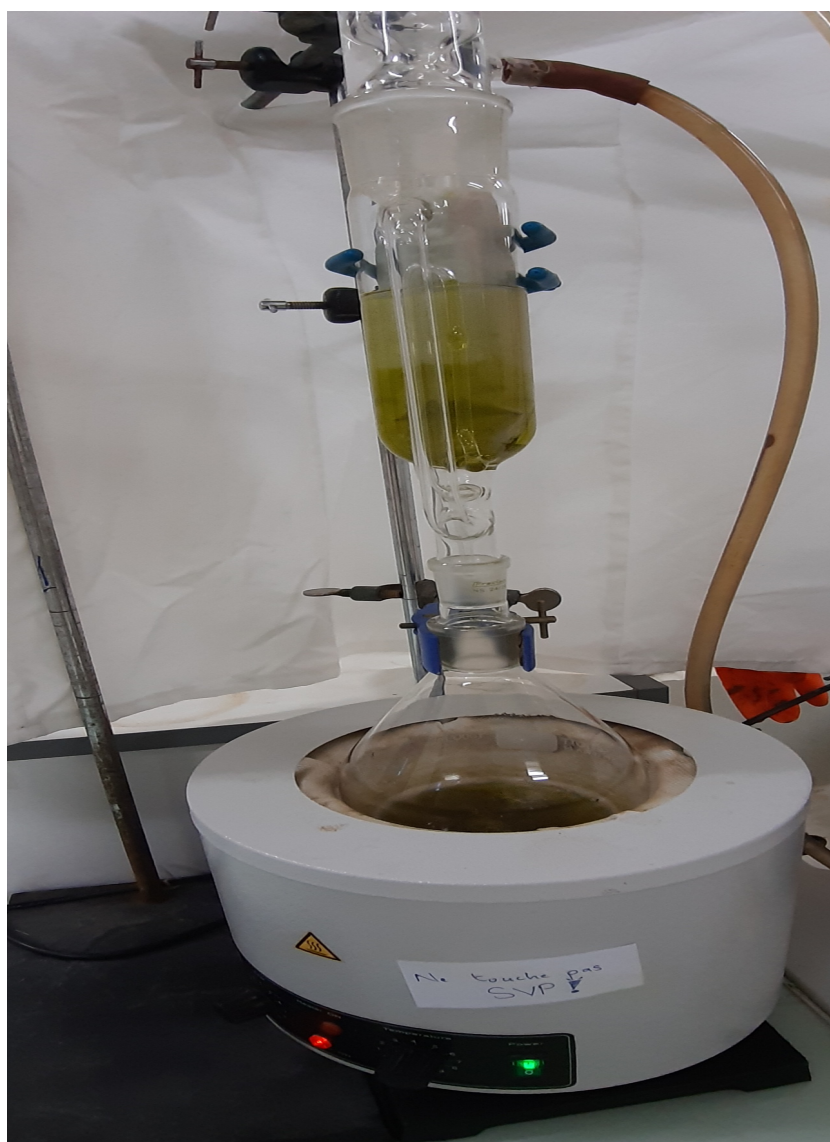


FIGURE 2.5 : Montage Soxhlet.

- **Soxhlet par l'Acétate d'Éthyle** : 20g de la matière végétale a été extraite avec 300 ml d'AcEOt à 40°C. La totalité de quantité a été empailée en deux cartouche, L'extrait a été évaporé à 38°C.

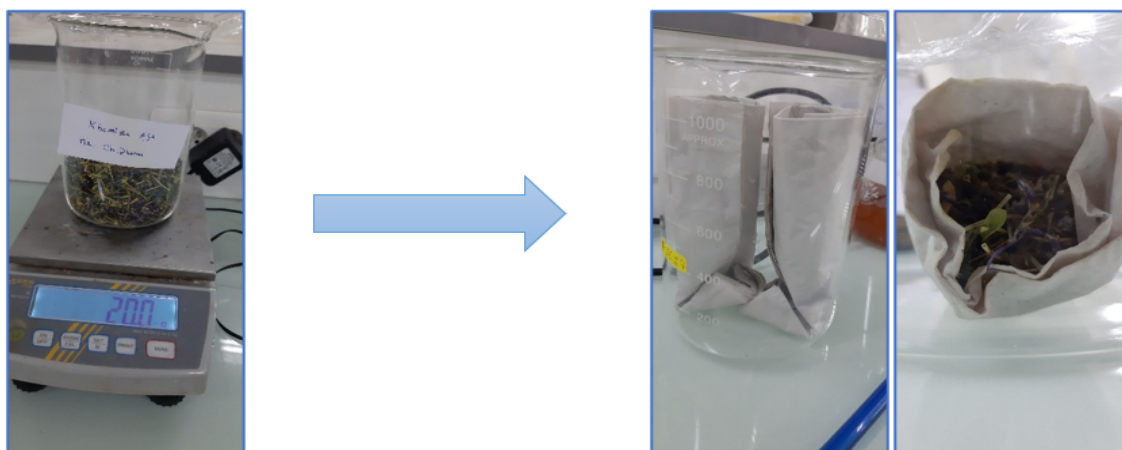


FIGURE 2.6 : les cartouches de la matière végétale

Extraction par l'Ultrason

50 g des parties aériennes du matériel végétal sont soumises à une extraction par ultrason avec MeOH sous les conditions suivantes : la fréquence= 35 Hz, température= 30°C.

L'ensemble est filtré sur du papier filtre puis évaporé.

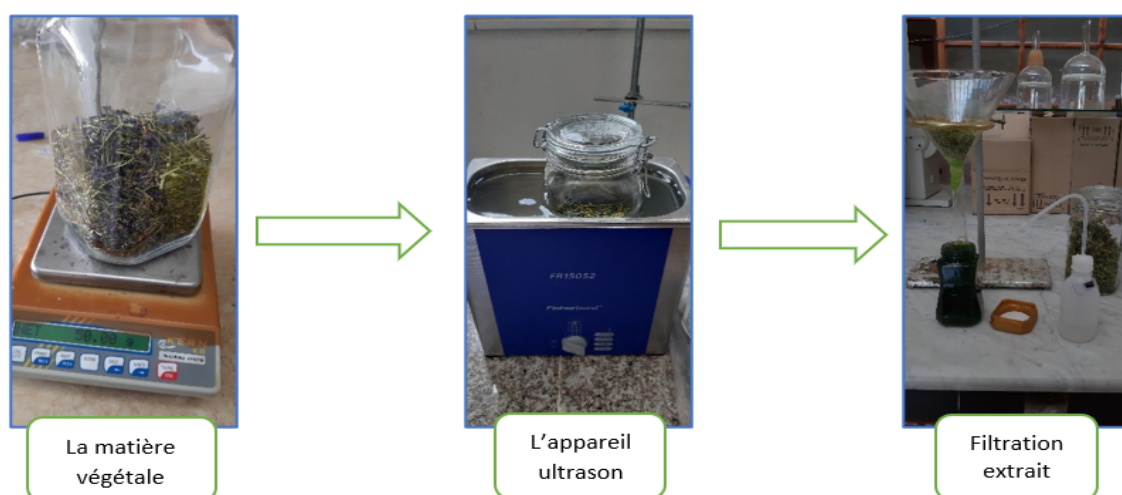


FIGURE 2.7 : Différentes étapes de l'extraction par Ultrason

2.4 Les Techniques d'Analyses

2.4.1 Screening Phytochimique

L'extrait soxhlet méthanolique a été soumis à divers tests phytochimiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques contenus dans ces extraits méthanoliques, en utilisant la méthode standard basée sur des réactions de coloration et de précipitation. A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés (J.Vesoul et I.E.Cock,2011 [54]).

- **Saponines**

1 ml d'extrait pur a été ajouté à 1 ml d'eau désionisée et secoué vigoureusement pendant 30s. On laisse reposer les tubes pendant 15 minutes et on note la présence ou l'absence de mousse persistante. Une mousse persistante indique la présence de saponines.

- **Flavonoïdes**

Les Flavonoïdes ont été détectés à l'aide d'un test de Kumar modifié(S.kumar,2001). 100 μ l d'hydroxyde de sodium aqueux ont été ajoutés à 1 ml de chaque extrait. L'apparition d'une couleur jaune intense indique la présence de Flavonoïdes. 100 μ l de HCl concentré ont été ajoutés à la solution. Le retour à la couleur d'origine confirme la présence de Flavonoïdes.

- **Triterpénoïdes**

Les Triterpénoïdes ont été détectés en utilisant une version modifiée du test de (Sal-kowski,1999). 1 ml d'extrait a été lentement ajouté à 400 μ l de chloroforme, suivi de l'ajout prudent de 400 μ l d'acide sulfurique concentré. La formation d'une couleur rouge/brune/pourpre à l'interface indique la présence de Triterpénoïdes.

- **Glycosides cardiaques**

Les glycosides cardiaques ont été détectés en utilisant une version modifiée du test de (Keller Kiliani,2001). 500 μ l d'extrait ont été ajoutés à 500 μ l d'acide acétique glacial. Quelques gouttes de chlorure de fer aqueux à 1% et d'acide sulfurique concentré ont

ensuite été soigneusement ajoutées. La présence d'un anneau rouge/brun de l'interface ou la formation d'une couleur verte/bleue dans toute la solution indique la présence de glycosides cardiaques.

• Test du Phénol soluble dans l'eau

2 gouttes de chlorure ferrique à 1% ont été ajoutées à 500 μ l de chaque extrait. Un changement de couleur rouge indique la présence de phénols solubles dans l'eau.



FIGURE 2.8 : Coloration de quelques dosages

2.4.2 Analyses par Chromatographie

Dans la continuité de l'investigation phytochimique des extraits, Les CCM réalisées sur tous les extraits obtenus et cela dans plusieurs systèmes d'élution révèlent la richesse des extraits.

- 1ere système : 9/1 (Chloroforme $CHCl_3$ /Méthanol MeOH).
- 2eme système : 8/2 (Chloroforme $CHCl_3$ /Méthanol MeOH)

A l'aide de tubes capillaires, les solutions d'extraits ont été déposées sur une chromatoplaque, La plaque a été séchée à l'air ambiant et a ensuite été placée dans une cuve de migration contenant le système de solvants approprié. Après la migration, la plaque a été retirée et séchée, puis la révélation a été faite à l'aide d'un réactif spécifique (Anysaldehyde) pour la détection des groupes chimiques et sous UV.

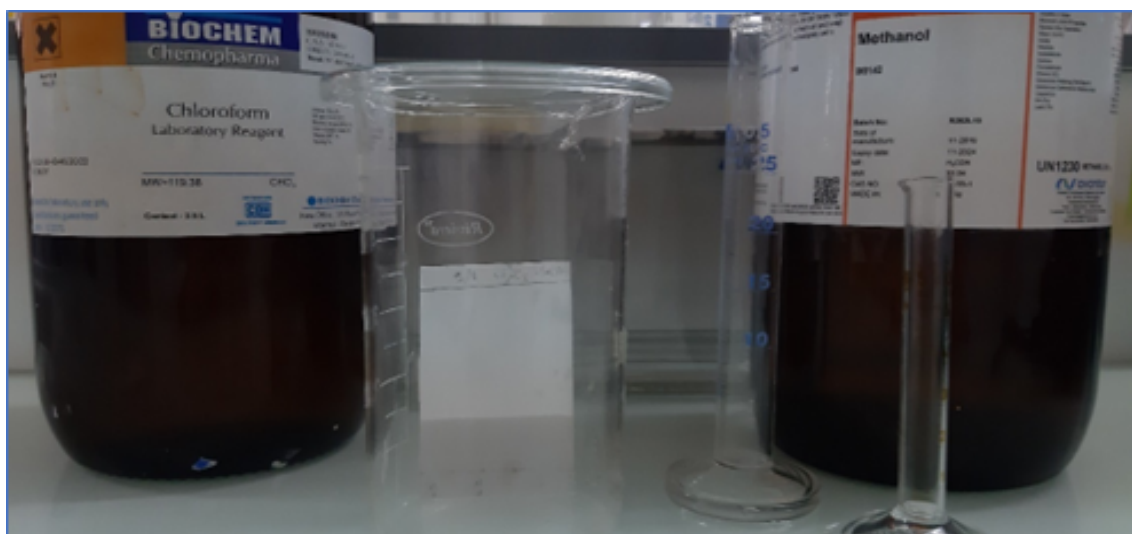


FIGURE 2.9 : l'étape de migration

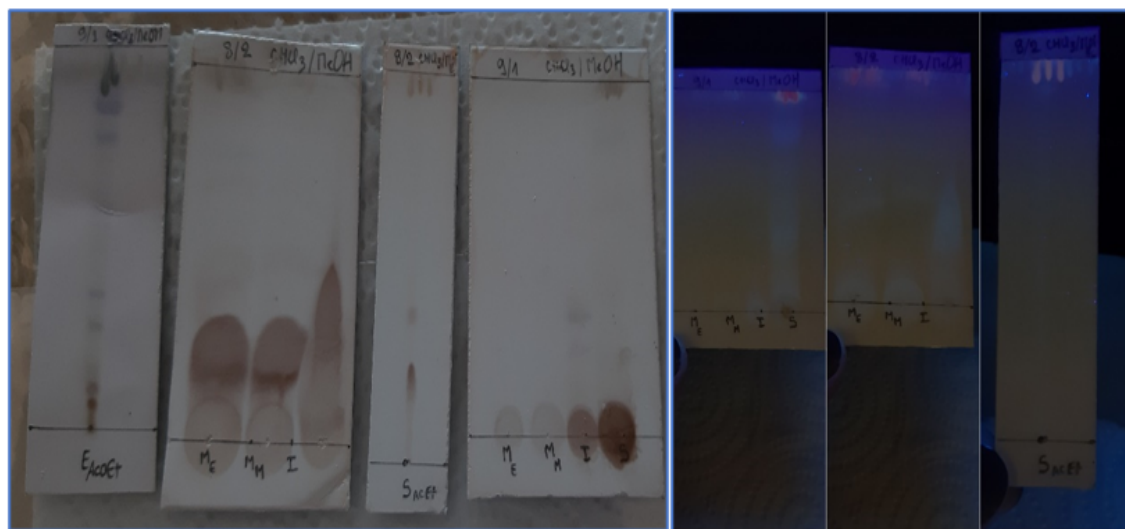


FIGURE 2.10 : la plaque avant et après la révélation

2.4.3 Dosages Polyphénols et les Flavonoïdes

Dosages les Polyphénols

La méthode du Folin-Ciocalteu (Singletou et Rossi) a été sélectionnée pour estimer le teneur de phénols totaux des extraits étudiés. Cet acide de couleur jaune, lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif en un complexe ayant une couleur bleue. Dans un tube on ajoute 0.25 ml (250 μ l) de l'extrait de la plante et 1.25 ml (1250 μ l) De FCR diluée et 1ml (1000 μ l) de carbonate de sodium (Na_2CO_3). Après 2 h d'incubation à 25°C et à l'obscurité, on a mesuré l'absorbance à 760 nm par un spectrophotomètre

UV-VIS, toutes les mesures ayant été répétées 3 fois. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique les résultats sont exprimés en μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait).

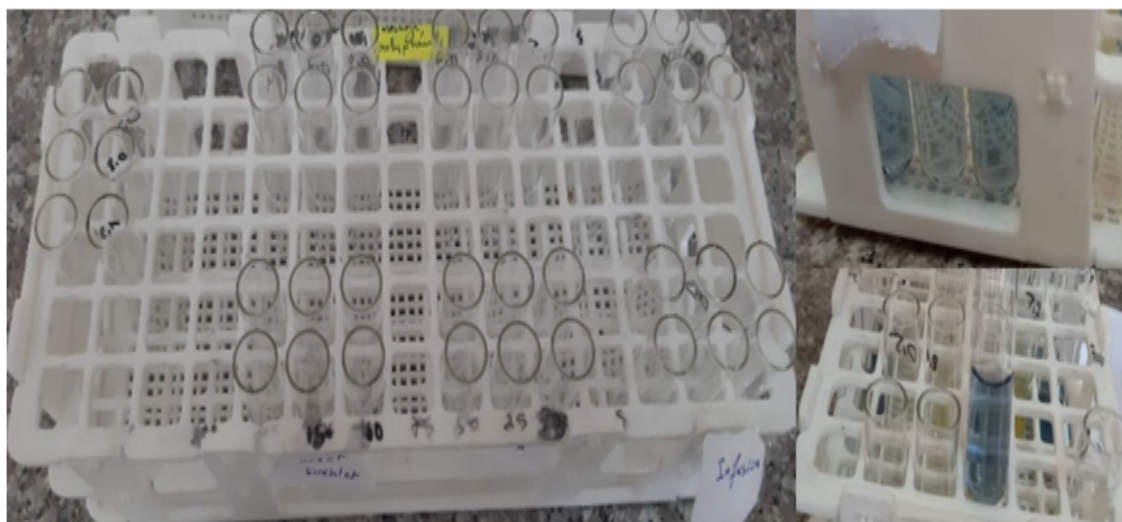


FIGURE 2.11 : dosage des polyphénols totaux (PPT).

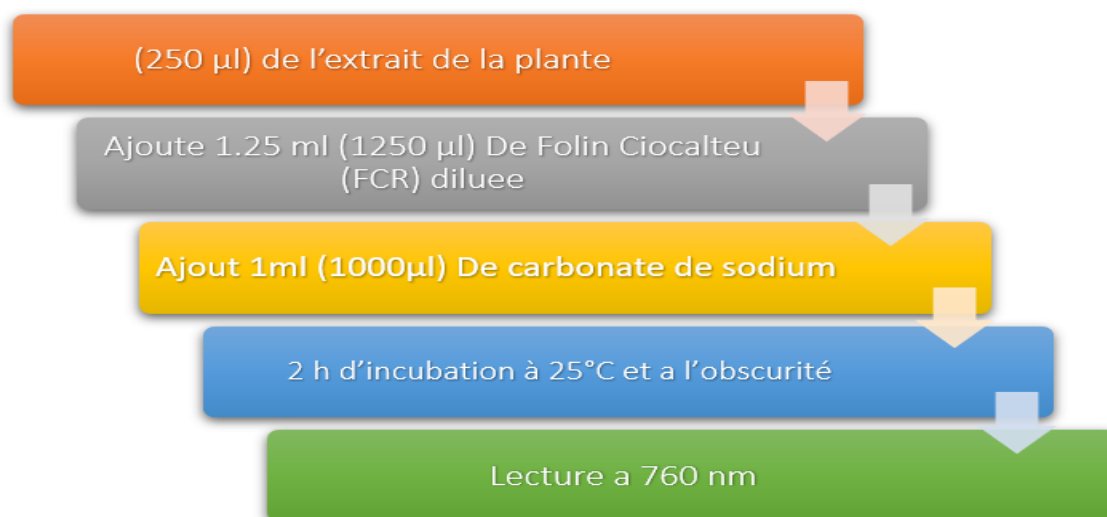


FIGURE 2.12 : Différentes étapes du Dosage PPT

Dosage les Flavonoïdes

Le dosage des Flavonoïdes totaux a été effectué par la méthode du trichlorure d'Aluminium (AlCl_3) décrite par (A.Meda 2004)(Arvouet et al, 1994). En utilisant le quercétine

comme standard. 1mg d'extrait de la plante a été mélangé avec 1mL de méthanol, et 1mL (1000 μ l) De AlCl₃ (Solution méthanolique à 2%) , le mélange a été incubé a l'obscurité pendant 1h et la lecture a été effectuée à 415 nm par un spectrophotomètre UV-VIS. Les concentrations des Flavonoïdes sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par un milligramme d'extrait sec (μ g EQ/mg d'extrait).

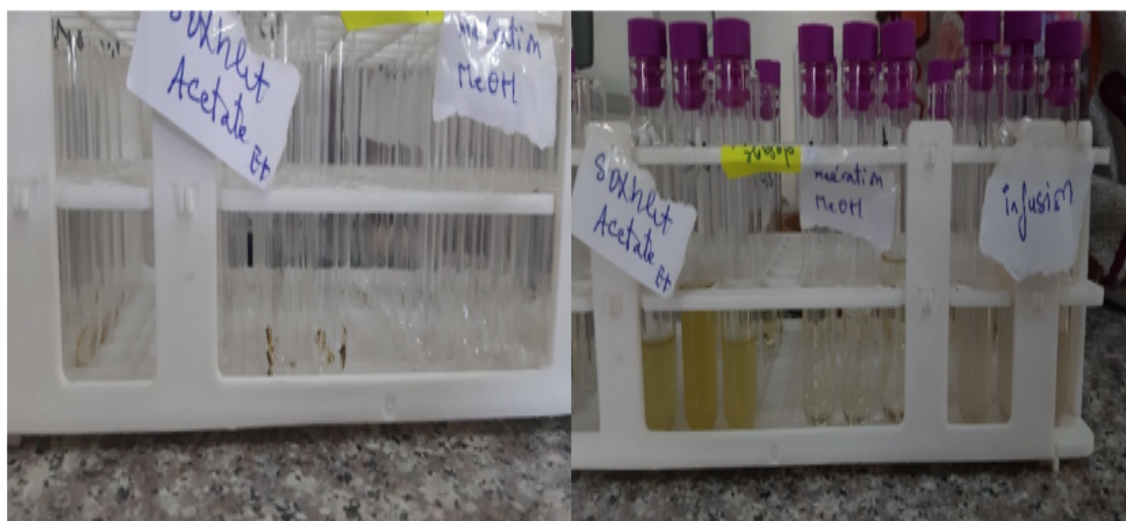


FIGURE 2.13 : dosage des Flavonoïdes (TFC).

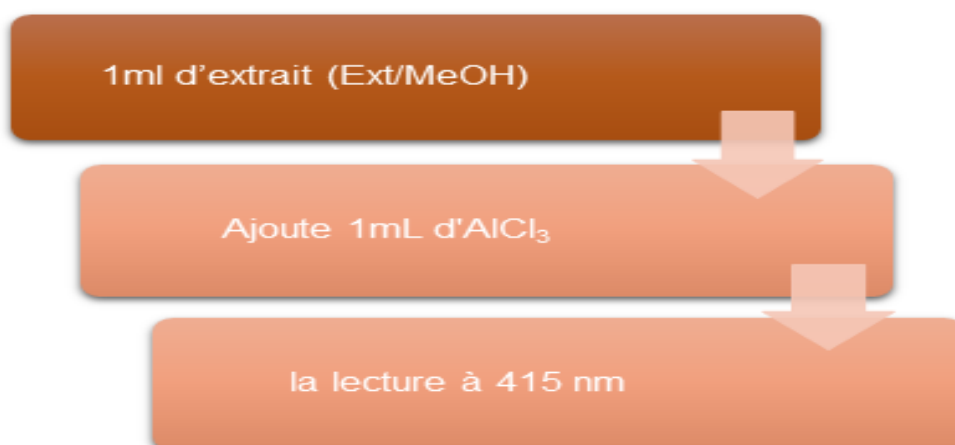


FIGURE 2.14 : Différentes étapes du dosage des Flavonoïdes (TFC).

2.4.4 L'activité biologique

Activité antibactérienne

Pour caractériser l'activité antibactérienne de les extraits de l'espèces étudiée, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur gélose. C'est une technique qualitative basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition apparents autour des disques chargés d'extrait végétaux.

Les souches bactériennes : Toutes les souches proviennent de l'institut Pasteur à M'sila.

- Staphylococcus aureus : ATCC 29523
- Pseudomonas aeruginosa : ATCC 27853
- Escherichia coli : ATCC 29522

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur la gélose (MHA) nutritive en favorisant leur croissance pendant 24 h à l'obscurité à 37°.

Après l'incubation, 4 à 5 colonies bien isolées sont transférées à l'aide d'une anse de platine dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile est déposé sur la surface des boites de pétri contenant de la Gélose. Un étalement de ce volume est effectué à l'aide d'un écouvillon stérile, en tournant la boite à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. Les disques de papier WATMAN (6mm) imprégnés d'une quantité définie 200 μ l de chaque extrait sont déposés à la surface du milieu gélosé préalablement ensemencé par les bactéries. Puis, les boites sont incubées à 4°C pendant 4 h pour permettre une bonne diffusion du surnageant. Ensuite l'incubation est faite à 37°C pendant 24 h. L'activité antibactérienne est révélée par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques. La lecture : Toute activité antibactérienne se manifesterait par la formation d'un diamètre d'inhibition qui sera alors mesuré en mm avec une règle.

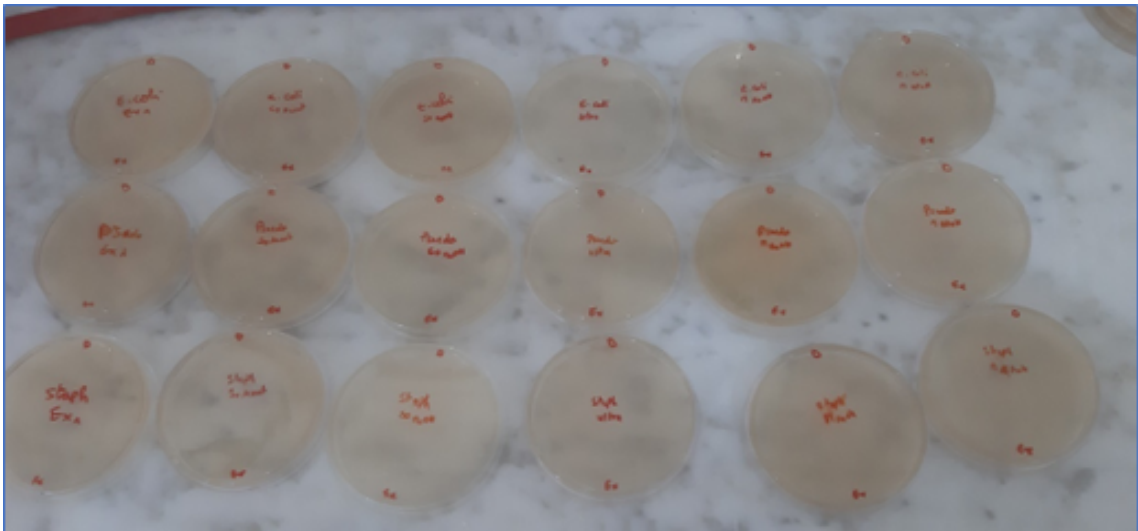


FIGURE 2.15 : Boîtes de Pétri des trois souches bactériennes utilisées après incubation.

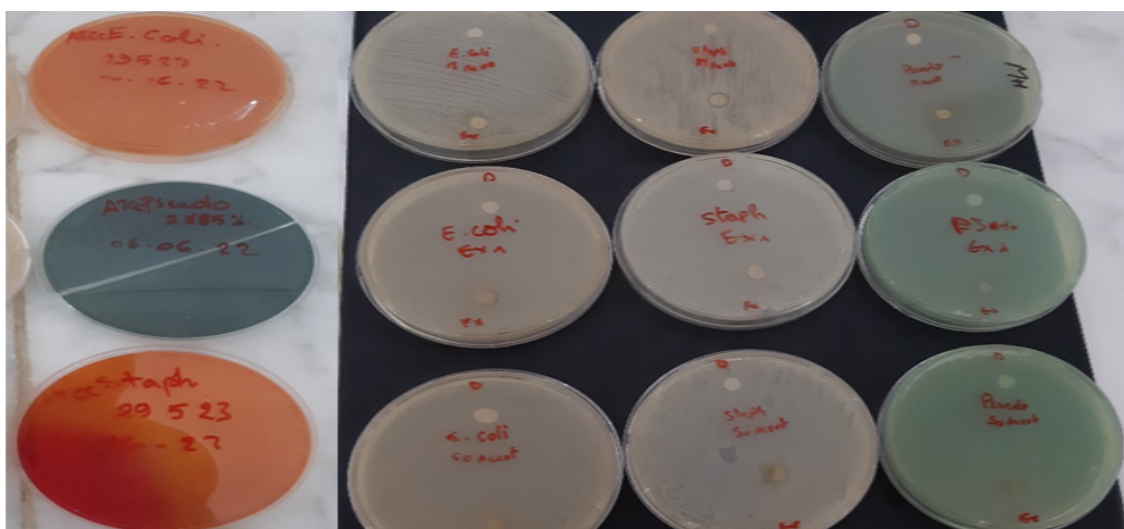


FIGURE 2.16 : Préparation de l'inoculum des extraits

Résultats Et Discussions

3.1 Détermination du rendement d'extraction

Le rendement se réfère à la masse de l'extrait déterminée après l'évaporation du solvant organique, il est calculé selon l'équation suivante et exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction :

$$R = (MO/MP) \times 100,$$

où

- MO : la masse de l'extrait obtenu.
- MP : la masse de la matière végétale sèche.

Matière Végétale	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
50 g	Macération MeOH	12	24.8
	Macération EtOH	13.42	26.36
	Infusion H_2O	9.38	18.76
	Soxhlet MeOH	12.44	24.88
	Ultrason MeOH	5.88	11.76
20 g	Soxhlet AcOEt	3.45	17.25

TABLE 3.1 : Les Rendements des Extraits

3.2 Screening phytochimique

Les résultats de cette étude indiquent que les extraits de la plante *Linaria gharbensis* contiennent plusieurs classes de métabolites secondaires. Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

Les métabolites secondaires	Saponines	Flavonoïdes	Triterpenoids	Glycosides cardiaques	Anthraquinones
L'extrait (soxhlet MeOH)	-	+++	++	++	-

TABLE 3.2 : Les Résultats du Screening

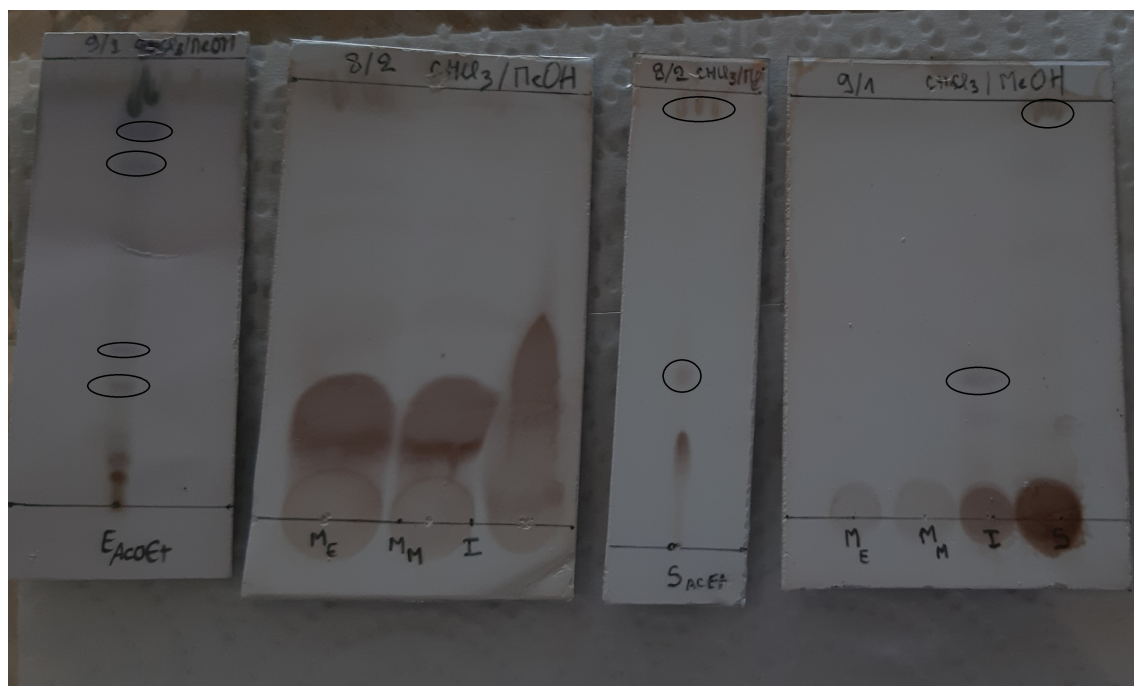
(+++): Forte présence. (++) : Présence moyenne. (-) : Absence.

Lecture des résultats :

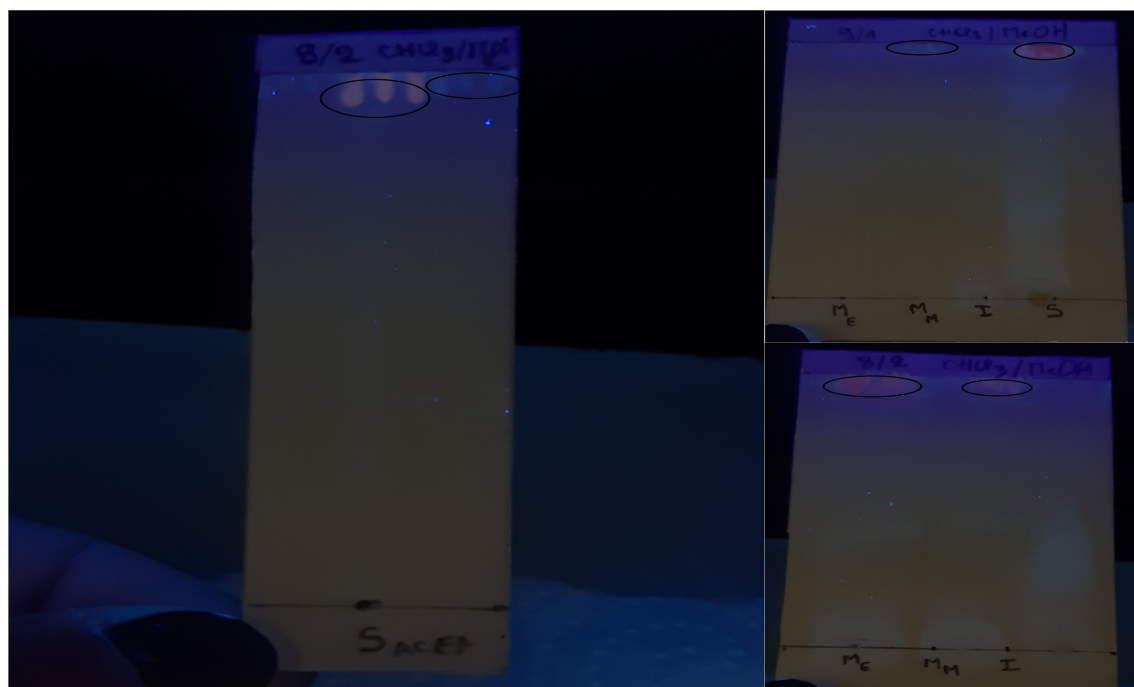
- L'observation d'une présence forte des flavonoïdes chez l'espèce étudiée, ce qui est déjà en parallèle avec la littérature où le genre *Linaria* est connu pour la présence de différentes structures de types Flavonoïdes (Widyowati.2016, [44]).
- Une présence remarquable des triterpenoids et glycosides cardiaques, si en cherche dans la bibliographie du genre *Linaria*, on trouve quelques espèces qui contiennent ces 2 classes telle que *linria vulgaris* (Hua H.2000 [53]), *linaria japonica* (Smirnova.1974, [47])
- L'absence des saponines et anthraquinones dans notre plante.

3.3 Screening CCM

Pour avoir une idée sur les différentes classes de métabolites secondaires présente dans l'extrait de l'espèce étudiée, une analyse avant (sous lumière UV à 254nm et à 362nm) et après révélation (révélateur chimique), a été réalisée. Quelques couleurs ont été observées :

FIGURE 3.2 : Plaque CCM des extraits de *L. garbensis* avant révélation.

↓

FIGURE 3.3 : Plaque CCM des extraits de *L. garbensis* après révélation.

L'absorption des substances flavoniques sous lumière de Wood à la longueur d'onde de $365nm$ donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique.

La fluorescence	Les structures possibles
Violette Noir	Flavones avec 5, 6,7 ou 5,7, 8 trihydroxy flavone Flavonol avec 3-OR. Chalcones.
Blue	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Jaune ou Jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-Vert	Aurone
Jaune-Blue	Flavanone sans 5-OH

TABLE 3.3 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.

Selon les données citées dans le tableau précédent, nous constatons que la plante a la possibilité de posséder les structures suivantes :

Les tâches fluorescentes	Les structures envisageables
Orange fluorescente	Isoflavones
Bleu	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 /flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Bleu-verdâtre	Flavonone sans 5-OH

TABLE 3.4 : Identification de la coloration par les structures flavoniques Possible.

3.4 Dosage Polyphénols et les Flavonoïdes

3.4.1 Les Polyphénols

Les résultats numériques des tests (des expériences) sont regroupés dans le tableau suivant :

Extraits	Teneur ($\mu\text{gEAG}/\text{mgEE}$)	Extraits	Teneur ($\mu\text{gEAG}/\text{mgEE}$)
Macération EtOH	28.649 ± 8.911	Soxhlet AcOAt	29.826 ± 5.297
Macération MeOH	24.895 ± 2.074	Ultrason MeOH	34.350 ± 5.873
Soxhlet MeOH	28.649 ± 8.911	Infusion H_2O	32.503 ± 3.474

TABLE 3.5 : Teneur en polyphénols (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm écart-types).

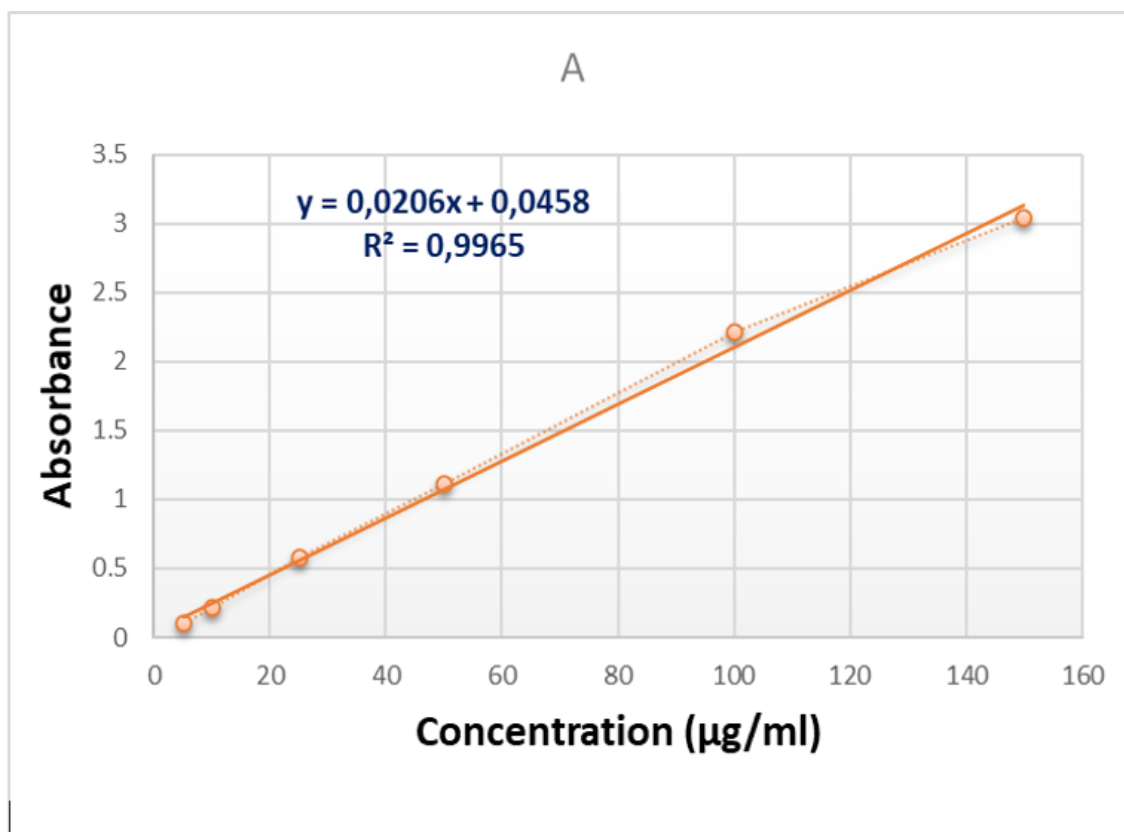


FIGURE 3.4 : La courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Des mesures de densité pour chaque extrait sont réalisées à $760nm$ pour les polyphénols. La courbe d'étalonnage d'acide gallique $y = 0.0096x + 0.0995$, $R^2 = 0.9973$, Figure 3.4, nous a permis d'exprimer la teneur en composés phénoliques pour chaque extrait étudié. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent en acide gallique par milligramme d'extrait Table 3.5.

Les résultats obtenus ont montré une richesse en phénols totaux notamment pour les extraits méthanolique Soxhlet et Ultrason suivi par les autres extraits qui ont donnés des résultats modérés. On déduit que le contenu phénolique dans les extraits examinés, dépend de la polarité du solvant utilisé pour l'extraction.

3.4.2 Les Flavonoïdes

Les résultats numériques des tests (des expériences) sont regroupés dans le tableau suivant :

Extraits	Teneur ($\mu\text{gEAG}/\text{mgEE}$)	Extraits	Teneur ($\mu\text{gEAG}/\text{mgEE}$)
Macération EtOH	17.0178 ± 0.4279	Soxhlet AcOAt	42.1246 ± 3.4115
Macération MeOH	11.70 ± 0.6939	Ultrason MeOH	34.013 ± 4.365
Soxhlet MeOH	29.674 ± 2.395	Infusion H_2O	15.911 ± 0.8599

TABLE 3.6 : Teneur en flavonoïdes (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm écart-types)

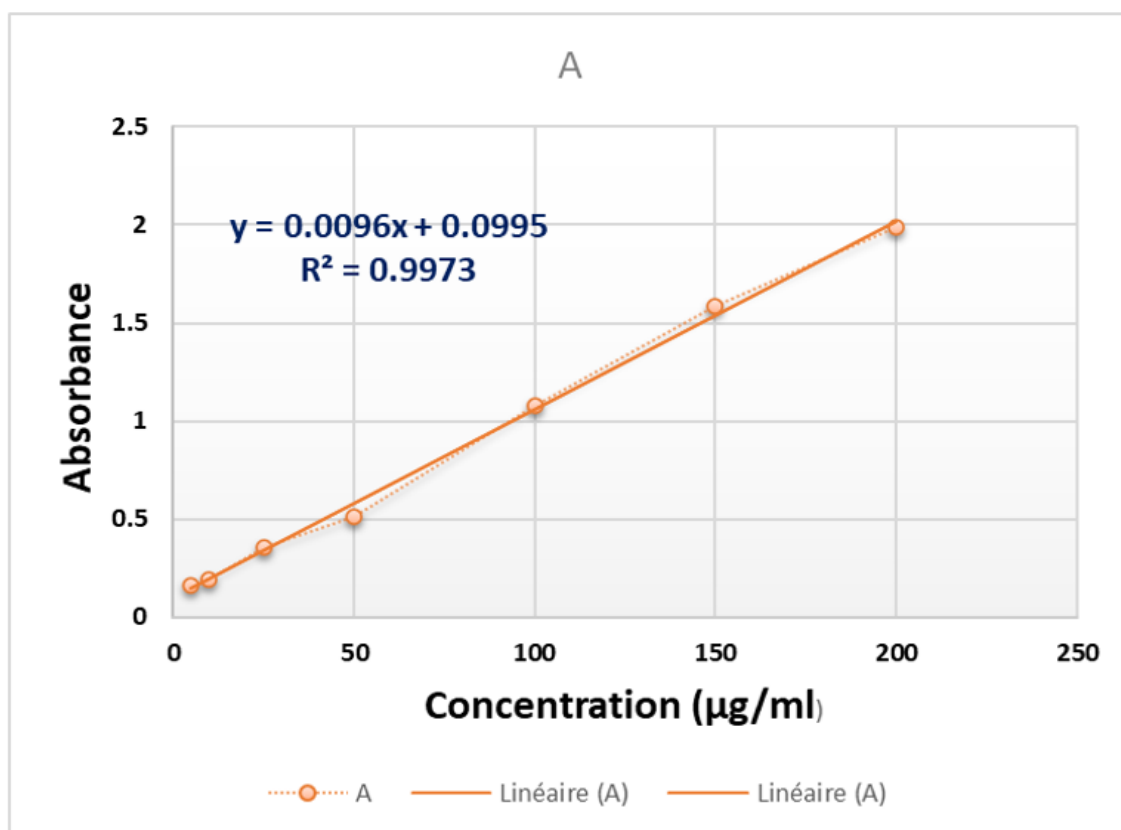


FIGURE 3.5 : La courbe d'étalonnage de la quercétine.

Des mesures de densité pour chaque extrait sont réalisées à $415nm$ pour les flavonoïdes. La courbe d'étalonnage de Quercétine $y = 0.0206x + 0.0458$, $R^2 = 0.9965$ nous a permis de déterminer la teneur en Flavonoïdes totaux pour chaque extrait de 6 extraits étudiés. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent en Quercétine par milligramme d'extrait 3.6.

Les valeurs obtenues ont montré que l'extrait AcEOt Soxhlet a présenté des valeurs intéressantes suivi par l'extrait méthanolique ultrason tandis que les autres extraits ont présenté des quantités modérées à faibles.

3.5 L'activité Biologique

3.5.1 L'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à $37^{\circ}C$. Les résultats obtenus sont

représentés dans le tableau suivant :

Extraits \ Souches	Infusion	Soxhlet MeOH	Soxhlet AcOAt	Macération EtOH	Macération MeOH	Ultrason MeOH
E. Coli	0	0	0	0	0	0
Staph	0	0	0	0	8.1	6.8
Pseudo	0	0	0	7.1	0	0

TABLE 3.7 : Diamètre de la zone d'inhibition (mm) des extraits de *Linaria gharbensis*.

Nous avons étudié l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis plusieurs souches de références. Les tests que nous avons effectués montrent que les souches : "E. coli ATCC 29522, S. aureus ATCC 29523, P. aeruginosa ATCC 27853" Ne présente pas de sensibilité vis-à-vis :

- Les différents extraits étudiés sauf l'extrait éthanolique qui a une activité moins efficace avec une zone d'inhibition de 7.1mm contre Pseudomonas
- L'extrait méthanolique par ailleurs a une activité moins efficace avec une zone d'inhibition de 8.1mm contre Staphylococcus.
- Une activité faible de l'extrait d'ultrason contre le staph avec la zone d'inhibition de 6.8mm.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons présumer que la plante n'a pas une activité antibactérienne.

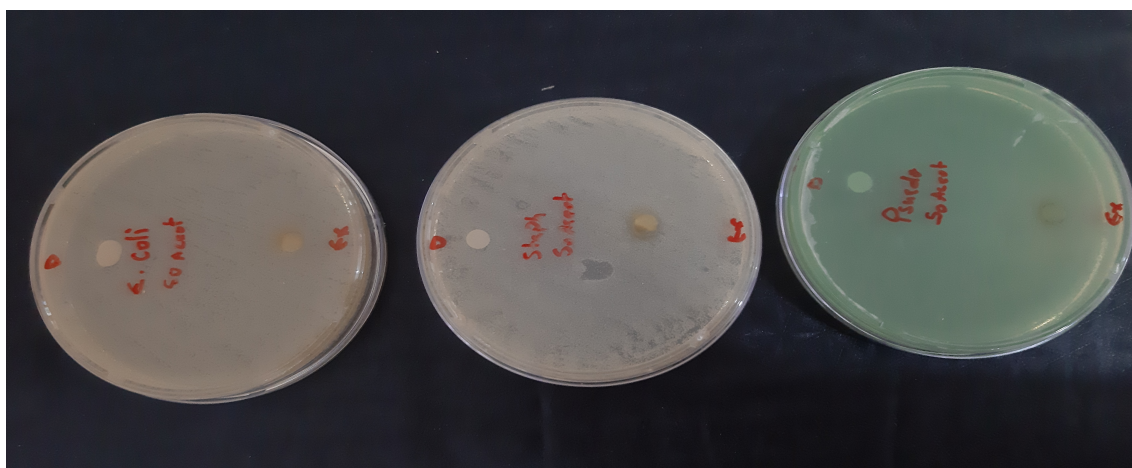


FIGURE 3.6 : L'activité antibactérienne des extraits-Soxhlet AcEOT-

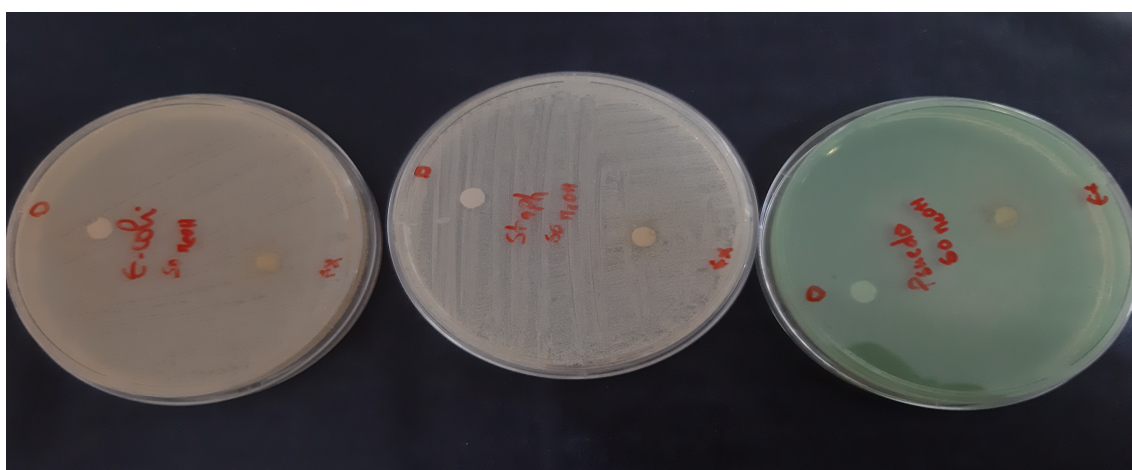
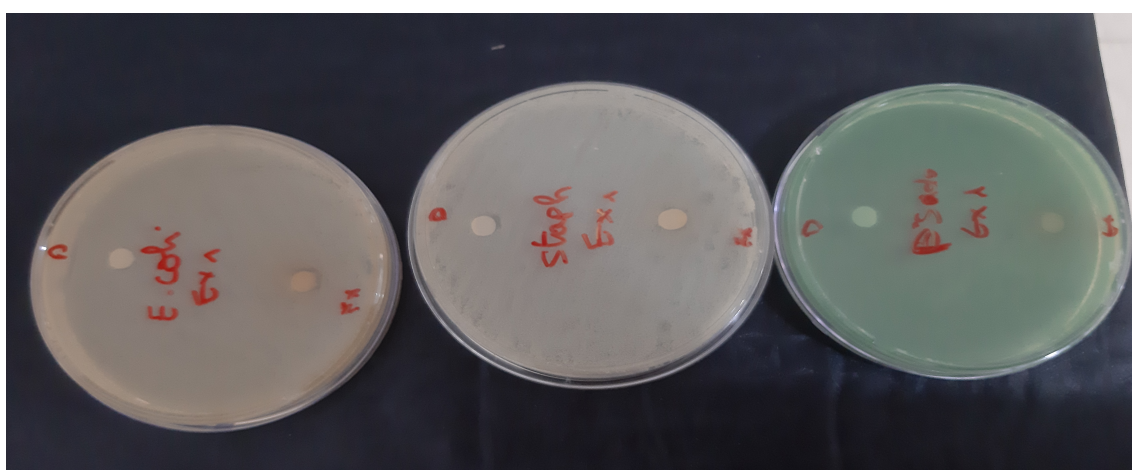


FIGURE 3.7 : L'activité antibactérienne des extraits-Soxhlet MeOH-

FIGURE 3.8 : L'activité antibactérienne des extraits-Infusion H_2O -

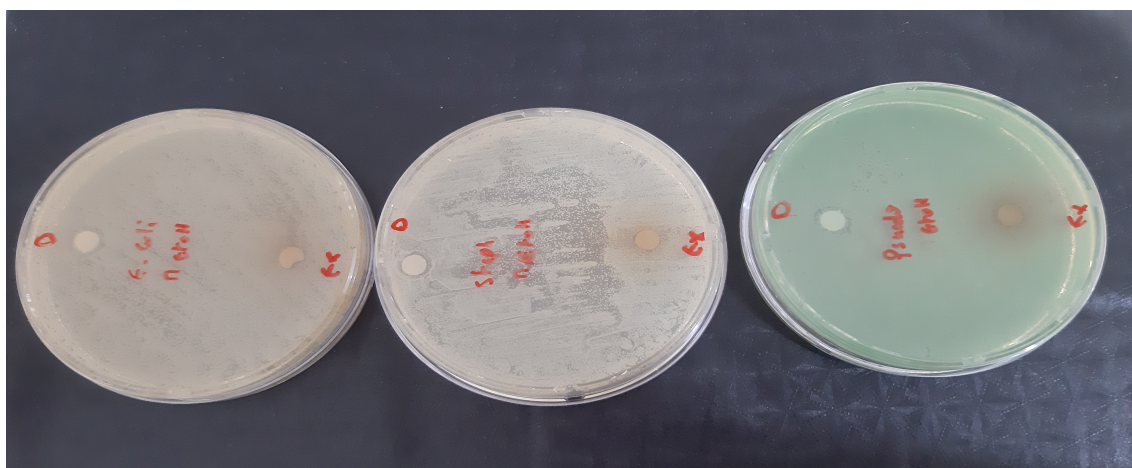


FIGURE 3.9 : L'activité antibactérienne des extraits-Macération EtOH-

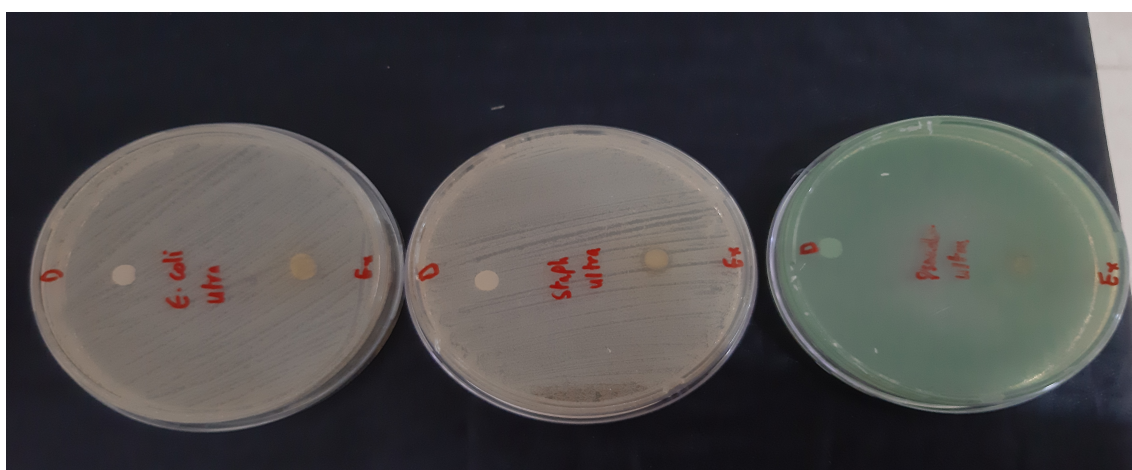


FIGURE 3.10 : L'activité antibactérienne des extraits-Ultrason MeOH-

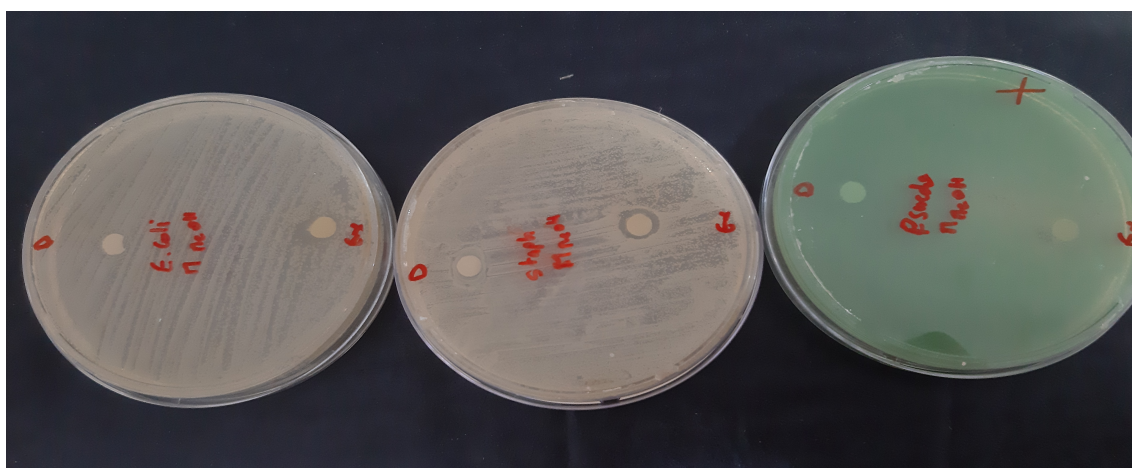


FIGURE 3.11 : L'activité antibactérienne des extraits-Macération MeOH-

3.6 Comparaison entre les extraits

Parmi tous les résultats des études précédents on peut les conclues comme suit :

- L'extrait qui a le meilleur rendement : hydro-éthanolique.
- L'extrait qui est le plus riche en polyphénols : méthanolique soxhlet.
- L'extrait qui est le plus riche en flavonoïdes : soxhlet d'acétate

On peut dire que la meilleure méthode d'extraction dans notre cas est celle de soxhlet.

Conclusion

L'étude phytochimique menée sur *L.gharbensis* a permis l'obtention des résultats suivants :

Du point de vue du rendement, cette expérimentation a permis de : Déterminer le solvant d'extraction par Soxhlet le plus efficace dans notre étude.

Cette espèce est riche en composés phénoliques notamment les flavonoïdes, qui sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirale, anti inflammatoire et anticancéreuse.

Contrairement à ce résultat positif, l'activité biologique étudiée sur les extraits montre que l'espèce a une activité antibactérienne non significative (une efficacité faible).

Ainsi nous pouvons résumer la nature des perspectives de recherche :

Cette étude ouvre les portes pour une investigation plus avancée dans cette direction de recherche concernant d'autres propriétés de cette plante.

Étude d'autres activités biologiques ; antifongique, antibiologique (in vivo et in vitro),..

Bibliographie

- [1] <https://www.britannica.com/plant/toadflax>.
- [2] Mabberley D.J., Mabberley's. *plant-book. A portable dictionary of plants, their classification and use*. Cambridge University Press, third edition, 2008, p1 021 (livre guide Illustré De La Flore Algérienne).
- [3] Frezza C., Venditti A., Marcucci E., Parroni A., Reverberi M., Serafini M., Bianco A. *Phytochemical analysis of Linaria purpurea (L.) Mill and inhibitory activity on the production of aflatoxin B1 (AFB1) in Aspergillus flavus Link. of one of its metabolites, antirrhinoside*. Industrial Crops and Products 139 p : 111554, (2019).
- [4] Cheriet Th., Hanfer M., Mancini I., Benelhadj S., Laouas N., Ameddah S., Menad A. et Seghiri R. *Anti-inflammatory and hemostatic effects of Linaria reflexa Desf.* Natural Product Research. 35 :16, 2778-2783. (2021).
- [5] Quezel P., Santa S. *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Vols. 1-2, Ed. CNRS, Paris, France, 1963.

- [6] Secmen Ö., Gemici Y., Görk G., Bekat L., Leblebici E. *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. Égée Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi, VI. Baskı, Ege Üniv. Basımevi, Izmir, No 116 (2000).
- [7] Pignatti S. *Flora D'Italia; Edagricole*. Ed. Bologna, 542-543, Italy, 1982.
- [8] Rocio J., Julio P., Inmaculada F. *Morphological and anatomical studies of Linaria species from South-west Spain : Seeds*. Annals of Botany. 84 p : 11-19. (1999).
- [9] Guarino C., L. De Simone and S. Santoro, *Ethnobotanical study of the Sannio area*. Campania, southern Italy. 2008
- [10] Rao S.R. et Ravinshankar G.A. *Biotechnology Advances*. Vol 20, 101-153, (2002).
- [11] Morita N. Morita N., Shimizu M, Arisawa M., Kobayashi K. *The components of leaves of Linaria japonica MIQ. and L. vulgaris Mill. (Scrophlariaceae)*. Studies on medicinal resources. XXXVII. (author's transl). Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 94(8) : pp. 913-916, (1974).
- [12] Kitagawa I., Yoshihara M. and Kamigauchi T. *Linarienone, a new cis-clerodane-type diterpene from the subterranean part of Linaria japonica Miq.* Tetrahedron Lett. 14 p : 1221-1224 (1977).
- [13] Niwa K. et al. *Linaburiosides A-D, acylated iridoid glucosides from Linaria buriatica*. *Phytochemistry*. 171 : p. 112247, (2020).
- [14] Nafis A., Saad F. E., Khalloufi F. E., Kasrati A., Abbad A., Mezrioui N. et Hassani L. *New insight into antimicrobial activities of Linaria ventricosa essential oil and its synergetic effect with conventional antibiotics*. Archives of Microbiology, 203(7), p : 4361-4366, (2021).
- [15] <https://www.bgci.org/files/JBF/images/livreguideIllustréDeLaFloreAlgérienne.pdf>

- [16] Hanfer M. et al. *Modulation of liver glutathione-dependent enzymes and steatosis by Linaria tingitana in sodium valproate-treated rats*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 24(2) : p. 173-184 (2018).
- [17] Hanfer M. et al. *Phytochemical screening, in vitro antimicrobial and antioxidant properties of Linaria tingitana Boiss. & Reut.* Int J Pharm Sci Rev Res. 38 : p. 135-140 (2016).
- [18] Ahmed-Chaouch M., Cheriet Th., Beretta G., Sarri D., Bensouici Ch., Ouelbani R., Mancini I., Sekhara I. et Seghiri R. *Chemical composition, in vitro antioxidant, anti-cholinesterase and antibacterial activities of Linaria scariosa Desf.* Natural Product Research, Volume 35, Issue 10, p : 1722-1726, (2019).
- [19] Gordaliza M., Miguel Del Corral JM., de la Paente LM., Garcia-GrÃavalos MD. San Feliciano A., *Cytotoxic activity of neo-clerodane diterpenoids*. Bioorg. Med. Chem. Lett. Vol 7 (13), p : 1649-1654 (1997).
- [20] Benrezouk R., Terencio MC., FerrÃndiz ML. S., Feliciano A., Gordaliza M., Miguel del C. JM. *de la Puente ML. Alcaraz MJ.* Pharmacology Lett. Vol 64. 205-211 (1999).
- [21] Cheriet Th., Hanfer M., Mancini I., Benelhadj S., Laouas N., Ameddah S., Menad A. et Seghiri R. *Anti-inflammatory and hemostatic effects of Linaria reflexa Desf.* Natural Product Research.(2019).
- [22] Cheriet T., Mancini I., Seghiri R., Benayache F., & Benayache S. *Chemical constituents and biological activities of the genus Linaria(Scrophulariaceae)*. Natural Product Research, 29(17), 1589-1613, (2015).
- [23] Jung U. et al. *Cosmetic composition containing Linaria japonica extract with antioxidant and antiinflammatory effects*. Repub Korea, 782972 (2007).
- [24] Kanji N., Ren Yi, Naonobu T., Shindai K., Daisuke T., Sang-Yong K., Ariuntuya T., Perleidulam B., Kazuyoshi K., Mareshige K., Davaadagva D., Kohji I. and Yo-

- shiki K. *Linaburiosides AâĽŠD, acylated iridoid glucosides from Linaria buriatica*. *Phytochemistry*, Volume 171, p : 112247, (2020).
- [25] Ahmed-Chaouch, M., et al., Chemical composition, in vitro antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Linaria scariosa* Desf. *Natural product research*, p. 1-5 (2019).
- [26] Venditti A. et al. *Terpenoids of Linaria alpina (L.) Mill. from Dolomites*. Italy. *Natural product research*, 29(21), p : 2041-2044 (2015).
- [27] Cheriet T. et al. *Glycosyl flavonoid profile, in vivo antidiabetic and in vitro antioxidant properties of Linaria reflexa Desf.* *Natural product research*, 31(17), p : 2042-2048 (2017).
- [28] Kashiwada Y. et al. *Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid pomolic acid and structurally related triterpenoids*. *Journal of Natural Products*, 61(9) p : 1090-1095 (1998).
- [29] Bianco A, Guiso M, Martino M, Nicoletti M, Serafini M, Tomassini L, Mossa L, Poli F. *Iridoids from endemic Sardinian Linaria species*. *Phytochemistry*. 42 p : 89-91 (1996).
- [30] Otsuka H. *Iridoid mono- and diesters of D-glucopyranose from Linaria japonica*. *Phytochemistry*, 39 p :1111-1114 (1995).
- [31] Otsuka H. *Iridolinarins A, B, and C : iridoid esters of an iridoid glucoside from Linaria japonica*. *J. Nat.Prod.* 57 p :357-362 (1994).
- [32] Otsuka H. *Iridoid glucosides from Linaria japonica*. *Phytochemistry*. 33 p : 617-622 (1993).

- [33] Kouichi M., Takashi T., Isao K., Toshihiro F., Yuki Y. and Kanji I. *New iridoid diesters of glucopyranose from Linaria canadensis* (L.) Dum. J. Nat. Med. 65 p :172-175 (2011).
- [34] Bianco, A., Passacantilli P. and Polidori G. *8-Epiloganic Acid and 7- β -Hydroxy-8-Epiiridodial Glucoside*. Planta medica, 46(09) p : 38-41 (1982).
- [35] Ilieva E. et al. *Iridoid and flavonoid glycosides from Linaria species*. Bulg Chem Commun, 25 p : 400-406 (1992).
- [36] Esposito P, Scarpati ML. *Iridoids. IX. 10-O- β -glucosylaucubin from Linaria vulgaris*. Gazzetta Chimica Italiana.100 p : 836-845 (1970).
- [37] Degot AV, Fursa NS, Zaitsev VG, Chaika EA, Popova TP, Litvinenko VI, and Kornievskii YI *Study of Linaria macroura*. Chem. Nat. Comp. 3 p : 388-389 (1983).
- [38] Bianco A., Guiso M., Procaccio C., Nicoletti M., Serafini M. and Tomassini L. *Iridoids in the flora of Italy. 8. A new methyl-cyclopentanoid monoterpene from Linaria purpurea*. Gazzetta Chimica Italiana. 127 p : 407-409 (1997).
- [39] Guiso M., Tassone G., Nicoletti M., Serafini M. et Bianco A. *Chemotaxonomy of iridoids in Linaria vulgaris*. Nat. Prod. Res. 21, p :1212-1216 (2007).
- [40] Bianco A., Guiso M., Iavarone C., Passacantilli P. and Trogolo C. *Iridoids. XXIV. Linaride (10-deoxyaucubin), a new iridoid from Linaria muralis*. Gazzetta Chimica Italiana. 107 p : 83-85 (1977).
- [41] Ghedira K. *Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique*. Phytothérapie. 04 p : 162-169 (2005).
- [42] Ren W., Qian Z., Wang H., Zhu L. and Zhang L. *Flavonoids :Promising anticancer agents*. Med Res. Rev., 23 p : 519-534 (2003).

- [43] Hua H., Sun J. and Li X. *Flavonoids from yellow toadflax (Linaria vulgaris)*. Chin. Trad. Herb. Drugs. 30 p : 332-334 (1999).
- [44] Widyowati R., Sugimoto S., Yamano Y., Sukardiman Y., Otsuka H. and Matsunami K. *New isolinariins C, D and E, flavonoid glycosides from Linaria japonica*. Chem. Pharm. Bull. 64 p : 517-521 (2016).
- [45] Pethes E., Marczal G., Kery A. and Petho M. *Flavonoids as biologically active agents and their occurrence in the Scrophulariaceae family*. Acta Pharmaceutica Hungarica. 44 p : 83-90 (1974).
- [46] Ercil D., Sakar MK., Del Olmo E. and San Feliciano A. *Chemical constituents of Linaria aucheri*. Turk. J. Chem. 28 p : 133-139 (2004).
- [47] Smirnova LP., Boryaev KI. and Ban'kovskii AI. *Acacetin and its glycosides in plants of the genus Linaria*. Chem. Nat. Comp. 10 p : 96-97 (1974).
- [48] Otsuka H. *Isolation of isolinariins A and B, new flavonoid glycosides from Linaria japonica*. J. Nat. Prod. 55 p : 1252-1255 (1992).
- [49] Tundis R., Deguin B., Loizzo MR., Bonesi M., Statti GA., Tillequin F. and Menichini F. *Potential antitumor agents : Flavones and their derivatives from Linaria reflexa Desf.* Bioorg Med Chem Lett. 15 p : 4757-4760 (2005).
- [50] Rzadkowska-Bodalska H., Kowalczyk-Ohem B. and Lamer-Zarawska E. *Chemical and biological investigation of lipophilic fraction of Linaria vulgaris Mill. (Scrophulariaceae)*. Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Sci. 43 p : 179-184 (1996).
- [51] Kitagawa I., Yoshihara M., Tani T. and Yosioka I. *Linaridial, a new cis-clerodane-type diterpene dialdehyde, from Linaria japonica*. Tetrahedron Lett. 1 p : 23-26 (1975).

- [52] Kitagawa I., et al. *On the constituents of Linaria japonica Miq. I. The structure of linarioside, a new chlorinated iridoid glucoside and identification of two related glucosides*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 21(9) : pp. 1978-1987 (1973).
- [53] Hua H., Hou B., Li W., Li X. and Zhang Y. *Triterpenes from butter-and-eggs (Linaria vulgaris)*. Chin. Tradit. Herb. Drugs. 31 p : 409-412 (2000).
- [54] Vesoul J. and Cock I. E. *Examination of the Medicinal Potential of Pittosporum Phylliraeoides : Toxicity, Antibacterial and Antifungal Activities*. Pharmacognosy Communications, V. 1, Issue 2, p : 8-17 (2011).