

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

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT SNV

N° : .....



DOMAINE : SNV

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : ECOLOGIE DES ZONES  
ARIDES ET SEMI ARIDES

Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique

Par: HAMZA Asma

**Intitulé**

**Essai de caractérisation phytochimique des  
extraits de trois plantes médicinales d'Algérie**

Soutenu le **30/06/2019** a **12.00** devant le jury composé de:

Mr. MERABTI Karim	MAA	Université de M'sila	Président
Dr. BENDIF Hamdi	MCA	Université de M'sila	Rapporteur
Dr. YAHIAOUI Merzouk	MCB	Université de M'sila	Examineur

**Année universitaire : 2018 /2019**

## Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail.

Merci Dieu de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

J'adresse mes plus sincères remerciements à mon encadreur **Mr Bendif.H** maître de conférence classe A, Université de Mohamed Boudiaf, M'sila qui m'a encadrée et dirigée avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé nous ont permis de réaliser ce travail, sans oublier **Mr Harrir** qui m'a aussi donné un coup de main.

Je tiens de remercier **Mr Kamel Sghiri**, responsable des laboratoires de l'SNV pour sa gentillesse et son aide.

Un grand merci au personnel des laboratoires mes amies et collègues de département des sciences naturelles et de vie.

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A ma chère mère qui m'a soutenue moralement et matériellement dans ma vie et mes études en particulier et je dis ici :*

*« Tu es précieuse dans ma vie dans la joie comme dans l'ennui, merci pour tout et que Dieu te garde pour nous ».*

*A mon très chère père tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A mon mari aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et la gentillesse dont tu as toujours entouré. Que Dieu le tout puissant nous accorde un avenir meilleur.*

*A mes très chers petits poussins Idris et Qais, c'est à vous mes adorables anges mes petits trésors que maman dédie ce travail pour vous dire vous resterez toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie. Je vous aime mes petits et je vous souhaite tous le bonheur du monde.*

*A mes chers frères Amine et Oussama et mes très chères sœurs Sarra Meriem et Soumia.*

*A toute la famille Belcassem, Hamza et Zaoui.*

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Les flavonoïdes isolés de <i>C. parviflora</i> (Belbache)	<b>09</b>
<b>Tableau II.</b> Systèmes solvants utilisés dans les séparations par (CCM)	<b>19</b>
<b>Tableau III.</b> Rendement d'extraction (%) d' <i>C. paviflora</i> , <i>O. alba</i> et <i>V. betonicifolium</i> par macération avec EtOH	
<b>Tableau IV.</b> Résultats de la CCM après révélation avec UV 366 nm	<b>26</b>
<b>Tableau V.</b> Profil d'arôme (pourcentages des composés identifiés) des parties aériennes d' <i>O. alba</i> par analyse HS-SPME / GC-MS (fibre: carboxen polydiméthylsiloxane-divinyl benzene (CAR PDMSDVB))	<b>30</b>
<b>Tableau VI.</b> Profil d'arôme (pourcentages des composés identifiés) de la partie aérienne de <i>V. betonicifolium</i> par analyse HS-SPME / GC-MS (fibre: carboxen polydiméthylsiloxane-divinyl benzene (CAR PDMSDVB))	<b>31,32</b>
<b>Tableau VII.</b> Profil d'arôme (pourcentages des composés identifiés) de la partie aérienne de <i>C. parviflora</i> par analyse HS-SPME / GC-MS (fibre: carboxen polydiméthylsiloxane-divinyl benzene (CAR PDMSDVB))	<b>33,34</b>
<b>Tableau VIII.</b> Activité antibactérienne par la méthode de diffusion en puits d'agar	<b>36</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Structure du noyau phénol	<b>05</b>
<b>Figure 2.</b> Structure de l'unité isoprénique (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> )	<b>06</b>
<b>Figure 3.</b> Image de l'espèce <i>Centaurea parviflora</i>	<b>08</b>
<b>Figure 4:</b> Aire de répartition du genre méditerranéen <i>Verbascum L.</i>	<b>10</b>
<b>Figure 5.</b> Image de l'espèce <i>Verbascum betonicifolium</i> Desf	<b>11</b>
<b>Figure 6.</b> Image de l'espèce <i>Ononis alba</i> Poir	<b>13</b>
<b>Figure 7.</b> Schéma simplifié du dispositif SPME utilisé pour l'extraction des composés volatils (points rouges) avec échantillonnage de l'espace de tête	<b>14</b>
<b>Figure 8.</b> Représentation schématique de la SPME. A : extraction des analytes. B : désorption thermique et analyse en GC-MS.	<b>14</b>
<b>Figure 9:</b> Localisation géographique des sites de récolte des plantes étudiées en Algérie	<b>17</b>
<b>Figure 10.</b> Protocole de l'analyse par Microextraction sur Phase Solide par Espace de Tête	<b>20</b>
<b>Figure 11.</b> Photos des Résultats de la CCM après révélation avec UV 366 nm	<b>27,28</b>
<b>Figure 12.</b> Photos des résultats de l'activité antibactérienne selon la méthode de diffusion sur disque d'agar de <i>C. Paviflora</i> , <i>O. alba</i> et <i>V. Betonicifolium</i> (concentration 30 mg/ml)	<b>37</b>

## Table des matières

Dédicace	
Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Table des matières	
Introduction général	01
<b>Chapitre I. Recherche bibliographique</b>	<b>03</b>
<b>I. Plantes médicinales, phytothérapie et métabolites secondaires</b>	<b>03</b>
1. Historique des plantes médicinales	03
2. Généralités sur les plantes médicinales	04
3. La phytothérapie	05
4. Substances naturelles viennent du métabolisme secondaire	05
4.1. Les polyphénols	05
4.2. Terpénoïdes	06
4.3. Alcaloïdes	07
<b>II. Monographie des plantes étudiées</b>	<b>07</b>
1. La plante médicinale <i>Centaurea parviflora</i> (Astéracées)	07
1.1. Généralités sur la famille des Astéracées	07
1.2. Habitat et distribution géographique de <i>Centaurea parviflora</i>	07
1.3. Description botanique et classification de <i>Centaurea parviflora</i>	08
1.4. Travaux antérieurs et usages thérapeutiques de <i>C. parviflora</i>	09
2. La plante médicinale <i>Verbascum betonicifolium</i> Desf (Scrofulariacées)	10
2.1. Généralités sur la famille des Scrofulariacées	10
2.2. Habitat et distribution géographique de <i>Verbascum betonicifolium</i> Desf	10
2.3. Description botanique et classification de <i>Verbascum betonicifolium</i> Desf	11
2.4. Travaux antérieurs et usages thérapeutiques de <i>Verbascum betonicifolium</i> Desf	11
3. La plante médicinale <i>Ononis alba</i> Poir (Fabacées)	12
3.1. Généralités sur la famille des Fabacées	12
3.2. Habitat et distribution géographique d' <i>Ononis alba</i> Poir	12
3.3. Description botanique et classification d' <i>Ononis alba</i> Poir	12
3.4. Travaux antérieurs et usages thérapeutiques d' <i>Ononis alba</i> Poir	13
<b>III. La technique MEPS (Microextraction sur Phase Solide par Espace de Tête)</b>	<b>13</b>

<b>(Solid Phase Micro Extraction Head Space/MS (HS-SPME-GC/MS))</b>	
<b>Chapitre II : Materiel et Méthodes</b>	
<b>1. Matériel végétal</b>	<b>16</b>
<b>1.1. Critères de sélection des plantes</b>	<b>16</b>
<b>1.2. La récolte des plantes</b>	<b>16</b>
<b>1.3. Préparation des échantillons</b>	<b>16</b>
<b>2. Préparation d'extraits bruts par macération</b>	<b>17</b>
<b>3. Détermination du rendement des extractions</b>	<b>18</b>
<b>4. Analyse chromatographique</b>	<b>18</b>
<b>1. Chromatographie sur couches minces</b>	<b>18</b>
<b>2. Analyse avec MEPS (Microextraction sur Phase Solide par Espace de Tête) (Solid Phase Micro Extraction Head Space/MS (HS-SPME-GC/MS))</b>	<b>20</b>
<b>5. Evaluation des activités antimicrobiennes</b>	<b>21</b>
<b>6. Analyse des données</b>	<b>24</b>
<b>Chapitre III : Resultats et discussion</b>	
<b>1. Rendement et resultats d'extraction</b>	<b>25</b>
<b>2. Analyse qualitatif des composés phénoliques par chromatographie sur couches minces (CCM)</b>	<b>25</b>
<b>3. Resultats d'analyse par Microextraction sur Phase Solide par Espace de Tête (HS-SPME-GC/MS) (Solid Phase Micro Extraction Head Space/MS) (HS-SPME-GC/MS)</b>	<b>28</b>
<b>4. Activité antibactérienne</b>	<b>35</b>
<b>Conclusion générale</b>	
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	
<b>Résumés (Français, Anglais et Arabe)</b>	

## INTRODUCTION

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales dans l'objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Iserin, 2001**), sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il était difficile de définir les molécules responsables de l'action pharmacologique.

Récemment, l'attention s'est portée sur les composés biologiquement actifs isolés des espèces végétales pour l'élimination des microorganismes pathogènes en raison de la résistance que les microorganismes ont développée contre les antibiotiques synthétiques.

L'Algérie, par sa situation géographique au centre de la méditerranée, abrite une végétation riche et diversifiée. La variabilité de la composition de ces extraits polaires peut altérer la valeur gastronomique des épices et modifier les effets physiologiques en cas d'utilisation médicinale. Il est donc facile de comprendre pourquoi les études pharmacologiques exploratoires complexes des constituants actifs jouent un rôle de plus en plus important au-delà des évaluations chimiques et analytiques.

Notre travail a été motivé d'abord, pour valoriser et de promouvoir les plantes médicinales de l'Algérie afin de faciliter l'accès des populations à des remèdes traditionnels améliorés à moindre coût. Mais aussi par la nécessité de la valorisation de quelques plantes algériennes, par la recherche des composés qui peuvent avoir une utilisation thérapeutique. Il s'agit de renforcer la connaissance phytochimique de ces extraits de plantes et de mettre en évidence des traceurs spécifiques pour chacune des plantes en vue de l'utilisation ultérieure de leurs extraits dans l'industrie.

Les espèces que nous avons étudiées sont : *Centaurea parviflora* (Asteracées), *Verbascum betonicifolium* Desf (Scrofulariacées) et *Ononis alba* Poir (Fabacées).

C'est dans cette optique que se situe notre étude dont les objectifs principaux se résument dans les volets suivants :

- \* Valoriser les composés des plantes étudiés par l'extraction des extraits polaires à partir des plantes.
- \* Caractérisation qualitative de la composition chimique des extraits polaires par (HS-PME CG-SM) ;
- \* Evaluation des activités biologiques des extraits actifs des plantes choisies.

Ce travail sera présenté comme suit :

Dans le **premier chapitre**, nous présentons une analyse bibliographique décrivant les notions essentielles liés au contexte global de notre travail (Plantes médicinales, phytothérapie et métabolites secondaires).

Dans le **second chapitre**, nous présentons une monographie des plantes étudiées

Au niveau du **troisième chapitre** nous décrivons le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail notamment :

- \* L'extraction des polyphénols.
- \* L'analyse qualitative par chromatographie CCM et HSPME GC-MS.
- \* L'étude de l'activité antimicrobienne *in vitro* par la méthode : diffusion sur disque d'agar

Dans le **quatrième chapitre** nous analysons les résultats obtenus puis nous discutons leur signification par rapport aux données de la littérature.

Au terme de ce mémoire, nous présenterons une **conclusion générale** dans laquelle nous rappellerons les principaux résultats obtenus, puis nous proposerons quelques **perspectives** pour notre étude.

Enfin, nous exposons les **références bibliographiques**

## I. Plantes médicinales, phytothérapie et métabolites secondaires

### 1. Historique des plantes médicinales

Depuis des millénaires, les vertus des plantes médicinales sont reconnues par de très nombreuses civilisations. Leur usage à des fins thérapeutiques appelé "Phytothérapie", rencontre aujourd'hui un regain d'intérêt lié à la volonté de retour aux principes de la nature (**Iserin, 2001**).

En effet, depuis quelques années, les plantes sont de nouveau utilisées pour prévenir et soulager les petits maux quotidiens. La médecine par les plantes est sans doute la plus ancienne médecine du monde. La botanique a connu un grand essor avec l'avènement de l'Islam. Les Arabes traduisirent et commentèrent le *Cornus Hippocratus*, le *MATURIA MEDICA* de *DISCORIDES* et les écrits de Gallien. Les médecins du monde musulman, parmi lesquels Abou Ali Ibn Sina, contribuèrent par leurs travaux, leurs techniques, leurs observations cliniques et leurs expérimentations à dégager les propriétés des plantes et à nous laisser un matériel thérapeutique important. Le remède tiré des plantes est considéré comme "une force destinée à seconde la nature, car la nature préside aux deux Etats. Celui de la santé et celui de la maladie selon Ibn Khaldoun.

D'ailleurs, l'expérimentation moderne a confirmé les patientes observations faites au cours des siècles. Les spécialistes de la chimiothérapie ont utilisé les travaux des anciens savants et ont pu isoler les substances actives des plantes, contribuant ainsi à mettre au point des médicaments de synthèse. Cependant, l'emploi des médicaments peut entraîner des effets secondaires néfastes d'où la nécessité de ne les utiliser que lorsque cela est vraiment indispensable et de les remplacer chaque fois que cela est possible par les plantes dont les matières actives sont biologiquement équilibrées et les effets dangereux pratiquement inexistantes (**Cheref, 1983**).

### 2. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des plantes spontanées ou les cueille ou on les cultive. Elles se rencontrent pratiquement sous toutes les altitudes dans les habitats les plus divers (**Larousse Agricole, 1981**). On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capable prévenir, soulager ou guérir des maladies, c'est-à-dire, les plantes dotés de propriétés curatives (**Guide des plantes médicinales, 2006**).

Selon **Sofowora (2010)**, les plantes médicinales sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (médicaments). L'utilisation des plantes médicinales elle-même, il existe de nombreuses preuves dont des documents écrits, des monuments conservés et même des médicaments à base de plantes. La conscience de l'utilisation des plantes médicinales est le résultat

de nombreuses années de luttres contre des maladies grâce auxquelles l'homme a appris à consommer des drogues dans les écorces, les graines, les fruits et d'autres parties des plantes ; la science a inclus dans la pharmacothérapie moderne une gamme de médicaments d'origine végétale connus par les civilisations anciennes et utilisés tout au long des millénaires. Selon l'OMS, environ 80 % de la population mondiale dépend essentiellement de la médecine traditionnelle et l'utilisation d'extraits végétaux associée principalement au traitement traditionnel (**Beverly et Sudarsanam, 2011; Hosseinzadehet al., 2015**).

De nombreuses plantes médicinales sont appliquées par auto-médication ou sur la recommandation d'un médecin ou d'un pharmacien. Elles sont utilisées indépendamment ou en combinaison avec des médicaments synthétiques. Pour une thérapie adéquate et appliquée avec succès, il est important de connaître l'effet pharmacologique de leurs composants (**Petrovska, 2012**).

Les grands types d'usages des plantes médicinales et aromatiques par l'homme sont cosmétiques (astringentes, adoucissantes, cicatrisantes, capillaires, pigmentaires et anti-ecchymose), aromatiques et condimentaires, alimentaires, industriels (tinctoriales, fibres textiles, insecticides) et médicinales (**Anthoula, 2003**).

En Algérie, pays très riche dans sa biodiversité florale, la médecine traditionnelle y a sa place malgré l'absence de complémentarité de la phytothérapie à la médecine. Botanistes, phytochimistes, pharmacologues et médecins sont appelés à conjuguer leurs connaissances scientifiques pour que la phytothérapie soit une discipline thérapeutique officielle comme c'est le cas dans plusieurs pays comme la Chine, la Turquie, etc... (**Kabouche, 2005**). En Algérie, les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées principalement dans les zones rurales par les personnes âgées et qui ont encore l'expérience de certaines recettes à base de plantes (**Reguieg, 2011**).

En effet, l'action des plantes médicinales vient de leurs métabolites primaires et secondaires, et sans doute, de la synergie entre les différents composés présents (**Reguieg, 2011**).

### **3. La phytothérapie**

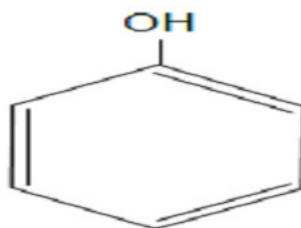
La phytothérapie est une discipline qui étudie les plantes médicinales et leurs propriétés, en vue de les utiliser dans les préparations médicamenteuses. Longtemps considéré comme une expression de la "sagesse populaire", la phytothérapie revêt aujourd'hui une valeur scientifique sanctionnée par un diplôme spécifique qui permet de se consacrer à l'étude systématique de cette discipline, de devenir un professionnel et de travailler dans les magasins spécialisés, herboristeries ou pharmacies. A l'heure actuelle, ceux qui se rendent dans une boutique d'herboriste sont donc

généralement assurés d'être reçus par une personne dûment formée, susceptible de donner des conseils et d'apporter une solution aux problèmes qui lui seront soumis (**Plantes médicinales, 1998**).

#### 4. Les substances naturelles viennent du métabolisme secondaire

##### 4.1. Les polyphénols

Les composés phénoliques ou polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal (**Dave, 2003**), sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique avec des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (**Boizot et Charpentier, 2006**) (**Figure 1**).



**Figure 1.** Structure du noyau phénol (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Les polyphénols sont présents dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons comme le jus de fruits et surtout café et thé (**Middleton et al, 2000**).

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. Les différentes classes principales de ces composés phénoliques isolés des plantes sont : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénoliques, xanthones et autres phloroglucinols (**Jensen, 1991**).

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. Ces composés sont réputés aussi pour leur caractère antioxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de plusieurs maladies. En outre, un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés biologiques.

Chez les végétaux, les polyphénols peuvent intervenir dans certains nombre de fonctions telles que: La physiologie de la plante (lignification et contrôle de la croissance). Les interactions plantes-microorganismes (avec les bactéries, les champignons, les insectes et la résistance aux rayons UV). La pigmentation des fleurs, des fruits et des graines. La fertilité des plantes et la germination du pollen. Chez l'homme, les polyphénols présents dans les aliments consommés sont

en effet, capables d'abaisser la pression artérielle, d'empêcher l'oxydation des LDL (lipoprotéines de faible densité), d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, d'empêcher l'agrégation plaquettaire et de stabiliser les cellules immunitaires (**Shun-ichi et al., 1976**). Ils ont été décrits comme étant des antioxydants, des anti-allergènes, des anti-inflammatoires, des antithrombotiques et des antitumoraux (**Bogucka-Kocka., 1999**).

## 4.2. Terpénoïdes

Le terme terpène inventé par Kekulé, vient de leur origine historique de l'arbre de terebinth : «*PistaciaTerebinthus*» (**Ayad., 2008**).

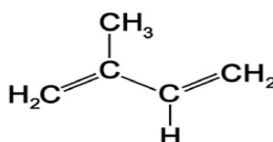
Les terpènes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq atomes de carbones (**Hopkins., 2003**), synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux (**Benaissa., 2011**).

Ce sont des hydrocarbures naturels de structure cyclique ou de chaîne ouverte, largement répandus dans le règne végétal, provenant de la voie de l'acide mévalonique (**Bhatetal., 2005**). Leur particularité structurale est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ) dérivées du 2-méthylbutadiène (**Bakkalieta.,2008**) (**Figure2**).

La famille des terpènes comprend des hormones (Gibbérellines et acide abscissique), des pigments caroténoïdes (Carotène et xanthophylle), des stérols (Ergostérol, sitostérol, cholestérol), des dérivés de stérols (Hétérosides digitaliques), le latex (qui est à la base du caoutchouc naturel) ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur gout (**Hopkins, 2003**).

Selon **Hernandez-ochoa. (2005)**, Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en :

- Monoterpènes : formés de deux isoprènes ( $C_{10}H_{16}$ ).
- Sesquiterpènes : formés de trois isoprènes ( $C_{15}H_{24}$ ).
- Diterpènes : formés de quatre isoprènes ( $C_{20}H_{32}$ ).
- Tétraterpènes : formés de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes.
- Polyterpènes : formés de ( $C_5H_8$ ) n, ou, (n de 9 à 30).



**Figure 2.** Structure de l'unité isoprénique ( $C_5H_8$ ) (**Solène, 2012**)

### 4.3. Alcaloïdes

Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale à caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe, parmi les alcaloïdes on a » tels que lamorphine, coca et caféine (**Raven et al., 2000 ; Badiaga., 2011**).

Les alcaloïdes formant un groupe très large, ils possèdent presque tous unemolécule d'azote (-N—) qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains sontdes médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées. C'est le cas d'undérivé de la pervenche de Madagascar (*Vincaroseasyn. Catharanthusroseus*)employé pour traiter certains types de cancer. D'autres alcaloïdes, comme l'atropine,présente dans la belladone (*Atropa belladonn*), ont une action directe sur le corpsactivité sédative, effets sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (**Iserin, 2001**).

## II. Monographie des plantes étudiées

### 1. La plante médicinale *Centaureaparviflora*(Astéracées)

#### 1. 1.Généralités sur la famille des Astéracées

La famille des composées fait partie des plantes médicinales qui ont acquis une très grande importance, et constitue la plus vaste subdivision du règne végétal. Cette famille comprend en effet 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces. Cette immensité systématique est disponible par sa répartition à travers tous les continents et se caractérise par son pouvoir d'adaptation aux milieux climatiques et pédologiques les plus divers (**Bremer, 1994**).

En Algérie, ellecompte environ 109 genres et plus de 408 espèces (**Quezel et Santa, 1963**). Cette vastefamille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires (la Laitue,l'Artichaut, l'Endive, la Chicorée, l'Estragon et le Tournesol,..... etc.), ornementale(Marguerite, Dahlia, Chrysanthème et l'Aster), et pharmaceutiques (l'Arnica, la Camomille,le Pied de chat, le Tussilage) (**Gaussen et Leroy, 1982**).

#### 1.2. Habitat et distribution géographique de *Centaureaparviflora*

Le genre *Centaurea* se rencontre en Europe méridionale, le bassin méditerranéen, l'ouest de l'Asie et le continent Américain (**Mabberley, 1987**). Dans la nouvelle flore d'Algérie, Quezel et Santa. (1963) ont reporté et décrit 45 espèces du genre *Centaurea* sur le sol Algérien (**Quezel and Santa, 1963**).

La plante *C.parviflora* est assez rare : en sol algérois, Oran et Tlemcen, Constantine, Hauts plateaux. Elle existe en Algérie et en Tunisie.

### 1.3. Description botanique et classification de *Centaurea parviflora*

*Centaurea parviflora* appartient à la famille des Astéracées. Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. Les Asteraceae (anciennement appelées Composées) sont une famille appartenant aux Dicotylédones (**Quezel et Santa, 1963**).

Les Astéracées sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille.

Les centaurees sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, à feuilles alternes. Comme pour toutes les composées, les fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitule multiflores homomorphes ou dimorphes, entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Les fleurs sont toutes tubulées, multiflores en cinq lobes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. Ces fleurs entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées et inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Le réceptacle plan ou sub plan est garni de soies abondantes. Les fruits sont des akènes longs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque (**Quezel and Santa, 1963**).

Plantes suffrutescentes à la base, de 40-60 cm, très rameuses, formant des buissons serrés, intriqués. Feuilles supérieures non décurrentes sur la tige. Petits capitules de 5 mm de large sur 15 mm de long, solitaires. L'appendice des bractées sans partie scarieuse blanchâtre ou à partie scarieuse peu marquée; à 8-12 laciniures latérales. Appendices à épine médiane fortement récurvée. Fleurs supérieures. Akènes pubescents, ventrus, noirs, à 4 stries marquées. Aigrette également le 1/3 de l'akène (**Figure 3**).



**Figure 3.** Image de l'espèce *Centaurea parviflora*

#### 1.4. Travaux antérieurs et usages thérapeutiques sur *C.parviflora*

De nombreuses études phytochimiques sur des espèces du genre *Centaurea* ont révélé sa richesse en métabolites secondaires comme les stéroïdes (stérols) (Picher et al., 1984 ; Flamini et al., 2002 ), les composés phénoliques, quelques alcaloïdes (Seghiri et al., 2006 ; Shoeb et al., 2006) et les lactones sesquiterpéniques ainsi que les flavonoïdes qui sont les principaux métabolites secondaires de ces espèces (Marco et al., 2005 ; Seghiri et al., 2006). Des travaux antérieurs sur *C. parviflora* ont mené à l'isolement et la détermination de quatre flavonoïdes de type flavone rassemblés dans le tableau 01 de 84 – 87 et détecté la présence de lactones sesquiterpéniques.

La plante *C.parviflora* est un excellent accumulateur de molécules de type terpénique et flavoniques. Le criblage phytochimique de l'espèce a révélé la présence des flavonoïdes, tanins, triterpènes, saponines et des leucoanthocyanes dans ces parties tiges et fleurs (Chouh et al., 2015).

Le genre *Centaurea* présente un grand intérêt thérapeutique, notamment comme source naturelle de sesquiterpènes lactones et flavonoïdes qui sont les constituants majoritaires de ce genre.

Le genre *Centaurea* est connu depuis longtemps dans la médecine populaire par sa richesse en substances naturelles curatives, utilisées contre plusieurs maladies tels que le diabète, la malaria ainsi que les maladies de la peau et du foie. L'investigation biologique des espèces du genre *Centaurea*, a montré que ces derniers possèdent diverses activités biologiques, comme, le pouvoir anti-inflammatoire (Kupchen et al., 1971 ; Catherine et al., 2006). Aussi, les espèces *C. malacitana* et *C. corcubionensis* possèdent respectivement des propriétés anti-inflammatoires, digestives, diurétiques, astringentes, cholagogues et peuvent être utilisées seules ou mélangées avec d'autres plantes en médecine traditionnelle (Barrero et al., 1997 ; Orallo et al., 1998).

Dans la littérature, plusieurs espèces du genre *Centaurea* sont référencées pour leur large utilisation en médecine traditionnelle (Kamanzi et al., 1983 ; Yesilada, 2002). Nous pouvons citer: Soigner certaines maladies comme le diabète, les rhumatismes, la malaria, l'hypertension... (Mohammad et al., 2005). Des pouvoirs diurétiques, antipyrétiques, cytotoxiques et antibactériens [60]. Un pouvoir antidiabétique et anti-diarrhéique (Mohammad et al., 2005 ; Kose et al., 2007). Un pouvoir antirhumatismal (Kose et al., 2007). Effet hypoglycémiant et activité antipyrétique (Masso et al., 1979).

**Tableau 1** : Les flavonoïdes isolés de *C. parviflora* (Belbache)

R1	R2	R3	R4	Composés
OMe	OMe	OH	OMe	5,3'-dihydroxy-6,7,4'-triméthoxyflavone <b>84 Eupatorin</b>
OMe	OH	OMe	OMe	5,7-dihydroxy-6,3',4'-triméthoxyflavone <b>85 Eupatilin</b>
OMe	OMe	OMe	OH	5,4'-dihydroxy-6,7,3'-triméthoxyflavone <b>86 Cirsilineol</b>
OMe	OH	OMe	OH	5,7,4'-trihydroxy-6,3'-triméthoxyflavone <b>87 Jaceosidin</b>

## 2. La plante médicinale *Verbascum betonicifolium* Desf (Scrophulariacées)

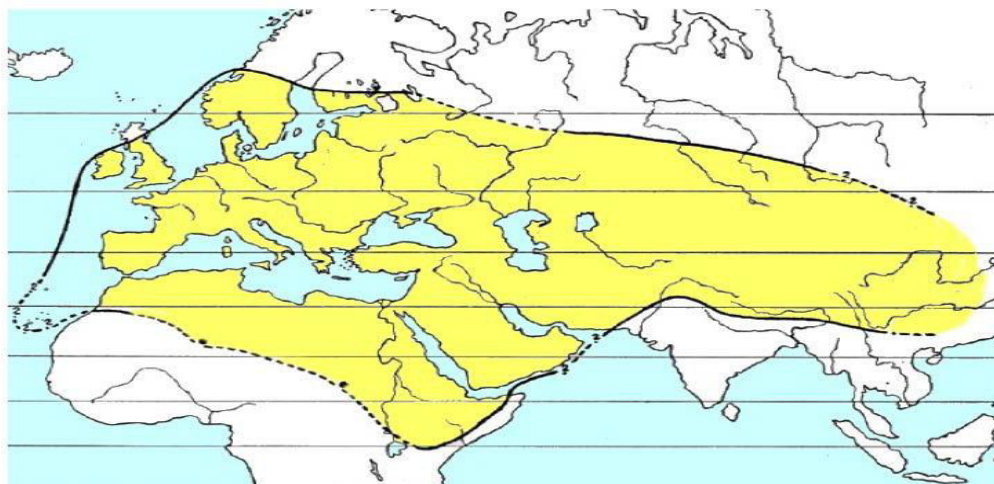
### 2.1. Généralités sur la famille des Scrophulariacées

La famille des plantes **Scrophulariacées** comprenant environ 1700 espèces, en fonction de l'interprétation taxonomique. Elles ont une répartition cosmopolite, même si elles sont plus abondantes dans les montagnes tempérées et tropicales, ou en plaine humide pour les gratioles. Elles ont un grand intérêt économique car elles sont des plantes très voyantes cultivées comme plantes ornementales pour la feuille ou la fleur ainsi que comme plantes médicinales pour plusieurs espèces, comme les scrofulaires. Les scrophulariacées sont principalement des plantes herbacées annuelles et vivaces, parfois boisées (arbustes) et seulement quelques-unes sont des plantes grimpantes. Les feuilles sont des feuilles simples, entières ou dentées sans stipules. Les fleurs sont généralement variées, hermaphrodites et irrégulières. Les fleurs sont souvent disposées en inflorescences racémeuses. Les étamines sont au nombre de 2 à 5. Le fruit est une capsule, à la fois déhiscente et indéhiscente (non ouverte). Les graines sont variées.

( <https://www.aquaportail.com/taxonomie-famille-114-scrophulariaceae.html>)

### 2.2. Habitat et distribution géographique de *Verbascum betonicifolium* Desf

Le genre *Verbascum* L. est distribué dans tous les pays autour de la mer Méditerranée, en Afrique et en Asie (**Figure 4**), avec pour centre de diversité la Turquie où le genre compte 234 espèces et un taux d'endémisme de 80% (**Davis et al., 1978**). A l'Ouest sa distribution s'arrête avec l'Océan Atlantique, avec une richesse plus importante en Espagne qu'en France. En effet, 26 espèces sont recensées en Espagne dont 4 endémiques (**Benedi, 2009**), contre une douzaine d'espèces en France dont une endémique en Corse (**Jeanmonod et Gamisans, 2007**). Au Nord de l'Europe, la Finlande constitue sa limite extrême. A l'Est il s'arrête en Chine où il compte 6 espèces, et au Sud il n'a pas été observé au-delà de l'Ethiopie et du Sahara algérien.



**Figure 4.** Aire de répartition du genre méditerranéen *Verbascum* L. (**Murbeck, 1933**)

### 2.3. Description botanique et classification de *Verbascum betonicifolium* Desf

Ce sont des plantes bisannuelles ou vivaces, rarement des annuelles ou des arbustes, atteignant une hauteur de 0,5 à 3 mètres (1,6 à 9,8 pieds). Les plantes forment d'abord une rosette dense de feuilles au niveau du sol, envoyant ensuite une grande tige florifère. Les plantes bisannuelles forment la rosette la première année et la tige la saison suivante. Les feuilles sont disposées en spirale, souvent densément poilues, bien que glabres (sans poils) chez certaines espèces. Les fleurs ont cinq pétales symétriques; Les couleurs des pétales chez différentes espèces incluent le jaune (le plus commun), l'orange, le brun-rouge, le violet, le bleu ou le blanc. Le fruit est une capsule contenant de nombreuses graines minuscules (**Figure 5**).

*V.betonicifolium* est une dicotylédone appartient à la famille des Scrofulariacées et l'ordre Lamiales.



**Figure 5.** Image de l'espèce *Verbascum betonicifolium* Desf

### 2.4. Travaux antérieurs et usages thérapeutiques de *Verbascum betonicifolium* Desf

Différentes préparations, décoctions et infusions de *Verbascum* L. sont utilisées dans la médecine traditionnelle depuis des siècles dans presque toutes les régions du monde (**Tatli et al., 2004**). Ils sont traditionnellement consommés sous forme de thé pour soulager les douleurs abdominales (**Turker et al., 2005**). Ils ont été utilisés pour le traitement des maladies inflammatoires, de l'asthme, de la toux spasmodique et d'autres problèmes pulmonaires (**Sengül et al., 2005; Tatli et al., 2005**). ., 2008; **Kahraman et al., 2010**), également pour le traitement des hémorroïdes, des douleurs rhumatismales, des infections fongiques superficielles, de l'eczéma et d'autres types d'affections cutanées inflammées et de la diarrhée, ainsi que pour des activités inhibitrices de la leucémie lymphoïde murine et des virus de l'influenza A2 et B sont considérés comme des inhibiteurs des espèces réactives de l'oxygène et des métastases tumorales (**Ucar-**

**Turker et Camper, 2004**). Ces espèces sont également utilisées dans la médecine traditionnelle turque pour traiter des problèmes respiratoires tels que la bronchite, la toux sèche et la tuberculose (**Irem et al., 2007**).

### 3. La plante medicinale *Ononis alba* Poir (Fabacées)

#### 3.1. Généralités sur la famille des Fabacées

C'est une grande famille qui regroupe environ 12 000 espèces réparties en 400 à 500 genres (**Bhattacharyya et Johri, 1998**). En Algérie, les Fabacées ligneuses occupent une place importante et jouent un rôle important dans l'équilibre du milieu naturel et la lutte contre la désertification (**Djabeur-Kaid-Harcheetal., 2007**).

La grande famille des *Fabacées*, appelée gousse ou légume, d'où le nom de légumineuses sous lequel cette famille est plus connue. La gousse est un follicule déhiscent qui s'ouvre par deux fentes longitudinales en deux valves portant chacune une rangée de graines exalbuminées. Les feuilles sont composées alternes, parfois stipulées, à pétiole épaissi à sa base, dialypétales, souvent zygomorphes et papilionacées, toujours monocarpellées. Elle est caractérisée par la présence de nodules racinaires dans lesquels se trouvent les bactéries fixant l'azote atmosphérique.

(**De Witt, 1963**)

#### 3.2. Habitat et distribution géographique d'*Ononis alba* Poir

Le genre *Ononis*, qui compte environ 75 espèces, est largement répandu dans la région méditerranéenne, les îles Canaries, l'Europe et l'Asie centrale (**Willis, 1973**). En Algérie, *O. alba* Se rencontre principalement avec d'autres espèces (**Quezel et Santa, 1963**).

#### 3.3. Description botanique et classification d'*Ononis alba* Poir

Chaque fleur consiste : 1<sup>er</sup>, en calice monophylle, campanule, et partagé en cinq dents longues et linéaire, 2<sup>eme</sup> en une corolle papilionacée, composée d'un étendard plus grand que les autres pétales, et ordinairement marquée de lignes colorées et parallèles, de deux ailes plus courtes que l'étendard, et d'une carène pointue et un peu relevée. Antérieurement, 3<sup>eme</sup> en dix étamines dont les filets sont tous réunis dans leur partie inférieure en une graine entière qui enveloppe le pistil ; 4<sup>eme</sup> en un ovaire supérieur, ovale ou biconcave, d'un style dont le stigmate est simple. Le fruit est une gousse gonflée, en filée communément un peu velue, uniloculaire, et qui renferme quelques semences réniformes (**Jean, 1783**) (**Figure 6**).

*O. alba* est une dicotylédone appartenant à la famille des Fabacées et l'ordre Fabales.



**Figure 6.** Image de l'espèce *Ononis alba* Poir

### 3.4. Travaux antérieurs et usages thérapeutiques d'*Ononis alba* Poir

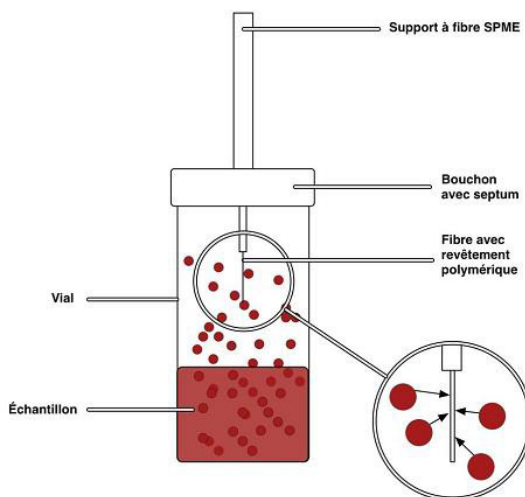
La recherche documentaire sur les espèces d'*Ononis* a montré que celles-ci possèdent des propriétés thérapeutiques intéressantes et sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner diverses maladies, telles que le traitement de la jaunisse, les troubles du système urinaire, l'herpès et la peau. Cette famille est composée de variétés horticoles et de nombreuses espèces sont récoltées pour la consommation humaine en raison de leur huile et de leurs fibres. Ils sont également utilisés comme combustible pour le bois et comme remèdes en médecine traditionnelle (Wojciechowski et al., 2004).

### III. La technique MEPS (Microextraction sur Phase Solide par Espace de Tête) (Solid Phase Micro Extraction Head Space/MS (HS-SPME-GC/MS))

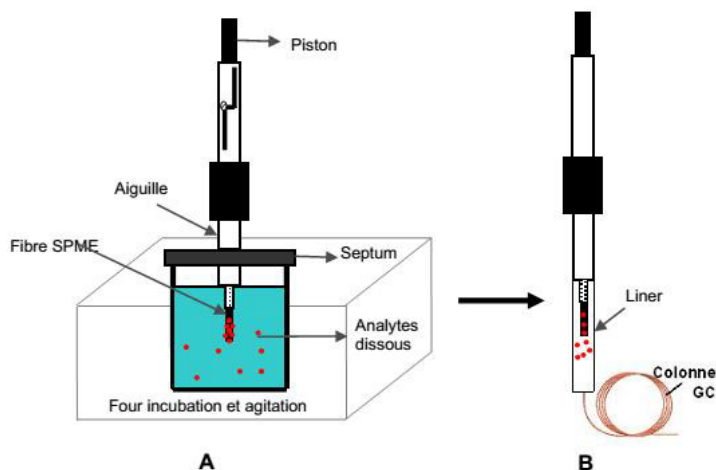
La microextraction en phase solide (solid-phase microextraction, SPME) est, à l'heure actuelle, la technique d'extraction la plus utilisée pour l'analyse de la fraction volatile. Cette technique est peu coûteuse, simple et rapide d'exécution, et possède l'avantage de pouvoir être entièrement automatisée. Elle s'effectue en une seule étape et ne requiert pas l'utilisation de solvant. De plus, elle offre une bonne sensibilité et permet une bonne sélectivité grâce à la disponibilité commerciale de plusieurs revêtements de fibres différents (Ebeler, 2012). Il a été démontré que la précision et l'exactitude des résultats analytiques obtenue par SPME sont bien souvent supérieures à celles des autres techniques préparatives utilisées en CG (Marsili, 2000). Il existe de nombreuses revues complètes et détaillées portant sur cette technique (Pawliszyn, 2000 et 2001).

La SPME se caractérise par l'utilisation d'une microfibre de silice recouverte d'une phase d'extraction solide exposée à la matrice et où s'adsorbent les composés d'intérêt (Figure 7.) (Pawliszyn, 2000). Après une durée d'extraction déterminée, la fibre est ensuite introduite dans le port d'injection de la colonne chromatographique où les analytes sont désorbés par la chaleur de l'injecteur puis injectés dans la colonne.

Les liquides peuvent être échantillonnés de deux façons soit par l'immersion totale de la fibre dans le liquide, soit par l'échantillonnage de l'espace de tête (headspace, HS). D'un point de vue thermodynamique, la technique d'extraction HS-SPME est un processus qui implique l'établissement d'équilibres de partition entre les différentes phases qui constituent le dispositif (la phase gazeuse ou headspace, l'échantillon lui-même et le revêtement de la fibre) (Pawliszyn, 2000). Les principes et la théorie derrière cette méthode d'échantillonnage sont rapportés en détails par Pawliszyn (1997).



**Figure 7.** Schéma simplifié du dispositif SPME utilisé pour l'extraction des composés volatils (points rouges) avec échantillonnage de l'espace de tête



**Figure 8.** Représentation schématique de la SPME. A : extraction des analytes. B : désorption thermique et analyse en GC-MS.

Pour les échantillons liquides et solides, il y a généralement trois phases simplifiées pendant le procédé de MEPS : une phase gazeuse (espace de tête), une phase condensée (liquide ou solide) et une phase d'adsorption (fibre). Une fibre MEPS peut être placée dans l'espace de tête ou dans la phase Liquide d'un échantillon Liquide (Figure 8.). En générale, la vitesse d'adsorption est plus

élevée quand la concentration du composé est plus grande. Si le composé existe principalement dans la phase liquide, la méthode d'échantillonnage dans le liquide sera plus sensible que l'échantillonnage dans l'espace de tête et vice versa. Ainsi, les composés les plus volatils peuvent être séparés en utilisant le mode d'adsorption dans l'espace de tête. L'échantillonnage par MEPS dans l'espace de tête est préférable si les échantillons contiennent des composés non volatils tels que des sels et des protéines. Pour des composés de très faible volatilité, l'échantillonnage dans le liquide est recommandé (**Penton, 1997; Yang et Peppard, 1994; Berg, 1993**).

La SPME a été appliquée avec succès à une grande variété d'analytes dans les domaines de l'environnement, de l'alimentaire ainsi que dans le domaine pharmaceutique ou biomédical. Dans sa première période de développement, la plupart des applications de la SPME étaient en chimie environnementale. La SPME a été principalement utilisée pour l'extraction des composés organiques volatils et semi-volatils.

La SPME a été largement utilisée dans le domaine alimentaire que ce soit pour l'évaluation de la qualité nutritionnelle, la caractérisation d'additifs ou l'analyse des contaminants présents à l'état de trace. La SPME a aussi montré sa performance dans les secteurs pharmaceutiques et biomédicaux. Une application connue du grand public est l'analyse des amphétamines dans l'urine. Ces analytes ont été également détectés dans le sang, la salive et les cheveux humains.

## Chapitre II : Materiel et Méthodes

### 1. Matériel végétal

#### 1.1. Critères de sélection des plantes

Pour la sélection de nos plantes, nous avons considéré un certain nombre de critères comme l'apport de la littérature, pour le présent travail, nous avons sélectionné trois plantes médicinales de l'Algérie ayant un fort potentiel d'activité du fait de leurs usages traditionnels largement répandus, aussi le manque des études sur ces espèces.

#### 1.2. La récolte des plantes

Le matériel biologique utilisé est constitué de trois espèces de plantes médicinales :

*Centaurea paviflora* (asteraceae): la partie aérienne (feuilles, fleurs graines et tiges) a été récolté dans les montagnes du Tiaret dans le nord-ouest de l'Algérie (Juin 2018).

L'identification taxonomique a été confirmée par **Dr MD Miara** du département de biologie de l'Université de Tiaret, utilisant la flore d'Algérie (**Quezel et Santa, 1962**), et un spécimen d'herbier a été archivé à l'Herbarium de l'Université Tiaret.

*Verbascum betonicifolium* (Scrophulariaceae): la parties aérienne (feuilles, fleurs et tiges) a été récoltés a Bouira en Algérie, (Mai 2018).

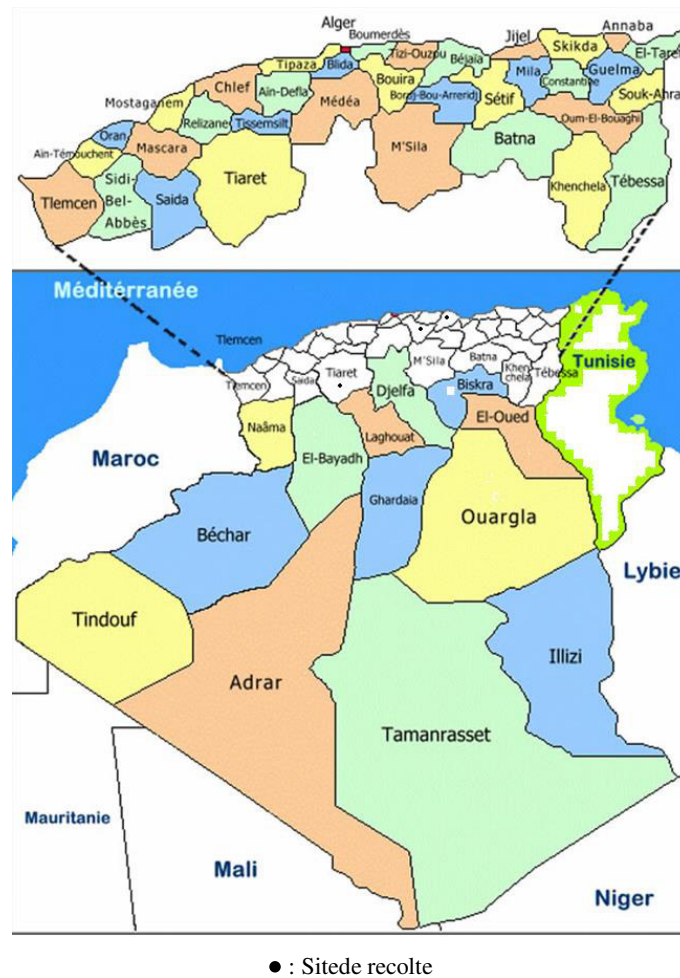
L'identification taxonomique a été confirmée par le **Dr Merabti Karim** du département de biologie de l'Université de M'sila, utilisant la flore d'Algérie (**Quezel et Santa, 1962**).

*Ononis alba* (Fabaceae) la partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) a été récoltée à Bejaia en Algérie (Juin 2018).

L'identification taxonomique a été confirmée par **Dr. Khellaf Rebbas** au département de biologie de l'université de M'sila, utilisant la flore d'Algérie (**Quezel et Santa 1962**), et un spécimen d'herbier a été archivé à l'herbier de l'université de M'sila.

#### 1.3. Préparation des échantillons

Après la récolte du matériel végétal, nous avons procédé au séchage à la température ambiante (20-25°C) pendant environ un mois à l'air libre, jusqu'à la stabilisation de leur masse afin d'éviter d'éventuelles risques d'oxydation des polyphénols et de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Ensuite, les échantillons ont été récupérés dans des sacs propres et stockés à l'abri de la lumière et d'humidité.



**Figure 9.** Localisation géographique des sites de récolte des plantes étudiées en Algérie

## 2. Préparation d'extraits bruts par macération

Le matériel végétal a été broyé à l'aide d'un broyeur puis tamisé par un tamis de 2 mm. La poudre obtenue est conservée à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction.

Le solvant d'extraction a été choisi de manière à solubiliser un maximum de composés.

Le solvant d'extraction qui a ainsi été testés est: l'éthanol (EtOH) qui possède une polarité et qui va permettre d'obtenir un extrait polaire.

Le ratio solide : liquide est 1/10 (mg / mL) (**Michel, 2011**).

Une quantité de 50g de la poudre végétale a été mélangée avec 150 mL du solvant dans un Erlenmeyer.

Le mélange est maintenu sous une agitation magnétique pendant 30min à température ambiante. La solution obtenue est ensuite filtrée sur papier filtre (Wattman N°1 de diamètre 0.2 µm) sous vide.

Le filtrat à été ensuite récupéré, l'EtOH est concentré sous vide à 60 °C à l'aide d'un rotavapeur (BÜCHI), l'eau éliminé par l'lyophilisation, l'extrait sec a été ensuite récupéré, pesé, étiqueté et conservé à +4 °C jusqu'à l'utilisation.

### 3. Détermination du rendement des extractions

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation) (Mohammedi, 2006).

Le rendement d'extraction (%) est calculé par la formule ci-dessous :

$$R (\%) = (\text{Masse de l'extrait sec} / \text{Masse du matériel végétal utilisé}) * 100.$$

## 4. Analyse chromatographique

### 1. Chromatographie sur couches minces

#### Principe

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique rapide, et méthode de séparation des composés. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques.

La chromatographie sur couche mince est une méthode physico-chimique rapide repose sur les phénomènes d'adsorption, d'interactions et de polarité. Un mélange de composés est placé sur un support solide (phase stationnaire) qui est plongé dans un solvant (phase mobile) qui, par capillarité, se déplace le long de la phase stationnaire (Diallo, 2005). La phase mobile va entraîner les composés qui migreront à une hauteur variant en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. On peut ainsi caractériser les composés selon leur R<sub>f</sub> (Rapport frontal: rapport de la distance de migration du composé par rapport à celle du solvant).

Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents, permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées.

Elle permet également de suivre la progression d'une réaction étant donné qu'elle indique le nombre de composants dans un mélange réactionnel [Falleh et al., 2008]. En effet, lorsque le système de solvant ou l'éluant est bien choisi.

#### Mode opératoire

Les polyphénols et particulièrement les flavonoïdes ont été mis en évidence par chromatographie sur couche mince suivant le protocole décrit par Wagner (1996) et repris par Bengag (2009).

On utilise les plaques en aluminium recouvertes de gel de silice Merck 60F254,

La cuve de migration est partiellement remplie du mélange de solvant (phase mobile) afin qu'elle soit saturée en vapeur d'éluant ce qui facilite et améliore la migration. Une ligne de dépôt est

tracée à 1,5 cm du bord, les échantillons y sont déposés, puis la plaque est mise en contact avec la phase mobile dans la cuve jusqu'à migration de la phase mobile à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque. Les systèmes de solvant que nous avons employés le plus couramment sont les suivants (TAB):

Ces compositions ne sont bien sûr qu'indicatives et peuvent être adaptées aux besoins spécifiques d'une analyse.

Les CCM sont analysées en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et après révélation par les réactifs appropriés.

Après leur développement, les chromatogrammes sont révélés par le réactif de Folin-Ciocalteu suivi d'une fumigation à la vapeur d'ammoniaque (pour les polyphénols) et avec le réactif NEU (NP/PEG) (pour les flavonoïdes et acides phénoliques). Les plaques sont observées sous lumière visible et sous une lampe UV 365 nm, après révélation par les réactifs.

L'utilisation de différents réactifs sur les plaques de chromatographie sur couche mince après élution, permet de comparer les profils des fractions séparées et de les rassembler en fonction de leurs similitudes, d'obtenir des renseignements supplémentaires sur le type d'une molécule (cas de réactifs spécifiques) et éventuellement permettre de localiser certains composés, invisibles sans dérivatisation chimique.

Les principaux réactifs utilisés sont montrés dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2.** Systèmes solvants utilisés dans les séparations par (CCM)

N	Les systèmes solvants	Abréviation	Rapport (v/v)	
1	Toluene/Chloroforme/Méthanol	Flvonoids	(4/4/1) (v/v/v)	<b>Aslam et al., 2016</b>
2	Chloroforme / Méthanol	-	(10/1) (v/v)	<b>Wang et al., 1999</b>
3	Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau	Poly/ Flvonoids	(8/1/1) (v/v/v)	<b>Mbaïhougadóbé et al., 2017</b>
4	Méthanol/ Eau	Polyphenols	(7/3) (v/v)	<b>Fernando, 1993</b>
5	Butanol/Acide acétique/Eau	Flvonoids	(40/10/50) (v/v/v)	

### Révélation et calcul du rapport frontal (Rf)

Après séchage à l'air libre, les plaques ont été révélées par deux méthodes:

1<sup>ère</sup> méthode (révélation chimique) : Révélation des taches à l'aide d'un révélateur chimique, solution d'acide sulfurique (20 : 80 ; v : v).

2<sup>ème</sup> méthode (révélation physique) : Révélation des taches sous une lampe UV (365nm).

Dans tous les cas, les positions des taches (spots) colorées doivent être notées en les cerclant juste à la fin de la chromatographie car certains produits disparaissent avec le temps.

Enfin calculer le rapport frontal (Rf) pour chaque spot par la relation suivante:

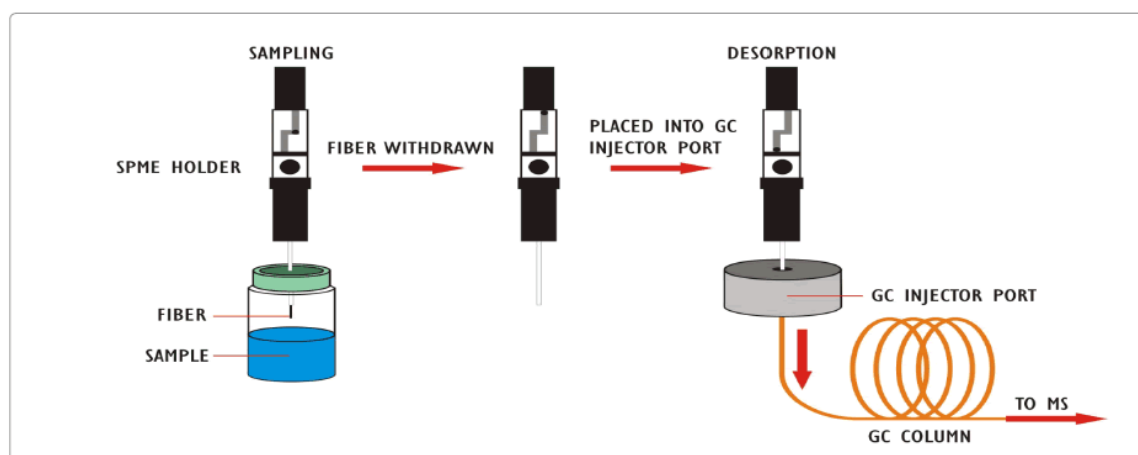
$$R_f = \text{Distance parcourue par le constituant} / \text{Distance parcourue par l'éluant}$$

## 2. Analyse avec MEPS (Microextraction sur Phase Solide par Espace de Tête) (Solid Phase Micro Extraction Head Space/MS (HS-SPME-GC/MS))

Les travaux d'analyse sont faits au laboratoire de l'université de Madere au Portugal.

Les composés volatils des parties aériennes des plantes étudiées ont été isolés par microextraction en phase solide (SPME) en utilisant une fibre recouverte de phase divinylbenzène / carboxène / polydiméthylsiloxane 50 / 30mm (CAR / PDMS) et analysés par GC-MS (**Figure10**).

La fibre a été conditionnée avant utilisation par insertion dans l'injecteur de CPG à 250 ° C pendant 1 h et nettoyée avant chaque utilisation. La température d'extraction choisie était de 50 ° C afin de donner une meilleure estimation du profil des arômes. L'équilibre des composés d'arôme entre la fibre d'enrobage de SPME et l'espace libre de chaque échantillon a été déterminé en triple. Des parties aliquotes de 0,5 g de parties aériennes séchées ont été placées dans un ensemble de flacons (capacité 10 ml) scellés par des septa en téflon et des bouchons en aluminium. La fibre a été insérée dans l'espace libre des flacons contenant les parties aériennes séchées de thym à 30 ° C pendant 5, 10, 15, 20, 30, 50 et 60 minutes. La fibre a été désorbée à 250 ° C pendant 3 minutes dans l'injecteur du GC.



**Figure10.** Protocole de l'analyse par Microextraction sur Phase Solide par Espace de Tête

## 5. Evaluation des activités antimicrobiennes

La méthode de diffusion sur disque a été employée pour la détermination *in vitro* de l'activité antimicrobienne. Nous avons préféré de les tester contre plusieurs bactéries, Gram<sup>+</sup> Gram<sup>-</sup>, et une levure.

### 1. Généralités

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). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria.

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 µm. 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 (Nauciel et Vildé., 2005).

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, thérapie naturelle et la conservation des aliments (Sagdicet al., 2002). Il est, sans doute, très complexe, et peut impliquer de multiples modes d'actions tels que l'inhibition des enzymes microbiennes extracellulaires, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne, l'inhibition du métabolisme microbien (Milane, 2004), dégradation de la paroi cellulaire, perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite des composants cellulaires, l'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN (Zhang et al., 2009), des protéines, des lipides, et de la fonction mitochondriale (Balentine et al., 2006), ainsi que la formation des complexes avec la paroi cellulaire (Gangouépiéboji, 2007).

Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes et de l'arrangement de la membrane externe (Shan et al., 2007).

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits isolés des plantes étudiées par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de huit (8) germes non pathogènes.

#### *Escherichia coli*

C'est une bactérie à Gram<sup>-</sup>, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, (Kaper et al., 2004), de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm, *E. coli* représente la

bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (**Percival, 2004**).

### ***Staphylococcus aureus***

Ce sont des cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$ , de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë, intoxication alimentaire (**Dworkin et Falkow, 2006**).

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (**Percival, 2004**). *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales (**Van Delden et Iglewski, 1998**).

### ***Candida albicans***

Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levuriformes. *Candida albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo-vaginal, (ou de la bouche). Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *Candida albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80 % des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco-cutanées (**Delorme et Robert, 1997**).

### ***Aspergillus sp***

*Aspergillus sp.* sont les espèces fongiques les plus communes qui sont capables de produire des mycotoxines dans les produits alimentaires. Les mycotoxines sont connues pour être une cause puissante capable de produire un cancer hépatique chez les animaux et les humains. La présence et la croissance des champignons peuvent entraîner la détérioration et la réduction de la qualité et la quantité des aliments (**Rasooli et Abyaneh, 2004**).

Dans différentes parties du monde, il y a une inquiétude croissante au sujet de la contamination des aliments, l'exposition environnementale et professionnelle aux spores fongiques de différentes espèces, en particulier à l'aflatoxine produit par ces espèces fongiques comme le cas d'*A. flavus* et *A. niger* (**Takahashi et al., 2004**) ; qui sont des ascomycète filamenteux qui ont une distribution ubiquitaire dans l'environnement. Ils sont connus par ses implications dans les infections

opportunistes humaines. Le mode de la transmission principal aux humains est par l'inhalation des conidies (Desai et Ghosh, 2003). En plus de l'inhalation, une voie secondaire de transmission a été rapportée soit par contact avec la peau ou à travers une blessure (Krishnan et al., 2009).

## **2. Test de l'activité inhibitrice**

Cette manipulation comporte les étapes suivantes:

- \*Préparation d'une jeune culture bactérienne (la purification) ;
- \*Couler dans les boites de pétri une quantité de gélose nutritive équivalente à 13 ou 15ml;
- \*Prélever à l'aide d'une pipette pasteur une colonie bactérienne bien isolée et réaliser des stries séries de bactérie (souche de référence) ;
- \*Incuber par la suite à 37°C pendant 24 h.

### **Préparation des disques**

- \*Préparer les disques de papier filtre de 6 mm de diamètre (Whatman N° 1) ;
- \*Stériliser les disques à l'autoclave, à 120°C pendant 20 minutes ;

### **Test d'activité antibactérienne ;**

- \*Couler dans les boites de pétri une quantité de milieu de culture de Muller Hinton équivalente à 13 ou 15 ml;
- \*Après la gélification des boites, prélever à l'aide d'un écouvillon une colonie bactérienne bien isolée ;
- \*Transvaser le contenu de l'écouvillon dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif stérile, et laisser reposer ;
- \*Laisser les boites entrouvertes devant la flamme jusqu'à complète solidification ;
- \*Transvaser le contenu de l'onse dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif stérile ;
- \*Déposer quelques gouttes de la suspension bactérienne (inoculum) sur la surface de la gélose, puis étaler à l'aide un râteau et s'assurer que la surface de la gélose est bien séchée ;
- \*A l'aide d'une pipette pasteur on réalise des stries séries de bactérie (souche de référence) à partir d'une culture bactérienne on choisissant une colonie bactérienne bien isolée ;
- \*Déposer à l'aide d'une pince stérile les disques (trois disques par boite), imprégnés d'extrait végétal, sur la surface de la gélose ;
- \*Placer les boites de pétri à basse température (+4°C) pendant 15 à 30mn afin de permettre aux extraits de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier ;
- \*Retirer les boites du réfrigérateur et les placer à l'étuve, à la température optimale de croissance du germe à étudier (37 °C) pendant 24 h. Les boites doivent être placées couvercle en bas.

### **Lecture des résultats**

\*Après 24 heures d'incubation, mesurer à l'aide d'une règle graduée le diamètre d'inhibition des bactéries autour des disques. Le diamètre (mm) de la zone entourant le disque est proportionnel à la sensibilité du germe étudié.

Nous avons utilisé la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide, Muller Hinton, contre la culture bactérienne. Le pouvoir antibactérien des extraits a été estimé en termes de diamètre de la zone d'inhibition.

Disque de papier préalablement imprégné dans l'extrait des trois plantes médicinales.

## **6. Analyse des données**

Les résultats obtenus seront présentés sous la forme des tableaux par le biais du logiciel Excell 2010.

### Chapitre III : Resultats et Discussion

#### 1. Rendement et resultats d'extraction

Les résultats du rendement d'extraction des trois plantes étudiées (*C. paviflora*, *O. alba* et *V. betonicifolium*) par macération avec EtOH sont représentés dans le **tableau III**

**Tableau III.** Rendement d'extraction (%) d'*C. paviflora*, *O. alba* et *V. betonicifolium* par macération avec EtOH

Plante	Aspect	couleur	Rendement
<i>C. paviflora</i>	Pâte collante	Verte foncée	2.36%
<i>V. betonicifolium</i>	Pâteux	Verte	2.16%
<i>O. alba</i>	Pâteux	Verte	2.28

Les rendements de l'extraction varient de 2.16 à 2.36 %, dans laquelle l'extrait de *C. paviflora* a donné le meilleur rendement que ceux des deux autres espèces.

#### 2. Analyse qualitatif des composés phénoliques par chromatographie sur couches minces (CCM)

Pour une caractérisation partielle de nos extraits éthanoliques, une CCM a été réalisée. Avec la variation de système de solvants nous sommes arrivés à une bonne séparation avec les systèmes.

Après le développement du chromatogramme, et lorsque le front du solvant D'élution a atteint la ligne supérieure, la plaque a été retirée, séchée et examinée sous la Lampe UV à 365nm afin d'avoir une identification du nombre de constituants présents (**Bougandoura, 2011**).

L'analyse qualitative après CCM, révélation chimique et visualisation sous UV à 366 nm, a permis de mettre en évidence de nombreuses taches (spots) colorées surtout en bleu, mauve, jaune et rose. Ces trois colorations confirment la présence des composés phénoliques (**Markham, 1982**).

D'après les résultats (**Tableau IV, Figure 11**) on peut noter les remarques suivantes :

- Le nombre de taches indique que la quantité des composés phénoliques et des dans les deux plantes *C. Paviflora* et *O. alba* est plus élevée que celle de *V. betonicifolium*.

- Ce résultat est en accord avec ceux de certains travaux avec d'autres plantes **Markham, (1982)**.

- Le nombre de taches dans *C. paviflora* est plus élevé que celui dans *O. alba*, cela confirme que cette plante renferme les composés phénoliques plus.

- Le nombre de taches dans le système acétate d'éthyle et dans le système toluène est plus élevé que celui dans les trois d'autre système, cela signifie que la plante *C. paviflora* est riche en composés phénoliques type Anthocyanidine-3-glycosides et Anthocyanidine-3,5-diglycosides. Cela

renforce ce que nous l'avons observé précédemment sur l'activité antibactérienne ou deux zones d'inhibitions étaient bien observables dans l'extrait de *C. paviflora*

Enfin, nous pouvons conclure que les résultats de la CCM confirment la présence des composés phénoliques dans l'extrait de la plante de *C. paviflora* et renforce également ce que nous avons obtenu précédemment.

**Tableau IV.** Résultats de la CCM après révélation avec UV 366 nm

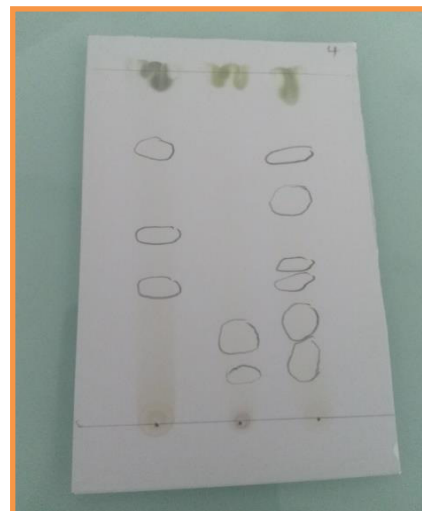
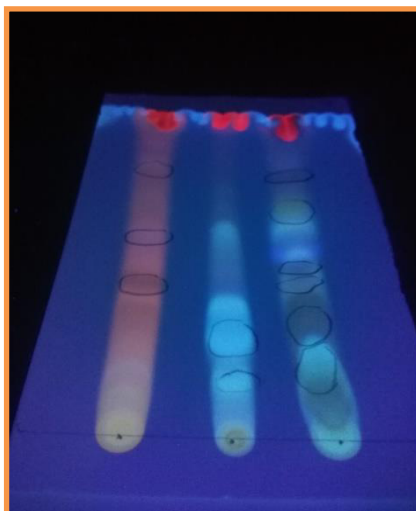
	<i>C. paviflora</i>		<i>V. betonicifolium</i>		<i>O. alba</i>	
	RF	Uv/366nm	RF	Uv/366nm	RF	Uv/366nm
<b>Système 1</b> <b>Toluene/Chloroforme/Méthanol</b>	0.12	Rose pale	0.12	Rose	0.06	Mauve
	0.18	Bleu pale	0.31	Rose	0.17	Violet
	0.56	Rose	0.41	Rose	0.22	Bleu
	0.6	Rose	0.51	Rose	0.28	blancfluorescent
	0.65	Bleu	0.75	Violet	0.33	nt
	0.78	Violet	0.93	Bleu	0.45	Violet
	0.95	Bleu pale			0.5	Violet
					0.58	Rose
				0.65	Violet	
				0.76	Rose	
				0.93	Bleu	
					Violet	
					Bleu	
<b>Système 2</b> <b>Chloroforme / Méthanol</b>	0.29	Mauve	0.12	Mauve	0.15	Mauve
	0.73	Rose pale	0.24	Mauve	0.35	Mauve
			0.67	Rose	0.62	Gris
					0.66	Rose
					0.7	Bleu blanc fluorescent
				0.83	gris	
<b>Système 3</b> <b>Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau</b>	0.12	Bleu	0.11	Bleu blanc fluorescent	0.34	Gris
	0.24	jaunatre	0.2	fluorescent	0.48	Mauve
	0.34	Gris		Bleu blanc fluorescent	0.74	Mauve
	0.39	Gris				
	0.6	Gris				
	0.44	Jaune				
0.74	Bleu blanc fluorescent					
	Gris					
<b>Système 4</b> <b>Méthanol/ Eau</b>	0.88	Gris sombre	0.41	Rose	0.43	Mauve
			0.76	Mauve		
<b>Système 5</b> <b>Butanol/Acide acétique/Eau</b>	0.31	Gris	0.51	Bleu	0.52	Violet
	0.4	Gris			0.59	Mauve
	0.52	somber			0.72	Violet
	Bleu blanc fluorescent					



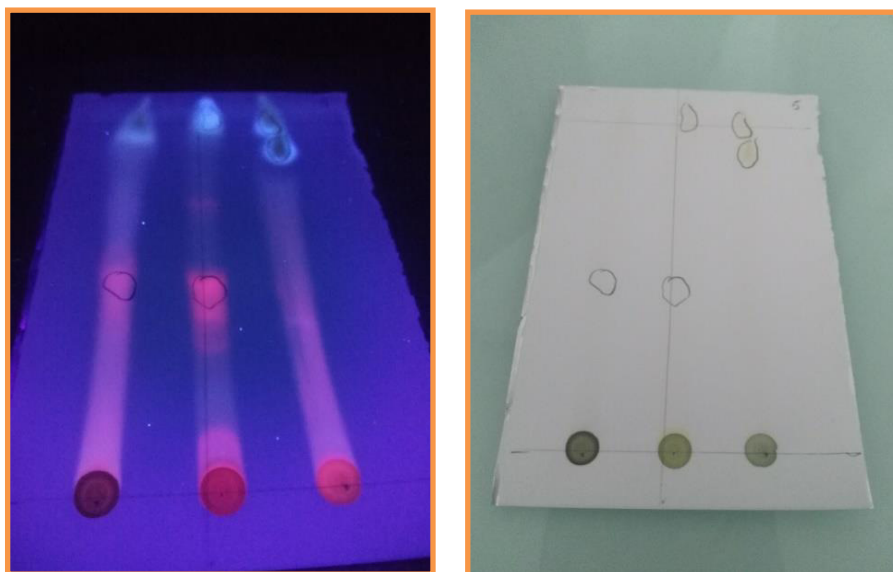
Plaque CCM de avec le système :Toluene/Chloroforme/Méthanol



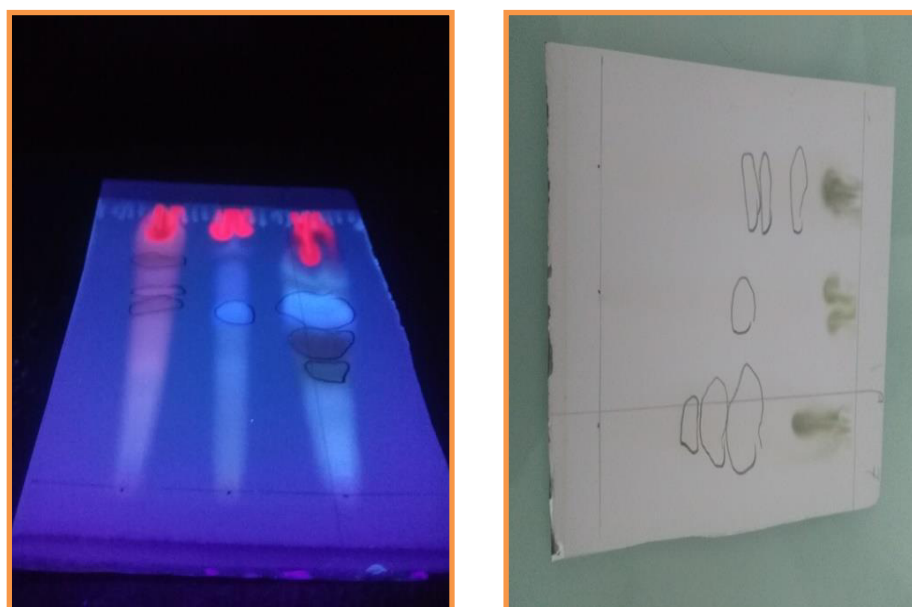
Plaque CCM avec le système : Chloroforme / Méthanol



Plaque CCM avec le système : Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau



Plaque CCM avec le système : Méthanol/ Eau



Plaque CCM avec le système : Butanol/Acide acétique/Eau

**Figure11.** Photos des Résultats de la CCM après révélation avec UV 366 nm

### 3. Resultats d'analyse par Microextraction sur Phase Solide par Espace de Tête (HS-SPME-GC/MS) (Solid Phase Micro Extraction Head Space/MS) (HS-SPME-GC/MS)

MPSE est une technique rapide, sans solvant, qui permet l'échantillonnage rapide et facile des composés volatils. Au moyen de cette technique, nous avons étudié les substances volatiles émises par les différentes parties de trois especes montrant la différence de composition.

Les composés aromatiques des parties aériennes entières fraîches, congelées et sèches de (*C. paviflora*, *V. betonicifolium* et *O. alba*), extraits par HS-SPME en utilisant une fibre CAR / PDMS, puis analysés par GC / FID et GC / MS, sont répertoriés dans les **tableaux V-VII**.

On constate selon les résultats de l'analyse HPMSE des trois plantes les remarques suivantes :

La plante *C. paviflora* renferme le nombre le plus élevé des composés identifiés qui est 55 composés puis la plante *V. betonicifolium* avec 47 composés identifiés, Par contre *O. alba* est la plante qui renferme le nombre le moins élevé avec que 33 composés identifiés.

En ce qui concerne la qualité des composants identifiés par l'analyse HPSME on peut dire que les trois plantes renferment presque les mêmes types de composés qui sont des :

Aldehydes, alcools, furanes, cétones et acides carboxyliques.

Pour l'espèce *O. alba*: Au total, 33 composants volatils ont été identifiés dans la partie aérienne entière d'*Ononis alba* dont 11 aldéhydes, 5 acides carboxyliques, 4 alcools, 4 cétones, 3 esters, 3 hydrocarbures, 2 furanes et 1 sulfure (**Tableau V**).

1. Aldéhydes: Composés: propanal, 2-méthylbutanal, 3-méthylbutanal, pentanal, 2-buténal, hexanal, trans-2-penténal, trans-2-hexénal, octanal, nonanal, décanal,

2. Acides carboxyliques: acide acétique, acide propanoïque, acide isovalérique, acide hexanoïque, acide octanoïque.

3. Alcools: Cis-3-hexénol, nonanol, benzène-méthanol, benzène-éthanol.

4. Cétones: 1-pentène-3-one, acétoïne, 6-méthyl-5-heptène-2-one, ionone

5. Esters: caprylate d'éthyle, décanoate d'éthyle, acétate de phényléthyle

6. Hydrocarbures: heptane, 2-thiapropane, 2,2,4,6,6-pentaméthylheptane.

7. Furanes: 2-éthylfurane, dihydroactinidiolide

8. Soufre: diméthylsulfoxyde

Pour l'espèce *V. betonicifolium*: Au total, 47 composants volatils ont été identifiés dans la partie aérienne entière de *V. betonicifolium* dont 13 aldéhydes, 5 acides carboxyliques, 16 alcools, 6 cétones, 1 hydrocarbure et 6 furanes (**Tableau VII**).

1. Aldéhydes: Composés: Butanal, propanal, 2-méthylbutanal, 3-méthylbutanal, pentanal, hexanal, trans-2-penténal, Heptanal, trans-2-hexénal, Trans-2, trans-4-heptadienal, Cis-4-hepten-1-al, nonanal, décanal.

2. Acides carboxyliques: acide acétique, acide propanoïque, acide isovalérique, acide hexanoïque, acide octanoïque, Acide pentanoïque.

**Tableau V:** Profil d'arôme (pourcentages des composés identifiés) des parties aériennes d'*O. alba* par analyse HS-SPME / GC-MS (fibre: carboxen polydiméthylsiloxane-divinyl benzene (CAR PDMSDVB))(Dr.Bendif)

No.	Composés	LRI	LRI Lit	Groupe de composés	%
1	Heptane	783	859	Hydrocarbons	0,415
2	2-thiapropane	805	773	Hydrocarbons	5,711
3	Propanal	829	816	Aldehydes	0,817
4	2-methylbutanal	934	937	Aldehydes	4,940
5	3-methylbutanal	939	957	Aldehydes	6,646
6	2-ethylfuran	977	983	Furans	0,738
7	2,2,4,6,6-pentamethylheptane	990	989	Hydrocarbons	0,174
8	Pentanal	1006	935	Aldehydes	7,474
9	1-penten-3-one	1052	1030	Ketones	0,993
10	2-butenal	1076	1086	Aldehydes	0,540
11	Hexanal	1123	1094	Aldehydes	3,592
12	Trans-2-pentenal	1172	1147	Aldehydes	0,638
13	Trans-2-hexenal	1257	1238	Aldehydes	2,268
14	Acetoin	1308	1292	Ketones	0,584
15	Octanal	1315	1303	Aldehydes	0,848
16	6-methyl-5-hepten-2-one	1349	1341	Ketones	1,225
17	Cis-3-hexenol	1377	1366	Alcohols	0,889
18	Nonanal	1386	1374	Aldehydes	3,123
19	Ethyl caprylate	1412	1415	Esters	4,240
20	Acetic acid	1423	1427	Carboxylic acid	14,131
21	Decanal	1444	1472	Aldehydes	1,295
22	Propanoic acid	1468	1486	Carboxylic acid	1,245
23	Dimethyl sulfoxide	1471	1553	Sulfur	1,876
24	Ethyl decanoate	1506	1595	Esters	11,683
25	Nonanol	1511	1653	Alcohols	0,419
26	Isovaleric acid	1521	1636	Carboxylic acid	1,740
27	Phenylethyl acetate	1564	1786	Esters	6,324
28	Hexanoic acid	1578	1810	Carboxylic acid	3,149
29	Benzenemethanol	1580	1837	Alcohols	1,047
30	Benzeneethanol	1590	1856	Alcohols	3,890
31	A-ionone	1599	1857	Ketones	ND
32	Octanoic acid	1633	2011	Carboxylic acid	2,722
33	Dihydroactinidiolide	1684	2325	Furans	1,735
Total identifié (%)					97.11
Nombre des composés identifiés					33

(RT-retention time on DB-wax column (min), RI – retention index; sorted alphabetically by class, structure, compound identity).

<sup>a</sup> LRI relative to C6 – C28 n-alkanes on the DB-5 column. <sup>b</sup> LRI taken from (Adams, 2007)

3. Alcools: Propanol, 1-butanol, 1-penten-3-ol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 1-pentanol, 2-hexen-1-ol, 1-hexanol, 1-octen-3-ol, 2-ethylhexanol, Cis-3-hexénol, nonanol, benzèneméthanol, benzèneéthanol.

**Tableau VI:** Profile d'arôme (pourcentages des composés identifiés) de la partie aérienne de *V. betonicifolium* par analyse HS-SPME / GC-MS (fibre carboxen polydiméthylsiloxane-divinyl benzene (CAR PDMSDVB))(Dr.Bendif)

No.	Composés	LRI <sup>a</sup>	LRI Lit <sup>b</sup>	Groupe de composés	%
1	Heptane	783	859	Hydrocarbons	0,4325577
2	Propanal	829	816	Aldehydes	0,6848773
3	2-propanone	846	818	Ketones	2,401659
4	Furan-2-methyl	893	877	Furans	1,1753832
5	Butanal	899	899	Aldehydes	0,6476118
6	Furan-3-methyl	915	901	Furans	1,1104548
7	2-butanone	915	915	Ketones	0,6476118
8	2-methylbutanal	934	937	Aldehydes	4,1261411
9	3-methylbutanal	939	957	Aldehydes	3,8968714
10	2-ethylfuran	977	983	Furans	9,1175014
11	Pentanal	1006	935	Aldehydes	6,4834402
12	1-penten-3-one	1052	1030	Ketones	1,762897
13	Propanol	1068	1061	Alcohols	0,4394002
14	Hexanal	1123	1094	Aldehydes	6,0509188
15	Trans-2-pentenal	1172	1147	Aldehydes	3,07985
16	1-butanol	1184	1173	Alcohols	1,3235594
17	1-penten-3-ol	1200	1187	Alcohols	4,452091
18	3-methyl-1-butanol	1223	1225	Alcohols	1,7523777
19	Heptanal	1228	1195	Aldehydes	1,0722482
20	2-methyl-1-butanol	1244	1220	Alcohols	1,6211827
21	Trans-2-hexenal	1257	1238	Aldehydes	2,064051
22	Furan-2-pentyl	1270	1249	Furans	2,058988
23	Cis-4-hepten-1-al	1278	1269	Aldehydes	0,7361978
24	1-pentanol	1281	1270	Alcohols	2,6905005
25	Acetoin	1308	1292	Ketones	0,3660137
26	Trans-2-(2-pentenyl) furan	1324	1282	Furans	1,2815828
27	2-hexen-1-ol	1334	1363	Alcohols	1,7456055
28	6-methyl-5-hepten-2-one	1349	1341	Ketones	2,9041462
29	1-hexanol	1358	1357	Alcohols	1,8841237
30	Cis-3-hexenol	1377	1366	Alcohols	4,8107986
31	Nonanal	1386	1374	Aldehydes	1,2387109
32	1-octen-3-ol	1417	1419	Alcohols	3,4273853
33	2-ethylhexanol	1437	1441	Alcohols	0,8248059
34	Trans-2,trans-4-heptadienal	1441	1462	Aldehydes	2,2833176
35	Decanal	1444	1472	Aldehydes	0,8728451
36	Propanoicacid	1468	1486	Carboxylic acid	1,2583211
37	Nonanol	1511	1653	Alcohols	0,6915911
38	Isovalericacid	1521	1636	Carboxylic acid	1,804723
39	Pentanoicacid	1546	1685	Carboxylic acid	1,3748283
40	Hexanoicacid	1578	1810	Carboxylic acid	2,1561899
41	Benzenemethanol	1580	1837	Alcohols	2,6589778
42	Benzeneethanol	1590	1856	Alcohols	0,6257609

43	A-ionone	1599	1857	Ketones	0,4490295
44	Octanoicacid	1633	2011	Carboxylic acid	1,4257801

**Tableau VI (La suite):** Profile d'arôme (pourcentages des composés identifiés) de la partie aérienne de *V. betonicifolium* par analyse HS-SPME / GC-MS (fibre carboxen polydiméthylsiloxane-divinyl benzene (CAR PDMSDVB)) (Dr.Bendif)

45	A-bisabolol	1661	2179	Alcohols	0,9651254
46	Dihydroactinidiolide	1684	2325	Furans	2,4254938
47	Pentaethylene glycol monomethylether	1693	NF	Alcohols	0,9651254
<b>Groupe de composés [%]</b>					
<b>Alcohols</b>					<b>16</b>
<b>Aldehydes</b>					<b>13</b>
<b>Carboxylic acid</b>					<b>05</b>
<b>Furans</b>					<b>06</b>
<b>Hydrocarbons</b>					<b>01</b>
<b>Ketones</b>					<b>06</b>
Total identifié (%)					<b>98,27</b>
Nombre des composés identifiés					47

(RT-retention time on DB-wax column (min), RI – retention index; sorted alphabetically by class, structure, compound identity).

<sup>a</sup> LRI relative to C6 – C28 n-alkanes on the DB-5 column. <sup>b</sup> LRI taken from (Adams, 2007)

4. Cétones: 2-propanone, 2-butanone, 1-pentène-3-one, acétoïne, 6-méthyl-5-heptène-2-one, A-ionone.

5. Hydrocarbures: heptane.

6. Furanes: Furan-2-methyl, Furan-3-methyl, 2-éthylfurane, Furan-2-pentyl, Trans-2-(2-pentenyl) furan, dihydroactinidiolide

Pour l'espece *C. parvifolia*: Au total, 55 composants volatils ont été identifiés dans la partie aérienne entière de *C. parvifolia* dont 15 aldéhydes, 1 Nitrile, 5 acides carboxyliques, 1 Terpene, 17 alcools, 2 Sulfur, 4 cétones, 3 hydrocarbures, 2 Esters et 4 furannes (**Tableau 07**).

1. Aldéhydes: Composés: propanal, Butanal, 2-propenal, 2-methyl, 2-méthylbutanal, 3-méthylbutanal, pentanal, hexanal, trans-2-penténal, 2-methyl-1-butanol, Heptanal, trans-2-hexénal, nonanal, Octanal, Decanal.

2. Acides carboxyliques: acide propanoïque, acide isovalérique, Acide pentanoïque, acide hexanoïque, acide acétique.

3. Alcools: 1-butanol, 1-penten-3-ol, pentanol, 2-hexen-1-ol, 1-hexanol, Cis-3-hexénol, A-citronellol, 1-octen-3-ol, 2-éthylhexanol, benzène méthanol, benzène éthanol, Diethylene glycol, Butoxytriethylene glycol, Pentaethylene glycol monomethyl ether, Triethylene glycol methyl ether.

4. Esters : Methyl acetate, Ethyl decanoate

5. Cétones: 2-propanone, 4,5-dimethyl-4-hexen-3-one, acétoïne, 6-méthyl-5-heptène-2-one et E)-geranylacetone.

**Tableau VII.** Profil d'arôme (pourcentages des composés identifiés) de la partie aérienne de *C. parvifolia* par analyse HS-SPME / GC-MS (fibre carboxen polydiméthylsiloxane-divinyl benzene (CAR PDMSDVB)) (Dr.Bendif)

No.	composés	LRI	LRI Lit	Groupe de composés	%
1	Heptane	783	859	Hydrocarbons	0,3484802
2	2-thiapropane	805	773	Sulfur	0,2211814
3	Propanal	829	816	Aldehydes	0,5544807
4	N-octane	836	793	Hydrocarbons	0,1652182
5	2-propanone	846	818	Ketones	1,4402514
6	Methyl acetate	858	864	Esters	0,1704792
7	Furan-2-methyl	893	877	Furans	0,5039617
8	Butanal	899	899	Aldehydes	0,2761248
9	2-propenal,2-methyl	903	893	Aldehydes	0,379907
10	2-methylbutanal	934	937	Aldehydes	0,8975557
11	3-methylbutanal	939	957	Aldehydes	1,202301
12	2-ethylfuran	977	983	Furans	1,1567447
13	2,2,4,6,6-pentamethylheptane	990	989	Hydrocarbons	1,1402922
14	Pentanal	1006	935	Aldehydes	8,7033289
15	Acetonitrile	1033	1002	Nitrile	0,7175971
16	Hexanal	1123	1094	Aldehydes	12,200387
17	Trans-2-pentenal	1172	1147	Aldehydes	1,1940274
18	1-butanol	1184	1173	Alcohols	0,8608101
19	1-penten-3-ol	1200	1187	Alcohols	1,6568177
20	3-methyl-1-butanol	1223	1225	Aldehydes	1,7901011
21	Heptanal	1228	1195	Aldehydes	0,8045409
22	DL-limonene	1241	1234	Terpene	0,5547558
23	2-methyl-1-butanol	1244	1220	Aldehydes	1,0933406
24	Trans-2-hexenal	1257	1238	Aldehydes	4,6361455
25	Furan-2-pentyl	1270	1249	Furans	0,4929917
26	1-pentanol	1281	1270	Alcohols	1,8359854
27	Acetoin	1308	1292	Ketones	0,6456187
28	Octanal	1315	1303	Aldehydes	0,4479109
29	2-hexen-1-ol	1334	1363	Alcohols	0,5782083
30	4,5-dimethyl-4-hexen-3-one	1340	1320	Ketones	4,9175237
31	6-methyl-5-hepten-2-one	1349	1341	Ketones	5,8909463
32	1 hexanol	1358	1357	Alcohols	3,5400941
33	Cis-3-hexenol	1377	1366	Alcohols	1,1752289
34	Nonanal	1386	1374	Aldehydes	1,6902328
35	A-citronellol	1390	1266	Alcohols	1,8498822
36	1-octen-3-ol	1417	1419	Alcohols	0,5602994
37	Acetic acid	1423	1427	Carboxylic acids	6,445122
38	2-ethylhexanol	1437	1441	Alcohols	0,540124
39	Decanal	1444	1472	Aldehydes	0,8675716
40	Propanoic acid	1468	1486	Carboxylic acids	1,2572734
41	Dimethyl sulfoxide	1471	1553	Sulfur	0,6346708

42	Ethyl decanoate	1506	1595	Esters	1,0968523
43	Nonanol	1511	1653	Alcohols	0,430643
44	Isovaleric acid	1521	1636	Carboxylic acids	1,6111006

**Tableau VII (La suite):** Profile d'arôme (pourcentages des composés identifiés) de la partie aérienne de *C. parvifolia* par analyse HS-SPME / GC-MS (fibre carboxen polydiméthylsiloxane-divinyl benzene (CAR PDMSDVB)) (Dr.Bendif)

45	Pentanoic acid	1546	1685	Carboxylic acids	0,7434551
46	2-(2-butoxyethoxy)ethanol	1557	1749	Alcohols	1,8936397
47	(E)-geranylacetone	1577	1824	Ketones	0,4636253
48	Hexanoic acid	1578	1810	Carboxylic acids	1,9489644
49	Benzenemethanol	1580	1837	Alcohols	0,7870044
50	Benzeneethanol	1590	1856	Alcohols	0,3393487
51	Diethylene glycol	1605	1953	Alcohols	0,7646464
52	Triethylene glycol methyl ether	1610	1963	Alcohols	7,0770652
53	Butoxytriethylene glycol	1656	NF	Alcohols	2,4629204
54	Dihydroactinidiolide	1684	2325	Furans	0,9770781
55	Pentaethylene glycol monomethyl ether	1693	NF	Alcohols	0,9877007
<b>Groupe de composés [%]</b>					
<b>Alcohols</b>					<b>17</b>
<b>Aldehydes</b>					<b>15</b>
<b>Carboxylic acid</b>					<b>5</b>
<b>Furans</b>					<b>4</b>
<b>Hydrocarbons</b>					<b>3</b>
<b>Ketones</b>					<b>5</b>
<b>Sulfur</b>					<b>2</b>
<b>Esters</b>					<b>2</b>
<b>Nitrile</b>					<b>1</b>
Total identifié (%)					<b>97,62</b>
Nombre des composés identifiés					55

(RT-retention time on DB-wax column (min), RI – retention index; sorted alphabetically by class, structure, compound identity).

<sup>a</sup> LRI relative to C6 – C28 n-alkanes on the DB-5 column. <sup>b</sup> LRI taken from (Adams, 2007)

6. Nitrile : Acetonitrile

7. Hydrocarbures: heptane, N-octane et 2,2,4,6,6-pentamethylheptane.

8. Terpene:DI-limonene

9. Sulfur : 2-thiapropane et Dimethyl sulfoxide.

10. Furanes: Furan-2-methyl,2-éthylfurane, Furan-2-pentyl, etdihydroactinidiolide

La MEPS est une technique d'équilibre, donc les composés ne sont pas complètement extraits de la matrice. Néanmoins, cette méthode est utile pour des analyses quantitatives et il a été démontré que sa précision et sa linéarité sont excellentes. En pratique, si les temps d'adsorption et de désorption sont très précisément contrôlés, au cas où le procédé ne serait pas automatisé, il est possible d'atteindre une excellente précision sans nécessité d'atteindre l'équilibre (Penton, 1997;

**Song, 1997; Yang et Peppard, 1994**). Par rapport à l'extraction par solvants, l'extraction-distillation simultanées et l'espace de tête dynamique, qui sont les techniques les plus fréquemment utilisées pour l'analyse des arômes, la MEPS est plus simple, moins chère, plus rapide et elle ne requiert pas de solvants. Elle peut être appliquée pour l'analyse des arômes des échantillons solides, liquides ou gazeux. Cette technique permet une opération plus reproductible par automatisation.

La MEPS est plus sensible aux conditions expérimentales. Tout changement des paramètres expérimentaux, pouvant affecter les coefficients de partition, a un effet sur la quantité adsorbée sur la fibre MEPS, et sera reflété dans la sensibilité et la reproductibilité de la méthode analytique.

Dans l'ensemble, la poudre des trois plantes était caractérisée par la fraction d'aldéhydes (entre 11 et 15 composés) qui étaient plus abondants, suivis des alcools (16 et 17 pour *V. betonicifolium* et *C. parvifolia* respectivement alors que l'extrait d'*O. alba* renferme juste 4 alcools. Les acides carboxyliques étaient moins représentés dans les trois espèces par 5. Les hydrocarbures, furanes et cétones étaient les moins représentés (entre 1 et 6) dans les trois espèces, tandis que 2 Sulfures, 2 Esters étaient présents (entre 1 et 3) seulement dans *O. alba* et *C. parvifolia*. Pour Nitrile et Terpène existent uniquement dans les extraits de *C. parvifolia*.

Les principaux composés de *V. betonicifolium* étaient le Furane (2-éthylfuran 9.12%), les Aldéhydes (Pentanal et Hexanal ; 6.48, 6.05 % respectivement), pour *C. parvifolia*, Les principaux composés étaient les Aldéhydes (Hexanal et Pentanal 12.2 et 8.7 % respectivement), suivie par l'Alcool (7.1%) et l'acide acétique (l'acide carboxylique 6.4%). Tandis que, *O. alba* caractérisé par l'acide acétique (l'acide carboxylique 14.13 %), et par l'Ester (Éthyl decanoate et Phényléthyl acetate 11.68 et 6.32% respectivement) aussi par les deux Aldéhydes (Pentanal et 3-méthylbutanal 7.47 et 6.64 % respectivement). Certains composants ont été trouvés dans des quantités plus faibles dans les trois des espèces, ils sont beaucoup (tableaux ...).

À notre connaissance, aucune étude sur la détermination qualitative et quantitative des composés volatiles chez ces trois espèces n'a été rapportée à ce jour.

#### **4. Activité antibactérienne**

Dans cette étude, l'activité antibactérienne d'extrait éthanolique de trois espèces étudiées a été évaluée sur la croissance *in vitro* de plusieurs souches bactériennes et champignons et levures à savoir : *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Salmonella*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

La méthode de disque a permis de déterminer l'action des extraits de la plante dissouts dans le DMSO sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une

zoned'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait des trois plantes. Le **tableau VIII**, **Figure 12** indiquent les résultats.

Les résultats obtenus montrent que les extraits éthanoliques de *C. paviflora* utilisés avec la concentration 30mg/ml sont actifs par rapport les mêmes extraits avec la concentration 20mg/ml et manifestent une activité antimicrobienne en inhibant la croissance *in vitro* des germes microbiens: *S. aureus* ATCC6538 (DZI, 8.64 et 7.00 mm), et *S. aureus* ATCC25923 (DZI, 13.22 et 12.00 mm), *Selmonella* (DZI, 8.03 et 7.00 mm), *A. niger* (DZI, 8.22 et 7.00 mm) et *Pseudomonas* sp (DZI, 15.23 et 12.12 mm), tandis que les extraits d'*O. alba* sont actifs sauf contre *Selmonella* (DZI, 7.86 et 6.00 mm), et contre *S. aureus* ATCC6538 (DZI, 7.17 et 7.00 mm), pour la concentration 30mg/ml et 20mg/ml respectivement. Cependant, aucun effet n'a été obtenu pour les autres extraits et pour les extraits de *V. betonicifolium* il n'y avait aucune activité contre toutes les souches.

**Tableau VIII.** Activité antibactérienne par la méthode de diffusion en puits d'agar

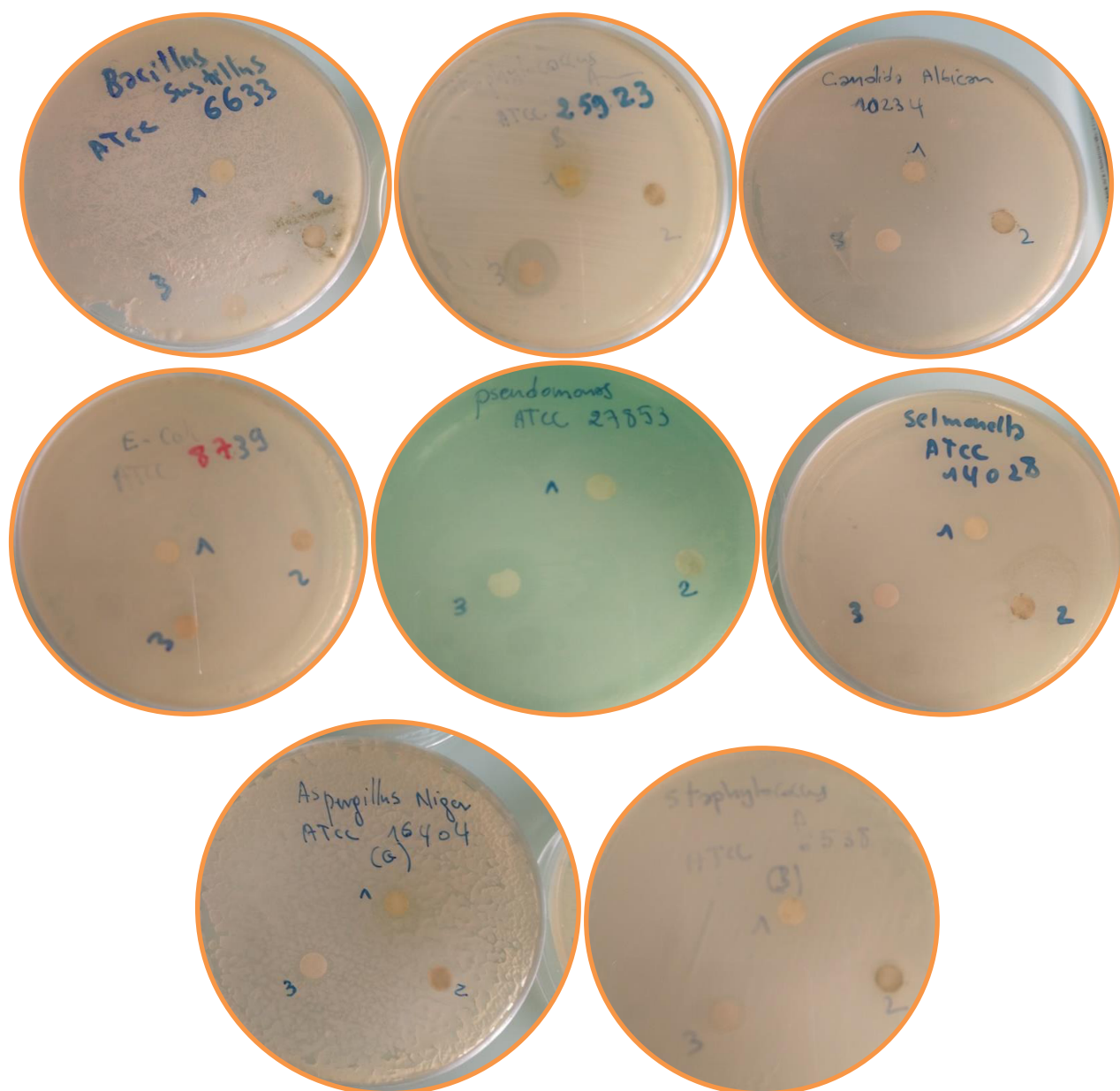
Espèces Souches Extraits	Activité antibactérienne, DZI <sup>a</sup> (mm)					
	<i>V. betonicifolium</i>		<i>O. alba</i>		<i>C. paviflora</i>	
	30mg/ml	20mg/ml	30mg/ml	20mg/ml	30mg/ml	20mg/ml
<i>S. aureus</i> ATCC6538	6.00mm	6.00mm	7,17mm	7mm	8,64mm	7mm
<i>S. aureus</i> ATCC25923	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm	13,22mm	12mm
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm
<i>E. coli</i> ATCC8739	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm
<i>Selmonella</i> sp. ATCC14028	6.00mm	6.00mm	7,86mm	6.00mm	8,03mm	7mm
<i>A. niger</i> ATCC16404	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm	8,22mm	7mm
<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC27853	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm	15,23mm	12.12
<i>C. albican</i> ATCC10234	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm	6.00mm

<sup>a</sup>DZI: Diamètre de zone d'inhibition.

Dans notre étude, l'absence d'activité peut être expliquée du fait que l'extraction n'allie pas à l'extraction d'un composé actif plus antibactérien tel que les iridoïdes, ou bien cette résistance peut être due à une multi-résistance de souches bactériennes utilisées. Dans cette étude, nous avons examiné l'activité antimicrobienne par diffusion sur disque de l'extrait éthanolique de trois espèces. Globalement, les résultats ont indiqué que 20mg/ml d'extrait à 30 mg / mL avaient une activité antimicrobienne faible.

Les activités antimicrobiennes de quelques extraits éthanoliques pourraient être dûes à la richesse de nombreux acides phénoliques ainsi qu'à des dérivés de flavonoïdes courants. De plus, le désaccord entre les résultats de différents travaux n'est pas rare et peut être causé par de nombreuses variables, telles que la méthode d'extraction de la plante, le volume d'extrait déposé sur le disque, le temps d'incubation et la concentration utilisée (Marzouk et al., 2006) et les souches spécifiques utilisées pour évaluer la sensibilité. Cowan (1999) a rapporté que différentes classes de polyphénols, principalement des tanins et des flavonoïdes, peuvent augmenter la toxicité des

extraits pour les micro-organismes. Cette toxicité est fonction du site et du nombre de groupes hydroxyle présents sur le composé phénolique. De plus, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation entraîne une augmentation de la toxicité.



1. *V. Betonicifolium* 2. *O. alba* 3. *C. Paviflora*

**Figure 12.** Photos des résultats de l'activité antibactérienne selon la méthode de diffusion sur disque d'agar de *C. Paviflora*, *O. alba* et *V. Betonicifolium* (30mg/ml)

## **Conclusion**

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

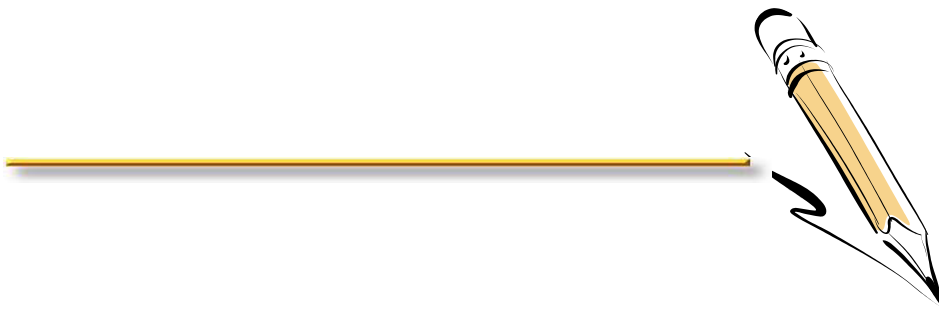
Les résultats montrent que l'extrait *Centaurea paviflora* riches en composés bioactifs par rapport aux deux autres extraits qui sont moins riches.

Les profils chromatographiques des composés phénoliques extraits de nos espèces a révélé une plus grande diversité des molécules détectées dans l'extrait de *Centaurea paviflora*, bien que ce dernier soit le moins pourvu en composés phénoliques.

L'étude biologique montre que le pouvoir antibactérien remarquable à l'extrait de *Centaurea paviflora*, en rapport direct avec les différences de leurs compositions chimiques respectives.

L'ensemble des résultats obtenus ne constitue qu'une ébauche dans le domaine de recherche, alors il serait intéressant d'étayer ce travail par :

- La purification et l'identification des principes actifs.
- L'étude de la toxicité de ceux-ci : *in vitro* et *in vivo*.
- Tester d'autres activités tel que : l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et anti diabétique.



**ANNEXE**

## 1. Liste de produits chimiques utilisés

<b>Produits chimique</b>
Ethanol
Chloroforme
Acétate d'éthyle
Acide acétique
Acide formique
Butanol
Chloroforme
DMSO
Hexane
Méthanol
Muller Hinton
Gélose nutritive

## 2. Appareillages et matériel utilisés au laboratoire

<b>Verreries et petite matériel</b>	<b>Equipements et appareil</b>
Béchers	Broyeur
Boîtes pétri en verre et en plastique	Balance de paillasse
Eprouvettes	Balance de précision
Tube à essai	Rotavapor
Pince	Lampe à UV
Papier filtre	Haute chimique
Spatule	Etuve
Bec benzène	Incubateur
	Agitateur magnétique
	Réfrigérateur
	Micropipette
	Portoirs tubes
	Séchoir type Eriotti
	Autoclave

## Résumé :

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation de trois plantes médicinales steppiques *Centaurea paviflora*, *Ononis alba* et *Verbascum betonicifolium* en les caractérisant par une évaluation de l'activité antimicrobienne et une identification de certains composés phénoliques par chromatographie à couche mince CCM et une analyse de l'HPMSE.

Parmi les différents extraits qui ont été également soumis par le test antimicrobien *Centaurea paviflora* a réagi positivement contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas*. Les meilleurs composés phénoliques ont été prouvés dans les deux espèces *Centaurea paviflora* et *Verbascum betonicifolium* par les fractions butanoliques, acétate d'éthyle et toluène.

Dans l'ensemble, l'analyse HPMSE a montré que la poudre des trois plantes était caractérisée par la fraction d'aldéhydes (entre 11 et 15 composés) qui étaient plus abondants, suivis des alcools (16 et 17 pour *V. betonicifolium* et *C. parviflora* respectivement alors que l'extrait d'*O. alba* renferme juste 4 alcools. Les acides carboxyliques étaient moins représentés dans les trois espèces par 5. Les hydrocarbures, furannes et cétones étaient les moins représentés (entre 1 et 6) dans les trois espèces, tandis que 2 Sulfure, 2 Esters étaient présents (entre 1 et 3) seulement dans *O. alba* et *C. parviflora*. Pour Nitrile et Terpène existent uniquement dans les extraits de *C. parviflora*.

## Mots clés :

*Centaurea paviflora*, *Ononis alba*, *Verbascum betonicifolium*, composés phénolique, pouvoir antimicrobien, CCM, HPMSE.

## Références bibliographiques

1.Adams R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4<sup>th</sup> ed., Allured Publishing: Carol Stream, IL, USA.

Agronomiques et Biologiques. N° 08 : 02-12.

2.Ayad,R.(2008).recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce zygophyllum cornutum,Mémoire magister En Chimie Organique, université Mentouri Constantine.p35-39, 40, 47.

3.Badiaga, M. (2011).Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea Latifolia Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.10 p.

4.Bakkali *et al.*, 2008 (Figure 07). Bakkali F., Averbeck S. and Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential

5.Balentine C.W., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Duong D.Q. and Pohlman F.W. (2006). The preand post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73, 413-421.

6.Barrero, A.F., Herrador, M.M., Arteaga, P., Cabrera, E., Rodriguez-Garcia, I., GarciaMoreno, M., Gravalos, D.G., (1997), Cytotoxic activity of flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*, *Fitoterapia*, 68(3): 281-283.

7.Belbache investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaureae paviflora*. Thèse de diplôme de magister en chimie organique, université Mentouri , P59, 60.

8.Benaissa, O. (2011).Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine.63p

9.Bendag A., 2009. Caractérisation phytochimique et activité antioxydante de quelques cultivars de *Phoenix dactylifera* L. Mémoire de Magistère en Biologie. Université d'Oran EsSénia République Algérienne Démocratique et Populaire, 93 P.

10.Bhat *et al.*,2005 Bhat S.V., Nagasampagi B.A. and Sivakumar M. (2005). Chemistry of natural products. Ed. Narosa, New Delhi, India, p. 237.

11.Bogucka-Kocka A. The analysis of furanocoumarins in fruits of *Heracleum sibiricum* L. *Natural drugs*. 1999 ; 56(5) : 399-401.

12.Boizot, N., Charpentier, J.-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'INRA,

Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, 79-82.

13. Bougandoura N., Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calaminthas spnepta et Ajuga iva L.* de l'ouest d'Algérie. Département de Biologie. Laboratoire des Produits Naturels LAPRONA. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Abou Bakr Belkaid-Tlemcen. p57.
14. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. mdicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.l.], 1999, p. 647-673.
15. Catherine, K., George, D.G., Helen, S., (2006), A simulation study of the interaction of sulfhydryl nucleophiles with several antifungal sesquiterpene lactones isolated from Greek *Centaurea* sp., *Journal of Molecular Structure*, 759, 215–224.33
16. CHERITI A., BELBOUKHARI M., BELBOUKHARI N., DJERADI H., 2012- Phytochemical and biological studies on *Launaea* Cass. genus (Asteraceae) from Algerian Sahara. *Current Topics in Phytochemistry*, 11 : 67- 80.
17. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard M02–A10, tenth ed. Author, Wayne, PA.
18. Cowan M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582.
19. Dave-Oomah. B. (2003). Bulletin IBP, numéro 1, Canada.  
*de Magistère.* Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen.
20. Djabeur-Kaid-Harche A., Taieb-Brabim-Bokhari H., Selami N., Sangare M. et
21. Ebeler, S. E. Gas Chromatographic Analysis of Wines: Current Applications and Future Trends. In *Gas Chromatography* [Online]; Poole, C., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2012; pp 689–710. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00030-4> (page accédée le 4 septembre 2014). essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen.  
*Thèse*
22. Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C. 2008 . "Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities" .*C. R. Biologies.* 331: 372-379.
23. Fernando Lalaguna. Purification of fresh cassava root polyphenols by solidphase extraction with Amberlite XAD-8 resin. *Journal of Chromatography A*, 657 (1993) 445-449.
24. Flamini, G., Bulleri, C., Morelli, I., (2002), Secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning, *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 1051–1054.
25. Gangoué piéboji J. (2007). Caractérisation des beta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat. Liège.

26. Haibo Wang, Muraleedharan G. Nair, Gale M. Strasburg, Alden M. Booren, and J. Ian Gray. Antioxidant Polyphenols from Tart Cherries (*Prunus cerasus*). *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 840–844.
27. Hopkins, 2003. *Physiologie végétale*. Ed. De Boeck Université, Bruxelles, 514P.
28. Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. 2 280. édition. Edition de Boeck Université, p268,
29. Irem Tatli, Satoshi Takamatsub, Ikhlas A. Khanb, and Zeliha S. Akdemirc. 2007. Screening for Free Radical Scavenging and Cell Aggregation Inhibitory Activities by Secondary Meta bolites from Turkish *Verbascum* species. *Z. Naturforsch.* 62c, 673D 678.
30. Iserin P. (2001). *Larousse encyclopédie des plantes médicinales*. Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersiey Limited, Londres.
31. Jensen, S. R. (1991). Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms.
32. Kamanzi, K., Raynaud, J., Voirin, B., (1983), The C-glycosyl flavonoids from flowers of *Centaurea malitensis*. *Plantes Médicinales et Phytothérapie* 17, 47–51.
33. Kose, Y.B., İşcan, G., Demirci, B., Başer, K.H.C., Celik, S., (2007), Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis* *Fitoterapia*, 78, 253–254.
34. Kupchen, S.M., Eakin, M.A., Thomas, A.M., structure cytotoxicity relationship among the sesquiterpen lactones, *J of Med Chem*, (1971), 14, 1147- 1152.
35. LAROUSSE AGRICOLE., 1981, Edit Larousse, Paris, 1207 p.
36. Mabberley, D.J., (1987), *The Plant Book* 110, Combridge University Press.
- Mahboubi S., 2007- Contribution à la connaissance de deux rétames: *Retam monosperma* et
37. Mamyrbekova-Bekro J., Boua B B., Kouassi K C and Békro Y A. (2012) Surl'analyse qualitative et pharmacologique de 2 plantes anti-hypertensives
38. Marco, J., A., Sanz-Cervera, J., F., Yuste, A., Sancenón, F., Carda, M., (2005), Sesquiterpenes from *Centaurea aspera*. *Phytochemistry* 66, 1644-1650.
39. Marsili, R. Solid-phase microextraction : Food Technology Applications. In *Encyclopedia of Separation Science* [Online]; Wilson, I. D., Ed.; Academic Press: Oxford, 2000; pp 4178-4190. <http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/06791-0> (page accédée le 10 décembre 2014).
40. Marzouk Z., Neffati A., Marzouk B., Chraief I., Khemiss F., Chekir Ghedira L., Boukef K (2006). Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. oil from Kasrine-*Journal of Food Agriculture & Environment*; Vol.4; N°3-4; pp 61-65.

- 41.Masso, J.L., Bertran, M., Adzet, T., (1979), Contribution to the chemical and pharmacological study of some species of *Centaurea*, *Plant Méd. Phytother.* 13, 41 -45.
- 42.Maurice N. L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, Paris, 1997, p. 12-14.
- 43.Mbaïhougadobé S, Ngakegni-Limbili A.C, Gouollaly T, Koane J.N, Ngaissona P, Nkounkou Loumpangou C, Mahmoud Y, Ouamba J-M. Evaluation de l'activité anti-oxydante de trois espèces de plantes utilisées dans le traitement de la goutte au Tchad. Mbaïhougadobé S. et al., *Revue CAMES – Série Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 2017 ; 18(2) : 28-35 28.
- 44.Michel M. (2011). Nouvelles methodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (*hippophæ rhamnoides*). Thèse de doctorat, Ecole doctorale sciences et technologies, Université d'Orléans, France.
- 45.Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- 46.Milane H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg.
- 47.Mohammad, S., Sezgin, C., Marcel, J., Yashodharan, K., Stephen, M.M., Lutfun, N., Paul, K.T., Satyajit, D.S., (2005), Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*, *Tetrahedron*, 61(38), 9001–9006.
- 48.Mohammad, S., Sezgin, C., Marcel, J., Yashodharan, K., Stephen, M.M., Lutfun, N., Paul, K.T., Satyajit, D.S., (2005), Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*, *Tetrahedron*, 61, 9001 – 9006.
- 49.Mohammedi Z. (2006) Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles
- 50.Muhammad Shahzad Aslam, Muhammad Syarhabil Ahmad, Awang Soh Mamat. Phytochemical Evaluation of Polyherbal Formulation of *Clinacanthus nutans* and *Elephantopus scaber* to Identify Flavonoids. *Pharmacognosy Journal*, Vol 8, Issue 6, Nov-Dec, 2016 534.
51. Murberck S., 1933. *Monographie Der Gattung Verbascum*. Acta Univ. Lund ser, Lund. Vol.29/2, pp. 1-630.
- 52.Nauciel. C., and Vildé J.L. (2005). *Bactériologie médicale*, 2èmeEd. Masson . Paris. pp: 5
- 53.Nicoletti M., Maggi F., Papa F., Vittori S., Quassinti L., Bramucci M., *et al.* (2012). *In vitro* biological activities of the essential oil from the 'resurrection plant' *Myrothamnus*

- moschatus* (Baillon) Niedenzu endemic to Madagascar. *Natural product research*, 26, 2291-2300.
- 54.oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- 55.Orallo, F., Lamela, M., Camiña, M., Uriate, E., Calleja, J. M., (1998), Preliminary Study of the Potential Vasodilator Effects on Rat Aorta of Centaurein and Centaureidin, Two Flavonoids from *Centaurea corcubionensis*, *Planta Medica*, 64(2): 116-119.
- 56.PAUL SCHAUBENBERG, FERDINAND PARIS., 2006 : Guide des plantes médicinales, Edit Delachaux et Niestlé, Paris, 359 P. (Chouh et al.,2015) Etude phytochimique de l'espèce *Centaurea parviflora* Desf thèse de master .P,46
- 57.Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001 , 488, 73-87.  
Pawliszyn, J. Extraction | Solid-Phase Microextraction. In *Encyclopedia of Separation Science* [Online]. Wilson, I.D., Ed.; Academic Press: Oxford, 2000; pp 1416-1424.  
<http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/02151-7> (page accédée le 23 septembre 2014).
- 58.Pawliszyn, J. *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*. John Wiley and Sons: New York, NY; 1997, 264 p.
- 59.Picher, M. T., Seoane, E., Tortajada, A., (1984), two new anti-inflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*, *Phytochemistry*, 23(9), 1995-1998.
- 60.Quezel, P., Santa, S. (1963). *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Vol. 2. Ed. CNRS, Paris France. *R. reatam.* 2: 572-578.
- 61.Raven H., Evert R. F., Eichhorn S. E. (2000). *Biologie végétale*. 6e édition. Traduit par Jules Bouharmont avec la collaboration scientifique de Charles-Marie Evrard. De Boeck Université- Paris, 944p.
- 62.Sagdic O., Kuscu A., Özcan M. and Özcelik S. (2002). Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 19, 473-480.
- 63.Sarni-Manchado P. et Cheynier V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Ed Tec et Doc Lavoisier. pp : 02-11
- 64.Seghiri, R., Mekkiou, R., Boumaza, O., Benayache, S., Bermejo, J., Benayache, F., (2006), Phenolic compounds from *Centaurea Africana*. *Chemistry of Natural Compounds* 42(6), 491 - 492.
- 65.Shan B., Cai Y.Z., Brooks G.D. and Cokk H. (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spiece and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Chemistry*, 117,112-119.

66. Shoeb, M., MacManus, S. M., Jaspars, M., Trevidu, J., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., Sarker, S. D., (2006), Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea Americana*. *Tetrahedron*, 62, 11172-11177.

67. Shun-ichi Y, Naohito Oh-h, Kazuo A. Synthetic studies on optically active epoxyterpenes from L-glutamic acid-I. Syntheses of R-(+)-Epoxygernoil, R-(+)- Marmin and R-(+)-Epoxyaurapten. *Tetrahedron Lett.* 1976 ; 29: 2557-2560.

68. Solène, 2012 La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de diplôme d'état de docteur en pharmacie, faculté de pharmacie, Université de Lorraine.

utilisées à N'gramanssabo en Côte d'Ivoire. *Nature & Technologie*. BSciences

69. Wagner H. et Blatt S., 1996. *Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag. Ed., Berlin, second Edition.

70. Wioleta Jesionek, Barbara Majer-Dziedzic & Irena Maria Choma. Separation, Identification and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC-MS and TLC-DPPH• *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2015, 15:51.

71. Witt H., 1963- *Les plantes du monde*. Ed. Hachette, Paris, 339p.

72. Yesilada, E., (2002), Biodiversity in Turkish Folk Medicine. In: Sener, B. (Ed.), *Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, UK, pp. 119–135.

73. Zhang W.J. and Bjorn L.O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80, 207-218.

#### SITE WEB

<https://www.aquaportail.com/taxonomie-famille-114-scrophulariaceae.html>