

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 MICROBIOLOGIE  
ET BIOCHIMIE

N° :



DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET  
DE VIE

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique**

**Par**

**GUERBAS Firdaws , KHERIFI Salima**

**Intitulé**

**Evaluation des activités antioxydante et  
antimicrobienne des extraits éthanolique et  
aqueux de *Teucrium polium* L.**

**Soutenu devant le jury composé de:**

M<sup>me</sup> BOUAZIZ Samia

M<sup>f</sup> HENDEL Noui

M<sup>f</sup> KHERBACHE Abdallah

MAA - UMB –M'sila

MCB - UMB –M'sila

MAA - UMB –M'sila

Présidente

Rapporteur

Examineur

Soutenu publiquement le : 14/07/2019 à 13H00

Année universitaire : 2018 /2019



# *Dédicace*

*Je dédie ce travail*

*Aux êtres les plus chers : Mes parents,*

*A MON PERE,*

*Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller  
toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras.*

*J'espère que cette thèse sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit  
l'accomplissement de tous tes efforts*

*A MA MERE,*

*Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité,  
son écoute permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus  
difficiles de ma vie*

*A mes chers frères : Taqy , Moumene et le petit Mounir*

*Ames chères sœurs : Djehad, Assia, Maria et la petite Ikram*

*A mes amis et collègues : Hadjer, Marwa, Zahra, Siham, Anwaar, Imane,  
ELroumaissa, Fatima, Ibtissam, Ourida*

*A ma partenaire : Firdaws*

*Salima*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail*

*A mes Parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude*

*Pour leur soutien tout le long de mes études*

*A ma Sœur Lina et la petite Nouha*

*A mes Frères Rafiq Mohammed et Adnane*

*A toute ma famille, proche ou éloignée*

*À mes Amis*

*Un grand Merci au chef de service et toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie  
et de Biochimie de l'université de Mohamed Boudiaf M'SILA et à tous ceux qui ont  
participé de près ou de loin à ce travail.*

*Firdaws*



## *Remerciements*

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience*

*Mes vifs remerciements vont au **Dr HENDEL Noui** sa précieuse participation et son soutien à tout moment.*

*Sa validité, ses grandes qualités scientifiques et humaines ont contribué au bon déroulement de ce travail. Ses critiques et ses compétences étaient fortes rassurantes.*

*Nous remercions les membres du jury d'avoir accepté de juger notre modeste travail :*

M<sup>me</sup> BOUAZIZ Samia

Mr. KHERBACHE Abdallah

*Nous remercions également tous les membres des laboratoires de Biologie de M'sila particulièrement M<sup>elle</sup> BAALI Faiza*

*Qui nous ont beaucoup aidés à réaliser ce travail dans des bonnes conditions.*

---

# Sommaire

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction .....	01

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les métabolites secondaires .....	02
1.1. Les polyphénols.....	02
1.1.1. Structure et classification.....	02
1.1.2. Activités biologiques .....	02
1.2. Les flavonoïdes.....	03
1.2.1. Structure et classification. ....	03
1.2.2. Propriétés biologiques.....	04
1.3. Les huiles essentielles.....	04
1.3.1. Composition chimique.....	04
1.3.2. Activités biologiques.....	05
2. Activités biologiques des plantes.....	05
2.1. Activité antioxydante.....	05
2.1.1. Radicaux libres et stress oxydatif.....	05
2.1.2. Les antioxydants.....	06
2.2. Activités antimicrobiennes.....	06
2.2.1. Bactéries et mycètes.....	06
2.2.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	07
2.2.3. Mode d'action des agents antimicrobiens. ....	07
3. Plante étudiée.....	07
3.1. Habitat et distribution géographique.....	08
3.2. Description botanique.....	08
3.3. Position systématique.....	09
3.4. Usages.....	09
3.5. Phytochimie .....	09

## Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Matériel végétal.....	10
2. Procédés d'extraction.....	10
2.1. Extraction éthanolique par macération.....	10
2.2. Extraction aqueuse par décoction .....	10
3. Dosage des composés phénoliques.....	11
3.1. Dosage des polyphénols.....	11
3.2. Dosage des flavonoïdes.....	11
4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	12
4.1. Test de DPPH.....	12
4.2. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène.....	12
5. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	13
5.1. Microorganismes testés.....	13
5.2. Préparation de l'inoculum .....	13
5.3. Activité antibactérienne .....	14
5.3.1. Test des puits de diffusion.....	14
5.4. Activité antifongique .....	14
5.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	15
6. Analyse statistique.....	16

---

---

### Chapitre III : Résultats et discussion

1.	Rendement de la plante.....	17
2.	Dosage des composés phénoliques de la plante.....	17
3.	Activité antioxydante.....	18
3.1.	Test de DPPH.....	18
3.2.	Test de blanchiment de $\beta$ -carotène.....	19
4.	Activité antimicrobienne.....	20
4.1.	Activité antibactérienne.....	20
4.2.	Activité antifongique.....	22
4.3.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	23
Conclusion .....		25
Références bibliographiques .....		26
Annexe.....		32

---

## ملخص

تنتمي نبتة *Teucrium polium* الى العائلة الشفوية *Lamiaceae* وهي نبتة طبية واسعة الاستعمال في الطب التقليدي. قد قدر مردود الاجزاء الهوائية الخاضعة للاستخلاص الايثانولي عن طريق النقع بـ 13 % في حين اعطى الاستخلاص المائي عن طريق الغليان مردودا قدر بـ 16.4 %. حددت كمية متعدد الفينولات و الفلافونويدات باستخدام طريقة Folin-Ciocalteu و ثلاثي كلوريد الالمنيوم على التوالي. كانت نتائج المستخلص الايثانولي والمائي 74.91 - 103.93 ميكروغرام مكافئ حمض الجاليك/مغ و 30.22-80.18 مكافئ الكرستين/مغ على التوالي. تم تقييم النشاط المضاد للأوكسدة بواسطة اختبار تبييض بيتا كاروتين حيث قدرت  $IC_{50}$  بـ  $0.04 \pm 110$  و  $0.02 \pm 110$  ميكروغرام/مل بالنسبة للمستخلص الايثانولي و المائي على التوالي. كانت قيم التراكيز المثبطة لـ 50 % ( $IC_{50}$ ) من الجذر الحر DPPH  $0.002 \pm 40$  و  $0.00 \pm 44$  ميكروغرام/مل بالنسبة للمستخلص الايثانولي و المائي على التوالي. أبدى اختبار النشاط المضاد للجراثيم، على 9 سلالة بكتيرية غرام + وغرام - و 6 سلالات فطرية باستعمال طريقة الانتشار عن طريق الآبار، أن المستخلص المائي أثر تأثيرا مثبتا اهم بكثير من تأثير المستخلص الايثانولي. انتج كل من المستخلص الايثانولي والمائي نسب تثبيط مقبولة ضد الفطريات تراوحت بين 8.57 % و 73.34 % .

**كلمات مفتاحية:** *Teucrium polium* ، العائلة الشفوية ، المستخلص الايثانولي، المستخلص المائي، النشاط المضاد للأوكسدة، النشاط المضاد للجراثيم.

---

## Résumé

*Teucrium polium* L. est une plante médicinale qui appartient à la famille des Lamiaceae. Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle. Le but de ce travail est de déterminer la teneur de l'extrait éthanolique (EEth) et de l'extrait aqueux (EAq) de cette plante en polyphénols et en flavonoïdes ainsi que d'évaluer leurs activités antioxydante et antimicrobienne. Le rendement des parties aériennes, soumises à une extraction éthanolique par macération, était de l'ordre de 13% (w/w). L'extraction aqueuse des parties aériennes par décoction a donné un rendement de l'ordre de 16.4% (w/w). Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes, qui ont été déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium respectivement, de l'EEth et de l'EAq sont respectivement 103.93, 74.91 µg EAG/mg d'extrait et 80.18, 30.22 µg EQ/mg d'extrait. L'activité antioxydante a été réalisée par la méthode de décoloration du β-carotène/acide linoléique d'où les IC<sub>50</sub> de l'EEth et de l'EAq sont respectivement 110±0.04 µg/ml et 110 ±0.02 µg/ml ; et par le test de DPPH d'où les IC<sub>50</sub> de l'EEth et de l'EAq sont respectivement 40±0.002 µg/ml et 44±0.00 µg/ml. L'activité antimicrobienne a été déterminée pour 9 souches bactériennes (Gram+ et Gram-) et 06 champignons. Les méthodes des puits de diffusion et de microdilutions ont été appliquées pour évaluer cette activité. L'EAq de *T. polium* semble avoir une activité antimicrobienne plus importante que celle de l'EEth de la même plante. Alors que pour les champignons l'EEth de *T. polium* dans le test des puits de diffusion a exercé une inhibition importante sur les champignons testés avec un pourcentage d'inhibition qui varie de 8.57% à 73.34%.

**Mots clés** - *Teucrium polium*, *Lamiaceae*, extrait aqueux, extrait éthanolique, activité antioxydante, activité antimicrobienne

---

## Abstract

*Teucrium polium* L. is a medicinal plant belonging to the Lamiaceae family. It is widely used in traditional medicine. The aim of this work is to determine the polyphenol and flavonoid contents of the ethanolic and aqueous extract of this plant as well as to evaluate their antioxidant and antimicrobial activities. The plant aerial parts were subjected to ethanolic maceration and the It yielded in 13% (w/w). The aqueous extract yield was 16.4% by decoction of the aerial parts. The polyphenol and flavonoid contents were determined by the Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride methods respectively. The polyphenol and flavonoid contents of the ethanolic and aqueous extracts were respectively 103.93, 74.91  $\mu\text{gGAE/mg}$  of extract and 80.18, 30.22  $\mu\text{gQE/mg}$  of extract. Antioxidant activity was evaluated using  $\beta$ -carotene/linoleic acid system, where the  $\text{IC}_{50}$  values were  $110 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$  and  $110 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$  for the ethanolic and aqueous extract respectively. Free radical scavenging effect were evaluated using the free radical DPPH. The 50 percent inhibitory concentrations of DPPH ( $\text{IC}_{50}$ ) were  $40 \pm 0.002 \mu\text{g/ml}$  and  $44 \pm 0.00 \mu\text{g/ml}$  for the ethnolic and aqueous extract respectively. The antimicrobial activity of the extracts towards 9 bacterial strains (Gram<sup>+</sup> and Gram<sup>-</sup>) and 6 fungal strains was assessed using well diffusion and micro-well dilution assays. The aqueous extract of *T.polium* showed greater antimicrobial activity than the ethnolic one. For the molds, the applied *T. polium* extracts by well diffusion assay caused significant inhibition on most of the mold strains with inhibition percentage ranging from 8.57% to 73.34%.

**Key words** - *Teucrium polium*, Lamiaceae, aqueous extract, ethanolic extract, antioxidant activity, antimicrobial activity.

## Liste des abréviations

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection ;
<b>BHT</b>	Butylhydroxytoluène ;
<b>CMB</b>	Concentration minimale bactéricide ;
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice ;
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde ;
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ;
<b>EAG</b>	Equivalent en acide gallique ;
<b>EAq</b>	extrait aqueux ;
<b>EEM</b>	extrait méthanolique ;
<b>EEth</b>	extrait éthanolique ;
<b>EQ</b>	équivalent de quercétine ;
<b>ERN</b>	espèces réactives de l'azote ;
<b>ERO</b>	espèces réactives de l'oxygène ;
<b>GM</b>	Gentamicine ;
<b>HE</b>	huile essentielle ;
<b>I%</b>	pourcentage d'inhibition ;
<b>IC50</b>	concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition ;
<b>MHA</b>	Mueller-Hinton Agar ;
<b>PP</b>	Polyphénols ;
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar ;
<b>Ru</b>	Rutin ;
<b>TFT</b>	teneur en flavonoïdes totaux ;
<b>TPT</b>	teneur en polyphénols totaux ;

## Liste des figures

Figure 01 :	Schéma de phénols simples (C <sub>6</sub> ).....	02
Figure 02 :	Squelette moléculaire de base des flavonoïdes .....	03
Figure 03 :	<i>Teucrium polium</i> récoltée.....	08
Figure 04 :	Dispositifs d'extraction .....	10
Figure 05 :	Teneurs enTPT et TFT de l'EEth et l'EAq de <i>T. polium</i> .....	17
Figure 06 :	Pourcentages d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations de : (A) l'EEth de <i>T. polium</i> , (B) l'EAq de <i>T. polium</i> et (C) le BHT.....	18
Figure 07 :	Pourcentages d'inhibition du blanchiment de β-carotène en fonction des concentrations de: (A) l'EEth de <i>T. polium</i> , (B) l'EAq de <i>T. polium</i> et (C) le BHT.....	19
Figure 08 :	L'effet de l'EEth de <i>T. polium</i> (600mg/ml) sur les différentes souches testées .....	21
Figure 09 :	L'effet de l'EAq de <i>T. polium</i> (600mg/ml) sur les différentes souches testées .....	22
Figure 10 :	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne provoqué par l'EEth et l'EAq de <i>T. polium</i> au 7 <sup>ème</sup> jour d'incubation .....	23

## Liste des tableaux

Tableau 1:	Les valeurs IC <sub>50</sub> (µg/ml) de l'EEth, de l'EAq de <i>T. polium</i> et du standard dans le test de DPPH	18
Tableau 2:	Les valeurs IC <sub>50</sub> (µg/ml) de l'EEth, de l'EAq de <i>T. polium</i> et du standard dans le test de blanchiment de β-carotène .....	20
Tableau 3:	Diamètres des zones d'inhibition (mm) illustrant l'activité antibactérienne de l'EEth et l'EAq de <i>T. polium</i> , avec la Gentamicine GM (10µg/ disque) .....	21
Tableau 4:	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de l'EEth et de l'EAq de <i>T. polium</i> .....	24

# INTRODUCTION

## Introduction

La phytothérapie est le traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes, elle fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces. Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française comme une « drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses » (Mohammedi, 2013). L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour la fabrication des médicaments (Bouzid *et al.*, 2011).

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (Harrar, 2012).

Actuellement l'intérêt des recherches porte sur l'étude de molécules antioxydants naturelles qui agissent comme inhibiteurs des radicaux libres. Ceux-ci endommagent de nombreux composants cellulaires aussi divers que les protéines, les lipides ou l'ADN entraînant un stress oxydatif. Les capteurs de radicaux libres ont pour rôle de stopper ce processus en neutralisant ces composés très réactifs, pour réduire leur nocivité. D'autre part les métabolites secondaires sont dotés d'une activité antimicrobienne parce qu'ils peuvent entraîner des dommages considérables aux cellules microbiennes (Belmekki, 2009).

L'objectif de notre travail vise l'évaluation de quelques activités biologiques de *Teucrium polium* L., plante médicinale courante en Algérie. Cette étude cible le contenu polyphénolique de des extraits éthanolique et aqueux de cette plante, leur activité antioxydant au moyen des méthodes de DPPH et du  $\beta$ -carotène; et leur activité antimicrobienne sur quelques bactéries et champignons.

CHAPITRE I  
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Les métabolites secondaires

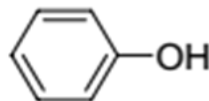
### 1.1. Les polyphénols

Les composés phénoliques, ou polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (Boizot et Charpentier, 2006).

Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux aux stress variés; donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (Macheix *et al.*, 2005).

#### 1.1.1. Structure et classification

Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, possédant un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (figure 1). La structure de ces composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). (Urquiaga et Leighton, 2000).



**Figure 1.** Schémas d'un phénol simple (C<sub>6</sub>).  
(Garcia *et al.*, 2010).

Les polyphénols sont répartis en plusieurs groupes

- Les phénols simples (C<sub>6</sub>): un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>).
- Les flavonoïdes (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>): 2 noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.
- Les tanins hydrolysable et non-hydrolysable.
- Les stilbènes (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>).

Les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phénylpropane (Balasundram *et al.*, 2006).

#### 1.1.2. Activités biologiques

Les composées phénoliques ont une valeur commerciale très importante surtout dans le domaine agroalimentaire et pharmaceutique en tant qu'antioxydants naturels puissants; ils

interviennent dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydatif. Leur intervention se fait assez souvent à plusieurs niveaux : piégeages de radicaux libres, chélation de métaux pro-oxydants par les groupements hydroxyles, et par inhibition de certains enzymes. Plusieurs études épidémiologiques et cliniques attestent le rôle incontestable des composés phénoliques dans l'inhibition des bactéries pathogènes voir même toxique, fongicide et antibiotique. Ces métabolites secondaires peuvent conduire à la diminution de l'activité enzymatique ainsi qu'à la diminution la croissance microbienne (Mekhoukhe, 2008).

## 1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols; ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Ghedira, 2005).

Dans le monde végétal, ils sont abondants dans les légumes feuillés (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les agrumes: citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure: abricots, cerises, raisins et tomates. On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques. Les plus couramment vendus ou utilisés en tant que compléments alimentaires renferment la vanilline et l'acide vanillique, le resveratrol, les curcumine, stilbène et la quercétine (Harrar, 2012).

### 1.2.1. Structure et classification

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base (figure 2). Ils possèdent un squelette carboné de 15 atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C<sub>3</sub> en formant ainsi l'hétérocycle (C). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (flavane, flavanone, flavone, flavonol, isoflavane) (Krishna *et al.*, 2001).

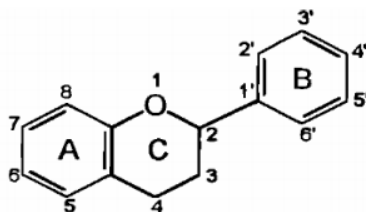


Figure 2- Squelette moléculaire de base des flavonoïdes (Erlund, 2004).

### 1.2.2. Propriétés biologiques

Agissant comme des pigments ou des co-pigments, les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, et sont également impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections microbiennes. Comme ils peuvent moduler la distribution d'auxine, ils fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Ils agissent sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits. Ils sont aussi à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (Subramania *et al.*, 2007).

Les flavonoïdes possèdent ainsi de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydants de ces composés naturels qui s'exerce dans le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), La suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production. (Liyana *et al.*, 2006; Boughendjiou, 2015 )

### 1.3. Les huiles essentielles

Ces produits, appelés communément essences, sont les substances odorantes volatiles sécrétées par les plantes aromatiques et que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro-distillation. Les huiles essentielles (HEs) sont habituellement liquides à température ordinaire, volatiles et sont plus ou moins colorées avec une densité généralement inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, entraînaibles à la vapeur d'eau, très peu solubles dans l'eau. Les HEs sont composées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15). (Kholkhal, 2014 ; Boughendjiou, 2015).

#### 1.3.1. Composition chimique

Chaque HE se compose de plusieurs éléments biochimiques parfois très nombreux, qui tous ensemble, déterminent ses propriétés thérapeutiques. Il s'agit de liaisons d'hydrocarbures classées selon leurs caractéristiques en différentes classes comme les monoterpénols, les sesquiterpénols, les monoterpènes, les sesquiterpènes, les esters, les aldéhydes, les oxydes, les phénols, les coumarines, les cétones ou d'autres encore qui n'apparaissent que sous forme de traces (Lardry et Haberkorn, 2007).

### 1.3.2. Activités biologiques

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques. Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, les HE grâce à leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Boughendjiou, 2015).

Les HES sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite. Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation. Elles font aussi l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux (Mohammedi, 2013).

## 2. Activités biologiques des plantes

### 2.1. Activité antioxydante

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobies, toute fois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives d'oxygène (ERO ou ROS, pour reactive oxygen species) et les espèces réactives de l'azote (ERN). Aux doses faibles, les ERO sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans la production de médiateurs cellulaires, l'élimination des produits toxiques et la défense contre l'invasion des microbes et des virus, de même que contre les cellules tumorales. Dans certain cas les ERO deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme à des doses excessives (Dallio, 2005 ; Koechlin Ramonatxo, 2006).

#### 2.1.1. Radicaux libres et stress oxydatif

Les radicaux libres sont des entités chimiques (espèces, atomes, molécules ou des fragments moléculaires) possédant un électron ou plus non apparié « célibataire » capable d'exister sous forme indépendante. Cela qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Kholkhal, 2014).

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre la formation des radicaux libres ou ERO et la capacité du corps à les neutraliser, à réparer les dommages oxydatifs et à réguler leur production (Zweier *et al.*, 2006).

Les ERO et ERN sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'elles peuvent être à la fois nocives mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants

- Bénéfiques, lorsqu'ils sont impliqués dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires telles que la lutte contre des agents infectieux et leur fonction dans les systèmes de signalisation cellulaire.
- Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et ERN et les systèmes de défense, comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives): c'est le stress oxydatif (Evans et Halliwell, 1999; Bouchouka, 2016 ).

### **2.1.2. Les Antioxydants**

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ERO. Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon ses habitudes alimentaires, son mode de vie, ses caractéristiques génétiques ou l'environnement dans lequel il vit. Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, inhiber la peroxydation lipidique et la chélation des métaux de transition (Diallo, 2005 ; Favier, 2006 )

## **2.2. Activité antimicrobienne**

### **2.2.1. Bactéries et mycètes**

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Les bactéries ont généralement un diamètre autour de 1µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique (Boudjouref, 2011).

Les mycètes sont des organismes eucaryotes, porteurs de spores, dont la nutrition se fait par absorption, qui sont dépourvus de chlorophylle et qui se reproduisent de façon sexuée et asexuée. Les mycètes entretiennent aussi des relations bénéfiques avec d'autres organismes (mycorhizes lichens). Les levures sont essentielles à de nombreux procédés industriels impliquant une fermentation comme la fabrication du pain et des produits alcoolisés. Beaucoup

de mycètes sont la cause principale des maladies de végétaux. Plus de 5000 espèces s'attaquent à des cultures économiquement importantes, à des plantes de jardin, comme à des plantes sauvages. Beaucoup de maladies humaines et sont aussi dues à des mycètes (Prescott *et al.*, 2002)

### 2.2.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance microbienne est considérée comme le principal obstacle à la réussite d'un traitement contre les maladies infectieuses. L'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est un phénomène inquiétant. La multi résistance est décrite comme la résistance ou la diminution de la sensibilité à au moins trois classes d'antibiotiques actifs sur les souches sauvages: (1)  $\beta$ -lactamines, pénicillines, céphalosporines et monobactames; (2) carbapénèmes; (3) fluoroquinolones et (4) aminosides (Shorr , 2009).

Outre les résistances naturelles des bactéries, il existe un nombre important de mécanismes de résistance dont le support est génétique. Ces mécanismes peuvent être transmissibles à d'autres bactéries: l'inactivation enzymatique par la sécrétion d'une enzyme, l'efflux actif, la modification de la cible, la diminution de la perméabilité (porines) à l'antibiotique (Martinez et Rojo, 2011).

### 2.2.3. Mode d'action des agents antimicrobiens

Les substances antimicrobiennes tels que les polyphénols les flavonoïdes et les antibiotiques ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, thérapie naturelle et la conservation des aliments. Il est, sans doute, très complexe, et peut impliquer de multiples modes d'actions. La plupart des antibiotiques interviennent dans l'inhibition des enzymes microbiennes, la dégradation de la paroi cellulaire, la perturbation de la membrane cytoplasmique, l'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN, des protéines, des lipides, et de la fonction mitochondriale. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes et de l'arrangement de la membrane externe (Bendif, 2017).

## 3. Plante étudiée

La famille des Lamiacées ou Labiées est l'une des premières à être distinguées par les botanistes, est une des plus grandes et des plus distinctives familles de plantes à fleurs (Naghbi and *al.*, 2005). appartenant aux angiospermes dicotylédones. Ce sont des arbustes, sous arbrisseaux ou plantes herbacées comprennent dans le monde 258 genres et 6970 espèces (Hennebelle, 2006).

Dans la flore de l'Algérie, les Lamiaceae sont représentées par 29 genres et 149 espèces, le genre de *Teucrium* fait partie des genres les plus importants de la famille des Lamiacées, et est

réparti en 340 espèces (Quezel et Santa, 1963). Notre plante objet d'étude, *Teucrium polium*, fait partie de ce genre.

### 3.1. Habitat et distribution géographique

Cette plante est très abondante dans la majorité des pays du Moyen-Orient et des pays méditerranéens. Elle est trouvée en Asie du Sud-ouest, en Europe et en Afrique du Nord. En Algérie, elle est assez commune dans l'espace méditerranéo saharien, plus rare au Sahara septentrional et au Tassili, elle pousse dans les lieux rocailleux et secs, les lits arides, roches et sables. Elle pousse surtout dans les lits pierreux des oueds et dans les roches en altitude entre 1200 et 2600 m (Bendif, 2017).

### 3.2. Description botanique

Plante blanchâtre, herbacée vivace, très parfumée et très polymorphe, où la détermination des micromorphes reste toujours délicate. Ramifiée dès la base, a feuilles linéaires, vert-grisâtres fortement révolutes sur les marges. C'est une plante vivace souvent pérenne, recouvertes de poils laineux qui lui donnent une couleur grise bleutée et sa taille varie entre 6 et 25cm.

Les fleurs sont blanches ou jaunâtres en grappes denses au sommet des rameaux (figure 3). Leur caractéristique principale est de ne posséder qu'une lèvre, la lèvre inférieure, regroupant les 5 lobes soudés alors que la lèvre supérieure est absente (Quezel et Santa, 1963).



Figure 3- *Teucrium polium* récoltée.

### 3.3. Position systématique

Selon Quezel et Santa (1963), *Teucrium polium Capitatum* est classé comme suit :

Règne	Plantae
Embranchement	Phanérogames
sous Emb	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Teucrium</i>
Espèce	<i>Teucrium polium</i> L.

### 3.4. Usages

*Teucrium polium* a été employée en tant qu'herbe médicinale pendant plus de 2000 ans comme diurétique, chronotropique, tonique, antipyrétique, anti-inflammatoire antinociceptives, hypolipidémique, anti-rhumatoïde, antioxydant et antimicrobienne (Belmekki *et al.*, 2013). Il est également connu pour son effet anti-ulcère et antihypertenseur. Ainsi il est utilisé pour le traitement des maux d'estomac, dans certaines douleurs viscérales et également pour traiter les troubles liés à la glycémie (diabète). (Alamdar *et al.*, 2007).

### 3.5. Phytochimie

Les investigations chimiques ont montré que les plantes appartenant au genre *Teucrium* sont riches en monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, stérols, saponines, iridoïdes, flavonoïdes, composés phénoliques, acides gras, alcaloïdes et en huiles essentielles (Boulila *et al.*, 2008).

CHAPITRE II  
MATERIEL ET METHODES

## 1. Matériel végétal

La plante étudiée a été récoltée dans la région de Bou-Saâda (M'sila) en Avril 2019 (figure 3). Elle a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant 10 à 15 jours. Les parties aériennes ont été récupérées, stockées dans des sacs de papier et placées à l'abri de la lumière et de la chaleur jusqu'à utilisation.

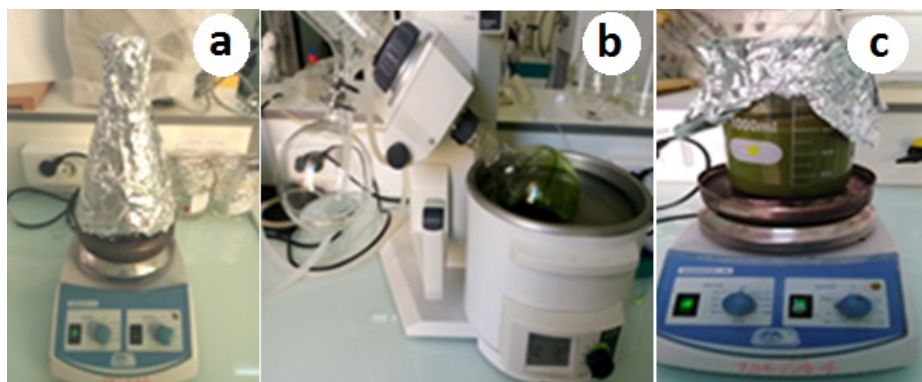
## 2. Procédés d'extraction

### 2.1. Extraction éthanolique par macération

La plante a été soumise à une extraction éthanolique par macération; où 500 ml de l'éthanol ont été ajoutés à 50g des parties aériennes broyées et le mélange a été maintenu sous agitation pendant 24h à température ambiante (figure 4a). L'extrait a été filtré à travers du papier Whatman N°1, puis concentré sous vide à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (figure 4b). Après séchage dans une étuve (40°C), l'extrait sec a été récupéré, pesé et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation (Atere *et al.*, 2018).

### 2.2. Extraction aqueuse par décoction

L'extraction de l'extrait aqueux (EAq) a été effectuée par décoction un dispositif contenant une plaque chauffante et un bécher (figure 4c). Brièvement, 50g de la plante broyée (parties aériennes) ont été immergées directement dans 500 ml d'eau distillée, puis l'ensemble a été porté à ébullition pendant 20-30 min. L'extrait a été filtré à travers du papier Whatman, puis séché dans une étuve (40°C). L'extrait sec a été récupéré et stocké à 4°C à l'obscurité jusqu'à son utilisation (Ben Othman *et al.*, 2017).



**Figure 4-** Dispositifs d'extraction : a) Macération, b) Evaporation sous vide, c) décoction.

Le rendement en extrait des deux méthodes d'extraction est exprimé en pourcentage par rapport au poids sec de la plante et est calculé par la formule suivante (Bachiri *et al.*, 2016):

$$\text{Rendement}_{\text{Ext}} \% = \text{M}_{\text{Ext}} / \text{M}_{\text{Ech}} \times 100$$

Où

$\text{M}_{\text{Ext}}$ : Masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

$\text{M}_{\text{Ech}}$ : Masse de l'échantillon végétal en g.

### 3. Dosage des composés phénoliques

#### 3.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols a été réalisé à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu en présence de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Il s'agit d'une solution d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) de couleur jaune dont la réduction par l'action des polyphénols donne un mélange de complexes de sels de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ) de couleur bleue. Cette solution absorbe à une longueur d'onde de 750nm (Boubrkri, 2014). Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode décrite par (Atere *et al.*, 2013). Brièvement, un volume de 0.1 ml de l'extrait éthanolique (EEth) ou EAq est introduit dans un tube à essai, puis 0.9 ml d'eau distillée et 0.2 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10%, v/v) sont ajoutés. Après 5 min, 1 ml de carbonate de sodium (7%,w/v) est ajouté puis le volume est complété à 2.5 ml avec de l'eau distillée. Les tubes sont agités puis incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 90 min. L'absorbance à 750nm est ensuite mesurée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. Le dosage des polyphénols totaux est calculé par une équation d'une courbe étalon réalisée avec un standard, l'acide gallique, et les résultats obtenus sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

#### 3.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972).

Le taux des flavonoïdes dans l'EEth et l'EAq de *T.polium* a été déterminé par la méthode de trichlorure d'aluminium (Aktumsek *et al.*, 2013). Brièvement, un volume de 600  $\mu\text{l}$  de  $\text{AlCl}_3$

à 2% a été mélangé avec 600 µl de l'extrait (à différentes concentrations). Après agitation, le mélange est incubé pendant 10 min à la température ambiante et l'absorbance à 415 nm est ensuite mesurée, contre un blanc, à l'aide d'un spectrophotomètre. Le taux des flavonoïdes est déterminé en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g de d'extrait (µgEQ/g d'extrait).

## 4. Evaluation de l'activité antioxydante

### 4.1. Test de DPPH

Le pouvoir de piégeage des radicaux libres de l'EEth et l'EAq de *T.polium* a été déterminé en utilisant le 2,2-diphényl-1picrylehydrazile (DPPH) comme radical libre. Un volume de 0.5 ml de la solution méthanolique de l'EEth ou l'EAq (à différentes concentrations) est mélangé avec 0.5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.004%). Dans le contrôle l'EEth et l'EAq sont remplacés par le méthanol. Le milieu réactionnel est vigoureusement agité puis incubé à l'obscurité pendant 30min à la température ambiante. L'absorbance à 517nm est ensuite mesurée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. Le BHT est utilisé comme standard et le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH est calculé par la formule suivante :

$$I(\%) = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

Où **I(%)** est le pourcentage d'inhibition; **A<sub>c</sub>** est l'absorbance du contrôle; et **A<sub>t</sub>** est l'absorbance de l'échantillon. La concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition (IC<sub>50</sub>) est calculée à partir du graphique représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'EEth ou de l'EAq (Atere *et al.*, 2013).

### 4.2. Test de blanchiment du β-carotène

Dans cet essai, l'oxydation de l'acide linoléique produit de nombreux produits d'oxydation (hydroperoxydes lipidiques, des diènes conjugués, et des sous-produits volatils) qui attaquent le chromophore de β-carotène, ce qui entraîne le blanchiment de sa couleur caractéristique. Cependant, la présence d'antioxydant inhibe le blanchiment du β-carotène par les produits formés de l'oxydation de l'acide linoléique (Zouari *et al.*, 2011).

La capacité de l'EEth et de l'EAq de *T.polium* pour empêcher le blanchiment de β-carotène a été étudiée selon la méthode décrite par Aktumsek *et al.* (2013). Brièvement, une émulsion de β-carotène/acide linoléique a été préparée comme suit : 0.5mg de β-carotène dans 1ml de chloroforme a été mélangé avec 25µl d'acide linoléique et 200mg de tween 40. Le chloroforme a été complètement évaporé sous vide en utilisant un évaporateur rotatif à 40°C. Ensuite, on a

ajouté 100ml d'eau distillée saturée en oxygène et le mélange résultant a été agité vigoureusement. Des aliquotes (1350 µl) de l'émulsion β-carotène/acide linoléique (fraîchement préparé) ont été transférées aux tubes à essai contenant 150 µl de différentes concentrations (2-0.0156 mg/ml) d'EEth et d'EAq (dilués dans du méthanol). Après agitation, l'absorbance a été mesurée immédiatement à 470nm et les mélanges ont été ensuite incubés pendant 2 heures à 50°C. La même procédure a été répétée avec le BHT utilisé comme étalon positif, et au méthanol comme contrôle négatif. Enfin, l'absorbance des mélanges (à 470nm) a été à nouveau mesurée après incubation et l'activité antioxydante relative (I%) a été calculée selon la formule suivante :

$$I\% = [(A_E - A_{C120}) / (A_{C0} - A_E)] \times 100$$

Où  $A_E$  et  $A_{C120}$  représentent respectivement les valeurs de l'absorbance mesurées pour l'échantillon testé et le contrôle après 120min d'incubation, et  $A_{C0}$  représente la valeur de l'absorbance du contrôle mesurée au début de l'incubation. Les résultats sont exprimés en valeurs d'IC<sub>50</sub> (µg/ml) (la concentration requise pour provoquer 50% d'inhibition du blanchiment du β-carotène).

## 5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

### 5.1. Microorganismes testés

Les bactéries soumises à l'action de l'EEth ou de l'EAq de *T.polium* sont des bactéries de référence disponibles au niveau de laboratoire de microbiologie du département de Microbiologie et Biochimie : *Proteus mirabilis* ATCC 35659 ; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ; *Bacillus subtilis* ATCC 9372 ; *Escherichia coli* ATCC 25922 ; *Salmonella enterica* ATCC 43972 ; *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 700603.

Les champignons soumis à l'action des mêmes extraits précédents sont des champignons disponibles au niveau du laboratoire de microbiologie du département : *Aspergillus niger*; *Penicillium expansum*; *P. digitatum*, *Alternaria alternata*, la levure *Candida albicans* ATCC 10231 et les isolats fongiques *A. flavus* (M) isolée du maïs, *A. flavus* (B) isolée du blé.

### 5.2. Préparation de l'inoculum

Les bactéries ont été ensemencées dans un bouillon nutritif et incubées à 37 °C/18h. Elles sont ensuite ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 18h, pour optimiser leur croissance. A l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester sont prélevées et puis déchargées dans 9ml d'eau

physiologique stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée et son opacité est ajustée à 0.5 de l'échelle de McFarland.

Les champignons sont cultivés sur le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) à 25°C pendant 7 jours. Ces cultures ont fait l'objet de l'évaluation de l'activité antifongique.

### 5.3. Activité antibactérienne

#### 5.3.1. Test des puits de diffusion

Avec un emporte-pièce, des puits de 7 mm sont creusés dans la gélose de Mueller-Hinton Agar (MHA) coulée dans des boîtes de Pétri (à trois points équidistants du centre et des bords de la boîte) etensemencée par écouvillonnage de suspension bactérienne préparée comme ci-dessus. Dans des conditions aseptiques l'EEth et l'EAq ont été dissout dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO), pour atteindre une concentration finale de 600 mg/ml et 30µl de cette concentration sont incorporés dans chaque puits. Les diamètres d'inhibition sont ensuite mesurés autour des puits après une pré-incubation de 1 heure à 4°C pour que l'extrait puisse diffuser et une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 heures (Ben Sassi *et al.*, 2007). L'EEth et l'EAq ont été remplacées par le DMSO dans les témoins et la gentamicine (GM) à 10µg/disque a été utilisée comme contrôle positif.

Avec un emporte-pièce, des puits de 7 mm sont effectués dans la gélose de Mueller-Hinton Agar (MHA) coulée dans des boîtes de Pétri (au centre et, à trois points équidistants du centre et des bords de la boîte) etensemencée par écouvillonnage de suspension bactérienne préparée comme ci-dessus. Dans des conditions aseptiques l'EEth (ou l'EAq) a été dissout dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO), pour atteindre une concentration finale de 600 mg/ml et 30µl de cette concentration sont incorporés dans chaque puits. Après une pré-incubation de 1 heure à 4°C pour que l'extrait puisse diffuser et une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés autour des puits (Ben Sassi *et al.*, 2007). L'EEth et l'EAq ont été remplacés par le DMSO dans les témoins et la gentamicine (GM) à 10µg/disque a été utilisée comme contrôle positif.

La sensibilité à l'EEth et l'EAq a été classée par le diamètre des halos d'inhibition comme suit : résistant ( $\emptyset < 08$  mm), sensible ( $09 < \emptyset < 14$  mm), très sensible ( $15 < \emptyset < 19$  mm) et extrêmement sensible ( $\emptyset > 20$  mm) (Ponce *et al.*, 2003).

### 5.4. Activité antifongique

L'effet de l'EEth et de l'EAq sur la croissance des moisissures a été testé par la méthode des puits de diffusion. Brièvement, le milieu PDA a été coulé dans des boites de Pétri. Chaque boîte a été inoculée au centre par un disque de 7mm pris d'une culture fongique âgée de 07 jours.

Dans des conditions aseptiques, l'EEth ou l'EAq (dissout dans le DMSO avec une concentration de 600mg/ml) est déposé en volume de 30 µl dans des puits de 7 mm de diamètre (préalablement effectués à trois points équidistants du centre et des bords de la boîte de Petri). L'EEth et l'EAq ont été remplacés par le DMSO dans les témoins. Les boîtes sont préincubées à 4°C pendant une heure pour permettre la diffusion des extraits ensuite incubées à l'étuve à 25°C pendant 7 jours. Les diamètres des colonies sont enregistrés au septième jour et le taux d'inhibition est mesuré selon la formule:

$$I\% = [(D_c - D_t) / D_c] \times 100$$

Où

I% : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

D<sub>c</sub> : Diamètre de la colonie fongique du témoin (mm)

D<sub>t</sub> : Diamètre de la colonie fongique traitée par l'Eth ou l'Aq (mm)

### 5.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus petite concentration à laquelle aucune croissance macroscopique n'est visible (Bachiri *et al.*, 2016). Les suspensions bactériennes ont été préparées à partir des cultures jeunes de 18h sur gélose nutritive et elles ont ensuite été ajustées à une turbidité standard de 0.5 McFarland. L'EEth et l'EAq ont d'abord été dissous dans 10% de DMSO. Les valeurs de la CMI des extraits contre les souches bactériennes ont été déterminées par la méthode de micro-dilutions sur microplaque. Brièvement, les microplaques à 96 puits ont été préparées en distribuant dans chaque puits 95µl de bouillon nutritif et 5µl des inoculums. Cent µl de la solution mère des extraits initialement préparés ont été ajoutés dans les premiers puits. Ensuite, 100µl de leurs dilutions ont été transférés dans sept puits consécutifs. Le dernier puits contenant 195µl de bouillon nutritif sans extraits et 5µl d'inoculum a été utilisé comme contrôle négatif. Le volume final dans chaque puits était 200µl et les concentrations finales dans le bouillon étaient de 500 à 3.90 mg/ml pour les 02 extraits. Les microplaques ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24h. Les concentrations, dans les puits au niveau desquels aucune croissance n'est observée à l'œil nu, sont considérées comme des CMI (Sokmen *et al.*, 2004).

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en EEth ou en EAq capable de tuer plus de 99.9 % de l'inoculum bactérien initial. Afin de déterminer cette concentration, 0.1ml de chaque puits dans lequel aucune croissance n'est observée estensemencé sur gélose nutritive puis incubé à 37°C pendant 24h. Les concentrations, dans les boîtes qui ne présentent aucune croissance, sont considérées comme CMB (Bachiri *et al.*, 2016).

## **6. Analyse statistique**

Toutes les analyses de l'activité antioxydante sont faites en trois répétitions et la comparaison des moyennes est réalisée par Analyse de la Variance (ANOVA) one way. Les comparaisons statistiques ont été faites au moyen du test de Dunnett. Pour l'ensemble des données, la significativité a été admise avec une erreur de 5% ( $P \leq 0.05$ ). Le logiciel utilisé est GraphPad Prism (7.0.0.0) pour Windows.

CHAPITRE III  
RESULTATS ET DISCUSSION

## 1. Rendement de la plante

L'opération de l'extraction par macération de *T. polium* dans l'éthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute qui montre un aspect plus au moins visqueux, une forte odeur, une couleur vert foncé et un rendement de 13%. Par contre le rendement en EAq après décoction a été estimé à de 16.4%.

Le rendement de l'EAq est supérieur à celui de l'EEth. L'étude de Fertout *et al.* (2016) montre que l'EAq présente le rendement le plus élevé. La différence de rendement entre les extraits peut être due aux techniques d'extraction utilisées et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre. Les rendements varient également selon la région et la période de collecte.

## 2. Dosage des composés phénoliques de la plante

La détermination de la teneur en polyphénols totaux (TPT) et la teneur en flavonoïdes totaux (TFT) de l'EEth et l'EAq de *T. polium* a été réalisée par les méthodes spectrophotométriques de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium en utilisant comme standard l'acide gallique et la quercitrine respectivement (Annexe I). Les résultats obtenus montrent que la TPT et la TFT de l'EEth sont élevées à celle de l'EAq (figure 5).

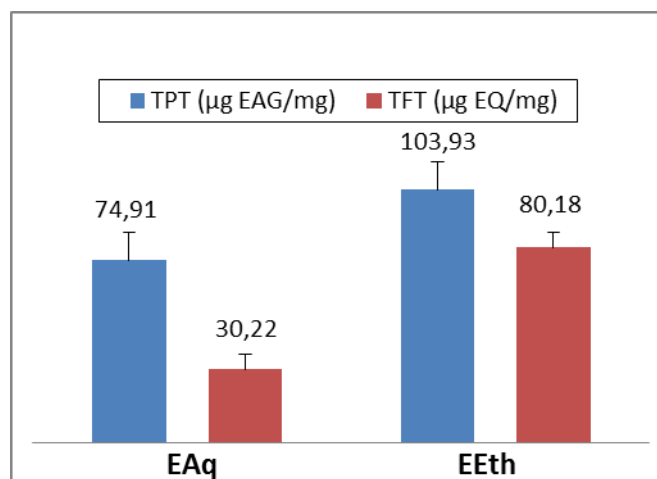


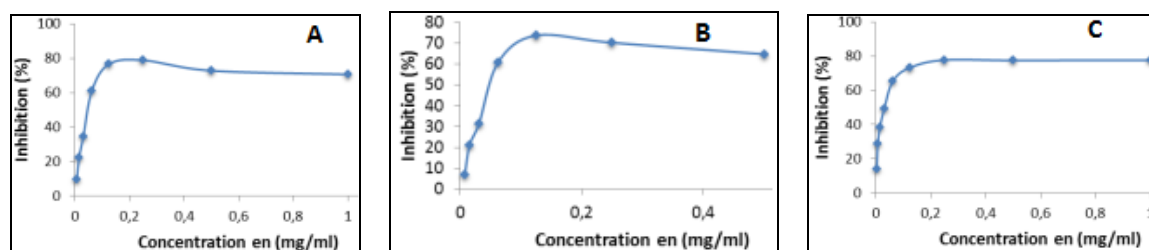
Figure 5- Teneurs en TPT et en TFT de l'EEth et l'EAq de *T. polium*.

Les TPT et TFT obtenues dans la présente étude sont inférieures par rapport à celles obtenues par Stankovic *et al.* (2012). Dans une étude menée sur cette espèce où les teneurs varient de 140.11 mg EAG/g d'EAq, 233.68 mg EAG/g d'EEM, 195.41 mg Ru/g et 47.80 mg Ru/g. La variabilité de la teneur en composés phénoliques totaux dans différents extraits pourrait être le résultat de la solubilité variable des composés phénoliques, cette variation de la solubilité peut être causée par la polarité du solvant (Marinova et Yanishlieva, 1997).

### 3. Activité antioxydante

#### 3.1. Test de DPPH

Le principe de ce test se résume en la capacité des extraits à réduire le radical libre DPPH de couleur violette foncée, qui se transforme après réduction en coloration jaunâtre. Cette décoloration est mesurable par spectrophotométrie (Merouane *et al.*, 2014). L'activité antiradicalaire de l'EEth, l'EAq et de BHT a été estimée en pourcentage d'inhibition (figure 6).



**Figure 6-** Pourcentages d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations de : (A) l'EEth de *T. polium*, (B) l'EAq de *T. polium* et (C) le BHT.

Nos résultats (tableau 01) ont montré que l'EEth et l'EAq des parties aériennes de *T. polium* a un pouvoir piègeur du radical libre DPPH assez important comparable à celui du BHT. La capacité antioxydante des extraits et de l'antioxydant standard est exprimée en valeur d'IC<sub>50</sub> (concentration requise pour provoquer 50% d'inhibition de l'oxydation où la valeur la plus faible correspond à l'activité anti-radicalaire la plus importante). Elle se présente selon l'ordre BHT > EEth > EAq avec une différence significative entre les deux extraits et l'antioxydant standard (P<0.05) et non significatif entre les deux extraits.

**Tableau 1-** Les valeurs IC<sub>50</sub> (µg/ml) de l'EEth, de l'EAq de *T. polium* et du standard dans le test de DPPH.

	BHT	EEth	EAq
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	19± 0.01	40±0.002*	44 ±0.00**

les différences sont significative (\*) a hautement significative (\*\*) par comparaison avec le BHT selon l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA) suivie par le test de comparaisons multiples de Dunnett, p<0.05.

L'étude de l'activité antioxydante de l'EAq et l'EEth de *T. polium* réalisée par Stankovic *et al.* (2012) a montré une capacité antiradicalaire supérieur que celle obtenus dans la présente étude avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'ordre de 56.40 µg/ml pour l'EAq et de 59.27 µg/ml pour l'EEth des parties aériennes. En fonction del'organe étudié, la même étude (Stankovic *et al.*, 2012) sur l'activité antioxydante des extraits de *T. polium* a démontré des variations

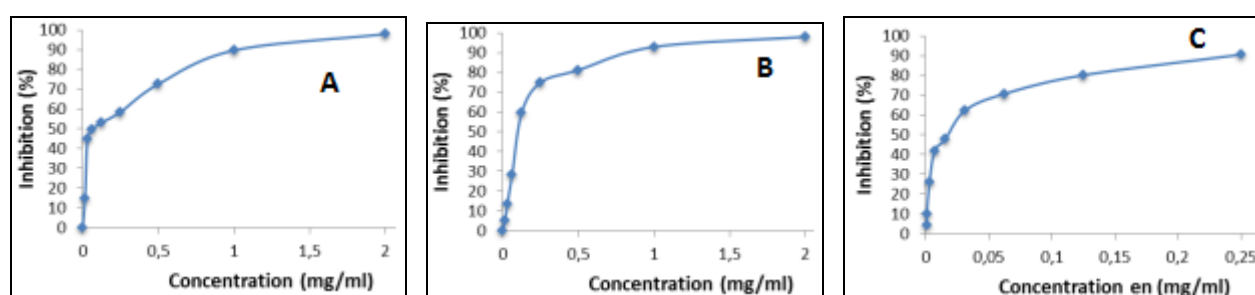
statistiquement significatives dont l'IC<sub>50</sub> varie de 41.23 µg/ml pour les fleurs qui est proche des valeurs de nos extraits, 26.30 µg/ml pour les feuilles et 59.28 µg/ml pour les tiges.

Les différences peuvent être généralement liées à la polarité des solvants d'extraction et/ou aux conditions climatiques des zones de collection. En plus les interactions synergiques entre les antioxydants dans un mélange fait que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants. Ce qui devrait être pris en considération dans l'activité biologique (Falleh *et al.*, 2008).

Lors d'une comparaison de la concentration en composé phénolique et les valeurs de l'activité de piégeage du DPPH, nous avons constaté que les extraits contenant les concentrations les plus élevées en composés phénoliques avaient également un fort effet de piégeage. De nombreuses études sur l'activité antioxydante d'extraits de plantes ont confirmé une forte corrélation linéaire entre les valeurs de la teneur en polyphénols et la capacité antioxydante (Leccese *et al.*, 2011)

### 3.2. Test de blanchiment de β-carotène

La technique de décoloration du β-carotène/acide linoléique permet d'évaluer l'activité antioxydante de l'EEth et de l'EAq de *T.polium*. La présence d'antioxydant inhibe le blanchiment du β-carotène par les produits formés de l'oxydation de l'acide linoléique (Zouari *et al.*, 2011). L'activité antioxydante de l'EEth, l'EAq et de BHT a été estimée en pourcentage d'inhibition (figure 7).



**Figure 7-** Pourcentages d'inhibition du blanchiment de β-carotène en fonction des concentrations de: (A) l'EEth de *T.polium*, (B) l'EAq de *T.polium* et (C) le BHT.

Nos résultats (tableau 02) ont montré que l'EEth des parties aériennes de *T.polium* a un pouvoir antioxydant semblable que celui de l'EAq de la même plante. La capacité antioxydante des extraits et de l'antioxydant standard est exprimée en valeur d'IC<sub>50</sub> (concentration requise pour provoquer 50% d'inhibition de l'oxydation où la valeur la plus faible correspond à l'activité

antioxydante la plus importante) se présente selon l'ordre BHT > (EEth, EAq) avec une différence non significative entre les deux extraits et significative par comparaison à l'antioxydant standard BHT ( $P < 0.05$ ).

**Tableau 2-** Les valeurs  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'EEth, de l'EAq de *T.polium* et du standard dans le test de blanchiment de  $\beta$ -carotène.

	BHT	EEth	EAq
$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	10 $\pm$ 0.01	110 $\pm$ 0.04**	110 $\pm$ 0.02**

les différences ne sont pas significatives (\*\*) entre les extraits et sont significatives par comparaison avec le BHT selon l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA) suivie par le test de comparaisons multiples de Dunnett,  $p < 0.05$ .

Dans la présente étude, l'EEth montre un pourcentage d'inhibition (89.40 %) plus que TSHE (extrait hydroéthanolique de *Teucrium sandrasicum*) avec 86.58 % obtenu par Kaska *et al* (2019). Les composés phénoliques de cette espèce sont les responsables majeurs de ses potentialités antioxydantes. Cette activité ne dépend pas seulement de la concentration en composés phénoliques mais aussi de la structure et de l'interaction entre les différents composés antioxydants (Bettaieb Rebey *et al.*, 2017).

## 4. Activité antimicrobienne

### 4.1. Activité antibactérienne

L'antibiotique utilisé comme contrôle positif pour l'évaluation de l'activité antibactérienne est la gentamicine (10 $\mu\text{g}$ /disque). Il appartient à la famille des aminosides (ou aminoglycosides). Ces antibiotiques sont des bactéricides et leur activité est concentration dépendante et ils possèdent un large spectre d'activité contre les bactéries Gram positif et Gram négatif. Ils se distinguent par leur capacité à résister aux différentes enzymes pouvant désactiver les aminosides (Naucliel et Vildé, 2005).

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien de l'EEth et de l'EAq de *T.polium* par la méthode des puits de diffusion en milieu MHA. L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant les extraits à tester vis-à-vis de 09 souches bactériennes. Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 03. Elles se présentent selon l'ordre GM = EAq > EEth avec une différence significative entre l'EEth et GM ( $P < 0.05$ ), non significatif entre l'EAq et GM et entre les deux extraits.

Le DMSO a été utilisé comme solvant, les résultats montrent qu'il est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes. L'antibiotique utilisé

(la gentamicine) semble avoir une action inhibitrice sur la croissance de toutes les souches testées.

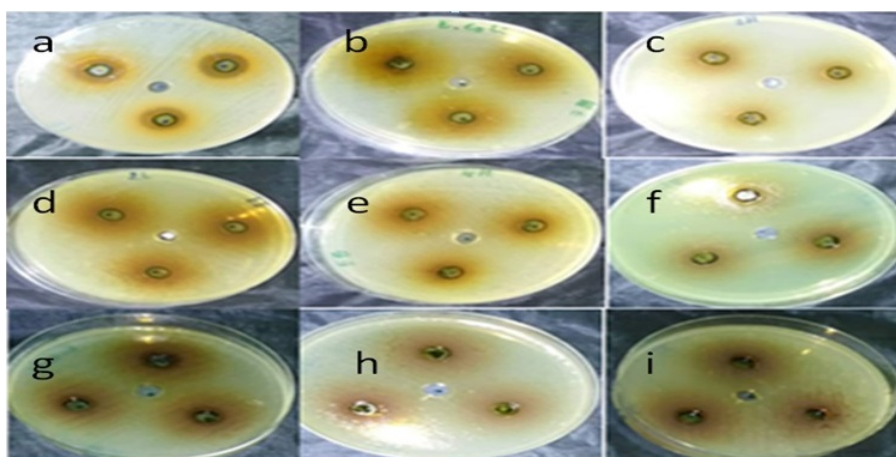
**Tableau 3-** Diamètres des zones d'inhibition illustrant l'activité antibactérienne et anti-*Candida* de l'EEth (600mg/ml) et l'EAq (600mg/ml) de *T.polium*, avec la Gentamicine (GM) (10µg/ disque).

Souches testées	Diamètre (mm)		
	EEth	EAq	GM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15.67±0.58	10.67±1.26	26.00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11.17±0.76	11.00±1.00	21.00
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	9.50±0.50	10.83±0.76	24.00
<i>Selmonella enterica</i> ATCC 43972	10.75±1.77	10.33±0.29	21.00
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	9.75±0.50	10.00±0.00	22.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10.25±1.06	11.00±0.00	15.00
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	+	10.75±0.35	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	+	+	21.00
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	+	10.25±1.06	-

+ : croissance totale

- : n'est pas testé

D'après les résultats obtenus (figure 8), l'EEth présente un effet inhibiteur important sur l'ensemble des bactéries mais faible par rapport à celui de la GM ; les bactéries *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus epidermidis* sont faiblement sensibles. *Escherichia coli*, *Selmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa* paraissent sensibles , alors que *Staphylococcus aureus* paraît très sensible. l'EEth paraît complètement inefficace contre *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* et la levure *Candida albicans*.

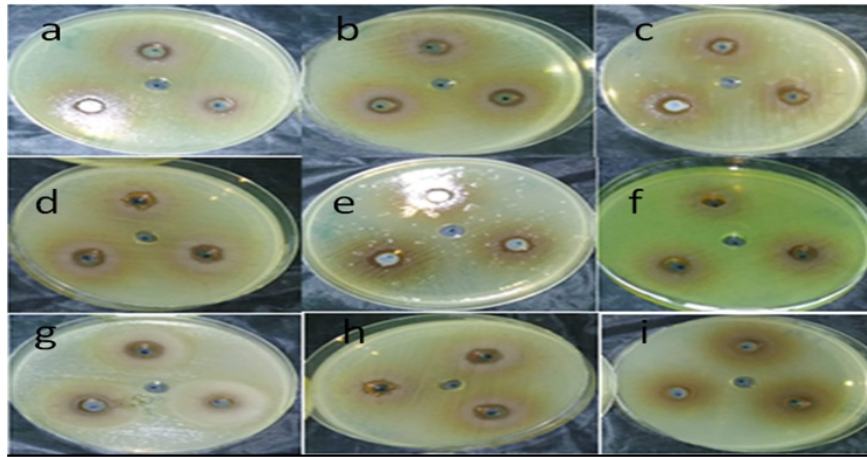


**Figure 8** - L'effet de l'EEth de *T.polium* (600mg/ml) sur les différentes souches testées.

a) *S. aureus*; b) *E. coli*; c) *P. mirabilis*; d) *S. enterica* ; e) *S. epidermidis*; f) *P.aeruginosa* ; g) la levure *C. albicans* ; h) *B. subtilis*; i) *K. pneumoniae*.

D'autre part, les résultats obtenus (figure 09) montrent que l'EAq de *T.polium* présente un effet inhibiteur important contre les bactéries Gram positif (*S. aureus*, *S. epidermidis*,

*B.subtilis*), Gram négatif (*E. coli*, *P.mirabilis*, *S.enterica*, *P.aeruginosa*) et *C.albicans* avec des zones d'inhibition allant de  $10.25\pm 1.06$  jusqu'à  $11.00\pm 0.00$ mm ; ce qui montre que ces microorganismes sont sensibles. L'EAq avait un effet inhibiteur sur *B.subtilis* et la levure *C.albicans* par rapport à l'EEth, mais n'avait aucun effet sur *K. Pneumoniae*



**Figure 9-** Effet de l'Aq de *T.polium* (600mg/ml) sur les différentes souches testées.  
 a) *S. aureus*; b) *E. coli*; c) *P. mirabilis*; d) *S. enterica* ; e) *S. epidermidis*; f) *P.aeruginosa* ;  
 g) *C. albicans* (la levure) ; h) *B. subtilis*; i) *K. pneumoniae*.

Une étude faite par Fertout *et al.* (2016) a montré que l'EAq de *T.polium* testé sur les souches *E.coli*, *P.mirabilis*, *P.aeruginosa* et *S.aureus* provoquait des zones d'inhibition de  $08.5\pm 2.63$ ,  $12.25\pm 2.64$ ,  $14.00\pm 0.00$  et  $19.51\pm 2.03$ , respectivement, à la concentration de  $100\mu\text{g/ml}$  ; ce qui montre que notre extrait aqueux est extrêmement faible par rapport à celui-ci.

Le mode d'action des extraits dépend du type de microorganismes, du type d'extrait et de sa concentration. En général, les bactéries Gram- sont plus résistantes que les bactéries Gram + et ce grâce à la structure de leur membrane externe (Pool, 2001). Les bactéries Gram- sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et l'assise externe composée de lipo-polysaccharides et de protéines et constituerait ainsi une barrière imperméable aux substances susceptibles d'entrer et d'empêcher la croissance des bactéries Gram- (Chao *et al.*,2000). Cette variabilité d'efficacité des extraits végétaux peut dépendre, également, de leur composition chimique. Elle peut être liée à la polarité des substances bioactives ; les composés les moins polaires n'ayant, par exemple, pas de groupement hydroxyles sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant des groupements hydroxyles (Chabot *et al.*,1992).

#### 4.2. Activité antifongique

L'activité antifongique de l'EEth et de l'EAq de *T.polium* a été étudiée vis-à-vis de 06 champignons en utilisant le milieu PDA. L'effet des deux extraits a été évalué par la méthode des puits de diffusion comme décrit ci-dessus pour les bactéries. Elle a été évaluée en termes de

diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant les extraits à tester vis-à-vis des champignons testés.

Les résultats obtenus (figure 10) ont démontré que l'EEth et l'EAq de la partie aérienne de *T.polium* avait un effet inhibiteur plus au moins important sur la croissance des certains champignons testés.

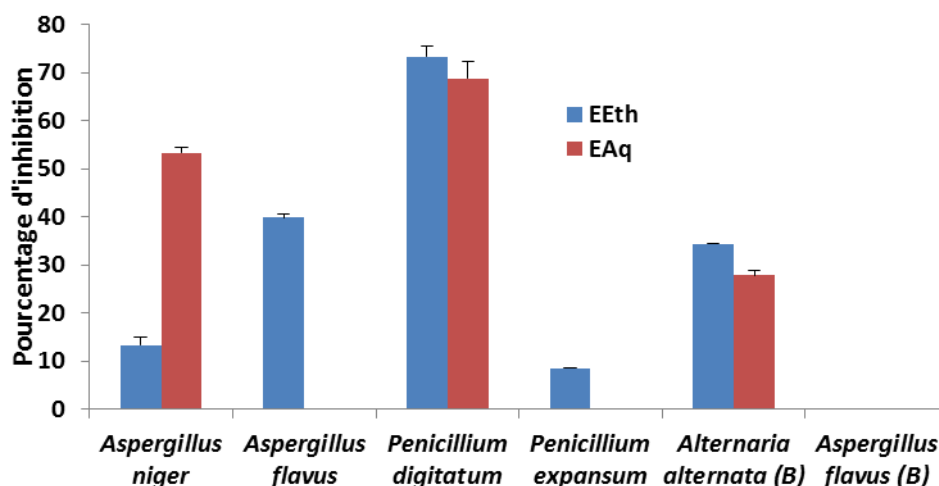


Figure 10- Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne provoqué par l'EEth et l'EAq de *T.polium* au 7<sup>ème</sup> jour d'incubation.

Ces résultats montrent que l'EEth de *T.polium* dans le test des puits de diffusion a provoqué une inhibition importante sur *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata (B)* *Penicillium expansum*, avec un pourcentage d'inhibition qui varie de 8% (*P. expansum*) à 73.34% (*P. digitatum*) ; mais il n'avait aucun effet sur *Aspergillus flavus (B)*. L'EAq a montré une activité moins importante que celle de l'EEth ; il montre un pourcentage d'inhibition de 27.87% et 68.75% pour *Alternaria alternata (B)* et *Penicillium digitatum* respectivement, mais n'avait aucun effet sur les 02 souches d'*Aspergillus flavus* et *P. expansum*.

#### 4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les valeurs des CMI et CMB de l'EEth et de l'EAq de *T.polium* sont présentées dans le Tableau 04.

D'après les résultats obtenus, l'EEth semble avoir une activité antimicrobienne contre tous les microorganismes testés dans le milieu liquide. La CMI de l'EEth est comprise entre 31.25 et 250 mg/ml. La levure *C. albicans* est la plus sensible à l'action de l'EEth avec une CMI de l'ordre de 31.25 mg/ml ; alors que la CMI des autres souches (62.5 mg/ml). La valeur élevée de la CMB est enregistrée pour *S. aureus* ATCC 25923 et *B. subtilis* (125 mg/ml). Les autres valeurs sont égales à 62.5 mg/ml pour le reste des microorganismes.

**Tableau 4** - Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de l'EEth et de l'EAq de *T.polium*.

Souches testées	CMI (mg/ml)		CMB (mg/ml)	
	Eth	Aq	Eth	Aq
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	62.5	62.5	125	250
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	62.5	250	62.5	250
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	62.5	125	62.5	250
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 43972	62.5	62.5	62.5	250
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	62.5	125	62.5	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	62.5	125	62.5	250
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	31.25	125	62.5	250
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	62.5	125	125	250
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	62.5	125	62.5	125

Ces résultats ne sont pas en concordance avec ceux obtenus par Fertout *et al.* (2016) qui ont enregistré des valeurs de CMI inférieures qui varient entre 6.25 à 12.5 µg/ml pour *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Ces valeurs des CMI montrent que l'inhibition est très forte.

L'EAq de *T.polium* semble avoir une activité antimicrobienne moins importante que celle de l'EEth de la même plante avec des CMI allant de 62.5 jusqu'à 250 mg/ml (12.5mg/ml pour *S. aureus* et *S. enterica*). Les microorganismes testés exigent des CMBs plus élevées 250 mg/ml sauf pour *K. pneumoniae*.

En outre, l'activité antibactérienne des extraits de plantes dépend d'un certain nombre de facteurs tels que, la période de récolte, les conditions édaphoclimatiques, la méthode d'extraction, la composition chimique, ainsi que les types de microorganismes testés et les conditions de réalisation des tests (Bachiri *et al.*, 2016).

# CONCLUSION

## **Conclusion**

En Algérie, beaucoup de travaux ont été menés pour découvrir des molécules naturelles à activité antioxydante et/ou antimicrobienne à partir de plantes médicinales. Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des flavonoïdes auxquels on attribue le pouvoir antioxydant et antimicrobien; ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vu les effets secondaires des médicaments.

Dans cette étude, l'activité antioxydante des 02 extraits éthanolique et aqueux de *Teucrium polium* a été évaluée par deux méthodes: le test de réduction de radical libre DPPH et le test de blanchiment du  $\beta$ -carotène. Pour le premier test les résultats ont montré que l'activité antioxydante est élevée dans l'extrait le plus polaire (extrait éthanolique), par contre elle est faible pour l'extrait aqueux. Pour le dernier test, l'oxydation du  $\beta$ -carotène est efficacement inhibée par les 2 extraits testés. En effet, la capacité antioxydante de l'EEth est semblable à celle de l'EAq.

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur huit souches bactériennes, sept souches fongiques, selon la méthode des puits. Les résultats obtenus indiquent que les deux extraits possèdent une activité antimicrobienne sur la plupart des souches testées.

Enfin, d'autres recherches peuvent être menées pour l'évaluation d'autres activités biologiques intéressantes telles que l'activité anticancéreuse, anti-inflammatoire, antidiabétique et antipyrétique.

# REERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alamdar, A., Nahid, G.N. and Shahla, F., (2007).** Isolation and identification of the major chemical components found in the upper parts of *Teucrium polium* plants grown in khuzestan province of iran. *chinese J of chem*, 25: 1171-1173.
- Arkumsek, A., Zengin, G., Uuler, G.O., Cakmak, Y.S., Duran, A., (2013).** Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea* L. taxa from Turkey. *Food Chem*, 141 : 91-97.
- Atere, T.G., Akinloye, O.A., Ugbaga, R.N., Ojo, D.A., Dealtry, G., (2018).** *In vitro* antioxidant capacity and free radical scavenging evaluation of standardized extract of *Costus afer* leaf. *Food Scien and Human Wel*, 7 : 266-272.
- Bachiri, L., Echchegadda, G., Ibijbijen, J., Nassiri, L., (2016).** Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de Lavande autochtones au Maroc : «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.». *Euro Scien J*, 12 (30) : 313-333.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S., (2006).** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. analytical nutritional and clinical methods. *Food Chem*, 99: 191-203.
- Belmekki, N., (2009).** Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de *Saccocalyx satureioïdes*, *Salvia verbenaca* et *Teucrium polium* de la région ouest d'Algérie). Thèse pour l'obtention du Magister en Sciences Biologiques, spécialité : substances naturelles, activités biologiques et synthèse. Tlemcen, Université Abou Bakr Belkaid, 103p
- Belmekki, N., Bendimerad, N., Bekhechi, C. and Fernandez, X., (2013).** Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from western Algeria. *J of Med Pl Res*, 7(14): 897-902.
- Ben Othman, M., Salah-Fatnassi, K. B. H., Ncibi, S., Elaïssi, A., & Zourgui, L. (2017).** Antimicrobial activity of essential oil and aqueous and ethanol extracts of *Teucrium polium* L. subsp. *gabesianum* (LH) from Tunisia. *Phys and mol biol of plants*, 23(3), 723-729.
- Ben Sassi, A., Harzallah-Skhiri, F., Aouni, M., (2007).** Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharma Biol*, 45(5) : 421-428.
- Bendif, H., (2017).** Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques *in vitro* des extraits actifs de quelques Lamiaceae: *Ajuga iva* (L.) Schreb., *Teucrium polium* L., *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet et *Rosmarinus eriocalyx* Jord & Fourr. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Sciences Biologiques, spécialité : biotechnologies végétales. Alger, L'école Normale Supérieure de Kouba, 145 p
- Bettaieb Rebey, I., Bourgou, S., Saidani Tounsi, M., Fauconnier, M.-L., Ksouri, R., (2017).** Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante des différents extraits de la Lavande dentée (*Lavandula dentata*). *Jof new scien*, Agriculture and Biotechnology, 39(2) : 2096-2105.
- Biyiti, L.-F., Mekoo, D.-J.-L., Tamz, V., Amvam Zollo, P.-H., (2004).** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales Camerounaises. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 13: 11-20
- Boizot, N., Charpentier, J. P., (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, *inra*, pp 79-82.
- Boubekri, C., (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Sciences, spécialité : chimie. Biskra, Université Mohamed Khider, 160p
- Bouchouka, E., (2016).** Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes sahariennes. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Sciences Biologiques, spécialité : phytochimie. Annaba, Université Badji Mokhtar, 98 p.
- Boudjouref, M., (2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse pour l'obtention du Magister en Sciences, spécialité : Biochimie appliquée. Sétif, Université Ferhat Abbes, 64p

- Boughendjiou, H., (2015).** Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de *Citrus limon*, *Cinnamomum zeylanicum* et *Thymus numidicus*. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Sciences, spécialité : Biologie végétale. Annaba, Université Badji Mokhtar, 177p
- Boulila A., Béjaoui A., Messaoud C., Boussaid M., (2008).** Variation of volatiles in tunisian populations of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Chem et Biod*, 5, 1389-1400.
- Bouزيد, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane , M.C., and Ayachi, A., (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *Aubepine monogyne*. *Lebanese Scien J*, 12(1) : 59-68.
- Chabot, S., Becard, G., Piche, Y., (1992).** Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Myc*, 84: 315-21
- Chao, S.C., Young, D.G., Oberg, G.J., (2000).** Screening for inhibitory activity of essential oils on selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J Essent Oil Res*, 12: 639-49
- Diallo, A., (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* willd. (Myrtaceae). Thèse pour l'obtention du Doctorat en Pharmacie, spécialité : Pharmacie. Mali, Université d'Odonto-Stomatologie de Bamako, 100p
- Erlund, I., (2004).** Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nut Res*, 24: 851-874.
- Evans, P., Halliwell, B., (1999).** Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York academy of sciences*, 884: 19-40.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. *Com Ren Biol*, 331 : 372–379.
- Favier, A., (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann pharm*, 64: 390-396.
- Fertout-Mouri, N., Latreche, A., Mehdadi, Z., Bengherraz, Z., (2016).** Activité antibactérienne de quatre extraits de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Bull de la Soc roy des Scien de Liège*, 85 : 253–262.
- Garcia-salas, P., Morales-soto, A., Segura-carretero, A., Fernández-gutiérrez, A., (2010).** Phenolic compound extraction systems for fruit and vegetable samples. *Mol*, 15: 8813-8826.
- Ghedira, K., (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.
- Harrar, A., (2012).** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L.. Thèse pour l'obtention du Magister en Sciences, spécialité : Biochimie et physiologie expérimentale. Sétif, Université de Ferhat Abbas, 67p
- Henebelle, T., (2006).** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiacées productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse pour l'obtention du Doctorat en Sciences, spécialité : Chimie organique et macromoléculaire. Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille, 304p
- Kaska, A., Çiçek, M., Mammadof, R., (2019).** Biological activities, phenolic constituents and mineral element analysis of two endemic medicinal plants from Turkey: *Nepeta italica* subsp. *cadmea* and *Teucrium sandrasicum*, *S. African J of Botany*, 124 : 63-70.
- Kholkhal, F., (2014).** Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Sciences, spécialité : Produits naturels, aspects nutritionnels et activités biologiques. Tlemcen, Université Abou Bekr Belkaid, 164p
- Koehlin-ramonatxo, C., (2006).** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Cli nut and met*, 20 : 165–177.
- Krishna, D., Chaluvadi, M., Raj, N., Sripal, R., (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian. J Pharm*, 33 : 2-16.
- Laccese, A., Viti, R., Bartolini, J.-P., De Groot, A., Evstatieva, L.-N., (2011).** The effect of solvent extraction on antioxidant properties of apricot fruit. *Cent Eur J Biol*. 6 (2): 199-204.

- Lardry, J.M., Haberkorn, V., (2007).** L'aromathérapie et les huiles essentielles. *kinesitherrev.* (61): 14-17.
- Liyana-pathirana , C.M., Shahidi, F., ( 2006).** Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *J of the Scien of Food and Agr*, 86 (3): 477–485.
- Macheix, J., Fleuriet, A., Jay-allemand, C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. ed. presses polytechniques et universitaires romandes, lausanne, p. 4-5.
- Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V., (1997).** Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chem.* 58(3):245-248.
- Martinez , J.L., Rojo, F., (2011).** Metabolic regulation of antibiotic resistance. *fems microbio rev*, 35: 768–789.
- Mazari, K., Bendimerad, N., Bekhechi, C., Fernandez, X., (2010).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *J of Med Pl Res*, 4(10) : 959-964.
- Mekhoukhe, A., (2008).** Etude de certaines activités biologiques des composés phénoliques extraits de cinq plantes médicinales de la région de Bejaia. Thèse pour l'obtention du Magister en sciences, spécialité : Sciences alimentaires. Sétif, Université de Ferhat Abbas, 75p
- Merouane, A., Noui, A., Medjahed, H., Nedjari Benhadj Ali, K., Saadi, A., (2014).** Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *Int. J. Biol. Chem. Sci*, 8(4) : 1865-1870.
- Mohammedi, Z., (2013).** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse pour l'obtention du Doctorat en sciences, spécialité : Substances naturelles, activités biologiques et synthèses,. Tlemcen, Université Abou Bakr Belkaid, 160 p
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed S-M., Ghorban, A., (2005).** Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian J of Pharm Res*, 2: 63-79.
- Nauciel, C., Vildé, J.-L., (2005).** Bactériologie Médicale : le cours et cas cliniques corrigés. 2 éd. Paris, Masson SAS, 257p.
- Ouis, N., (2015).** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Sciences, spécialité : chimie organique. Oran, Université d'Oran 1, 198p
- Ponce, A.G., Fritz, R., Del-Valle, C., (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lwt-Food Sci Technol*, 36(7): 679-84
- Pool, E.K., (2001).** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 4: 500-08
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Willey, J.M., (2002).** Microbiologie de boeck université
- Quezel, P., Santa, S., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. ed. centre nationale de la recherche scientifique, Paris, 617- 620.
- Ribéreau-Gayon , J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P., (1972).** Sciences et techniques du vin. 1 éd. Paris, Dunod, 671p.
- Shorr, A.F., ( 2009).** Review of studies of the impact on gram-negative bacterial resistance on out comes in the intensive care unit. *Cri Care Med*, 37: pp 1463–1471.
- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, A.-H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., Sahin, F., (2004).** The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Con*, 15 : 627–634.
- Stankovic, M.S., Niciforovic, N., Mihailovic, V., Topuzovic, M., Solujic, R., (2012).** Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. sub sp. *Polium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(2):117-122.
- Urquiaga, I.N.E.S., Leighton, F.E.D.E., (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res*, 33: 55-64.

- Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., Ayadi, M.-A., (2011).** Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food and Bio Pro*, 89(4) : 257-265.
- Zweier, J., Hassan, L., Talukder, M.A., (2006).** The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res*, 70(2): 181-190..

# ANNEXES

## Annexe I

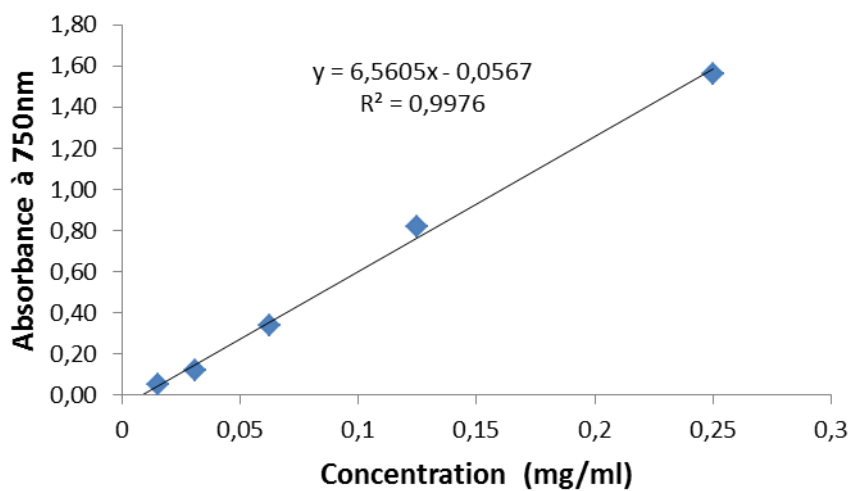


Figure 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

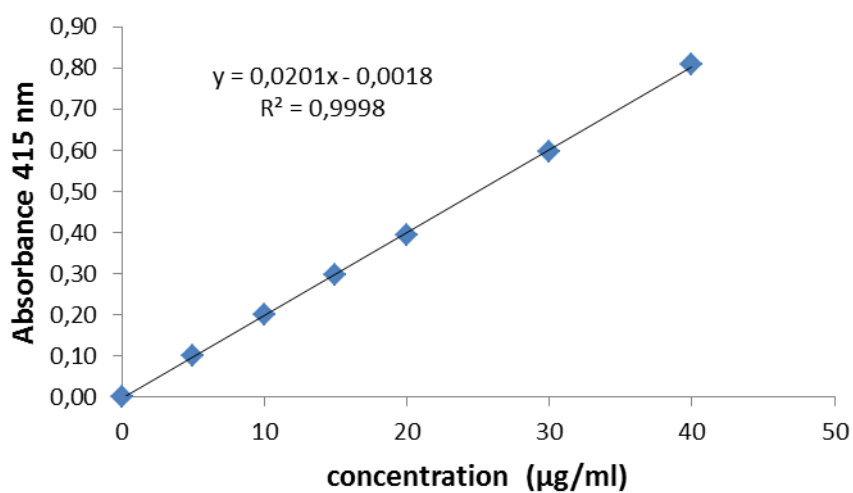


Figure 2. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux



تنتمي نبتة *Teucrium polium* الى العائلة الشفوية *Lamiaceae* وهي نبتة طبية واسعة الاستعمال في الطب التقليدي. قد قدر مردود الاجزاء الهوائية الحاضعة للاستخلاص الايثانولي عن طريق النقع بـ 13% في حين اعطى الاستخلاص المائي عن طريق الغليان مردودا قدر بـ 16.4%. حددت كمية متعدد الفينولات و الفلافونويدات باستخدام طريقة Folin-Ciocalteu و ثلاثي كلوريد الألمنيوم على التوالي. كانت نتائج المستخلص الايثانولي والمائي 74.91-103.93 ميكروغرام مكافئ حمض الجاليك/مغ و 30.22-80.18 مكافئ الكرستين/مغ على التوالي. تم تقييم النشاط المضاد للأوكسدة بواسطة اختبار تبييض بيتا كاروتين حيث قدرت  $IC_{50}$  بـ  $0.04 \pm 110$  و  $0.02 \pm 110$  ميكروغرام/مل بالنسبة للمستخلص الايثانولي و المائي على التوالي. كانت قيم التراكيز المثبطة لـ 50% ( $IC_{50}$ ) من الجذر الحر DPPH  $0.002 \pm 40$  و  $0.00 \pm 44$  ميكروغرام/مل بالنسبة للمستخلص الايثانولي و المائي على التوالي. أبدى اختبار النشاط المضاد للجراثيم، على 9 سلالة بكتيرية غرام + وغرام - و 6 سلالات فطرية باستعمال طريقة الانتشار عن طريق الآبار، أن المستخلص المائي أثر تأثيرا مثبتا اهم بكثير من تأثير المستخلص الايثانولي. انتج كل من المستخلص الايثانولي والمائي نسب تثبيط مقبولة ضد الفطريات تراوحت بين 8.57% و 73.34%.

**كلمات مفتاحية:** *Teucrium polium*، العائلة الشفوية، المستخلص الايثانولي، المستخلص المائي، النشاط المضاد للأوكسدة، النشاط المضاد للجراثيم.

## Abstract

*Teucrium polium* L. is a medicinal plant belonging to the Lamiaceae family. It is widely used in traditional medicine. The aim of this work is to determine the polyphenol and flavonoid contents of the ethanolic and aqueous extract of this plant as well as to evaluate their antioxidant and antimicrobial activities. The plant aerial parts were subjected to ethanolic maceration and the It yielded in 13% (w/w). The aqueous extract yield was 16.4% by decoction of the aerial parts. The polyphenol and flavonoid contents were determined by the Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride methods respectively. The polyphenol and flavonoid contents of the ethanolic and aqueous extracts were respectively 103.93, 74.91  $\mu\text{gGAE}/\text{mg}$  of extract and 80.18, 30.22  $\mu\text{gQE}/\text{mg}$  of extract. Antioxidant activity was evaluated using  $\beta$ -carotene/linoleic acid system, where the  $IC_{50}$  values were  $110 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$  and  $110 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$  for the ethanolic and aqueous extract respectively. Free radical scavenging effect were evaluated using the free radical DPPH. The 50 percent inhibitory concentrations of DPPH ( $IC_{50}$ ) were  $40 \pm 0.002 \mu\text{g}/\text{ml}$  and  $44 \pm 0.00 \mu\text{g}/\text{ml}$  for the ethanolic and aqueous extract respectively. The antimicrobial activity of the extracts towards 9 bacterial strains (Gram<sup>+</sup> and Gram<sup>-</sup>) and 6 fungal strains was assessed using well diffusion and micro-well dilution assays. The aqueous extract of *T. polium* showed greater antimicrobial activity than the ethanolic one. For the molds, the applied *T. polium* extracts by well diffusion assay caused significant inhibition on most of the mold strains with inhibition percentage ranging from 8.57% to 73.34%.

**Key words** - *Teucrium polium*, Lamiaceae, aqueous extract, ethanolic extract, antioxidant activity, antimicrobial activity.

## Résumé

*Teucrium polium* L. est une plante médicinale qui appartient à la famille des Lamiaceae. Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle. Le but de ce travail est de déterminer la teneur de l'extrait éthanolique (EEth) et de l'extrait aqueux (EAQ) de cette plante en polyphénols et en flavonoïdes ainsi que d'évaluer leurs activités antioxydante et antimicrobienne. Le rendement des parties aériennes, soumises à une extraction éthanolique par macération, était de l'ordre de 13% (w/w). L'extraction acqueuse des parties aériennes par décoction a donné un rendement de l'ordre de 16.4% (w/w). Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes, qui ont été déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium respectivement, de l'EEth et de l'EAQ sont respectivement 103.93, 74.91  $\mu\text{g EAG}/\text{mg}$  d'extrait et 80.18, 30.22  $\mu\text{g EQ}/\text{mg}$  d'extrait. L'activité antioxydante a été réalisée par la méthode de décoloration du  $\beta$ -carotène/acide linoléique d'où les  $IC_{50}$  de l'EEth et de l'EAQ sont respectivement  $110 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$  et  $110 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; et par le test de DPPH d'où les  $IC_{50}$  de l'EEth et de l'EAQ sont respectivement  $40 \pm 0.002 \mu\text{g}/\text{ml}$  et  $44 \pm 0.00 \mu\text{g}/\text{ml}$ . L'activité antimicrobienne a été déterminée pour 9 souches bactériennes (Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>) et 06 champignons. Les méthodes des puits de diffusion et de microdilutions ont été appliquées pour évaluer cette activité. L'EAQ de *T. polium* semble avoir une activité antimicrobienne plus importante que celle de l'EEth de la même plante. Alors que pour les champignons l'EEth de *T. polium* dans le test des puits de diffusion a exercé une inhibition importante sur les champignons testés avec un pourcentage d'inhibition qui varie de 8.57% à 73.34%.

**Mots clés** - *Teucrium polium*, Lamiaceae, extrait aqueux, extrait éthanolique, activité antimicrobienne, activité antioxydante.