



N° d'ordre :

**UNIVERSITE DE M'SILA**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Département de Chimie

**MEMOIRE**  
Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister  
Spécialité : Chimie  
Option : chimie organique

**SUJET**

**Etude phytochimique et pouvoir biologique des métabolites  
secondaires de la plante *Zizyphora hispanica* L.  
de la région de M'SILA**

**Par:**

**MERATATE FAIZA**

Soutenu publiquement le: 21/03/2013

Devant le jury composé de :

<b>LAOUER .H</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. F .A. Sétif</b>	<b>Président</b>
<b>OUALI.D</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. M'sila</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>BOUNKHHEL.M</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. F .A. Sétif</b>	<b>Examineur</b>
<b>BENOSMANE.N</b>	<b>Maître de conférences (B)</b>	<b>U. M'sila</b>	<b>Invité</b>
<b>BENABDALLAH.H</b>	<b>Maître de conférences (B)</b>	<b>U. M'sila</b>	<b>Invité</b>
<b>BENMEKHBI.L</b>	<b>Maître de conférences (B)</b>	<b>U. M'sila</b>	<b>Invité</b>

**Année:2012 /2013**

## Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

### **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **Chapitre I :**

#### **Etude des plantes médicinales**

I.1.Généralités sur les plantes médicinales.....	4
I.2. La famille des Labiées (Lamiacées).....	7
I.3. Différents types de <i>Zizyphora</i> .....	8
I.3.1. <i>Zizyphora capitata</i> .....	8
I.3.2. <i>Zizyphora tenuior</i> .....	8
I.3.3. <i>Zizyphora clinopodioides</i> .....	9
I.3.4. <i>Zizyphora hispanica</i> .....	9

#### **Chapitre II**

#### **Valorisation des ressources végétales par l'étude des métabolites secondaires**

II.1.Les substances d'origine végétale.....	14
II.1.1.Les phénols et les polyphénols.....	14
II.1.1.1.Les flavonoïdes.....	14
II.1.1.2.Les coumarines.....	26
II.1.2.Alcaloïdes.....	27
II.1.3.Huiles essentielles.....	29
II.2. Les différentes méthodes d'extraction et de séparation des métabolites secondaires.....	34
II.2.1.Les méthodes d'extraction.....	34
II.2.2.Les méthodes de séparation chromatographique.....	36

**Chapitre III:  
L'activité biologique**

III.1.L'activité antibactérienne et antifongique.....	40
III.2.L'activité antioxydante.....	42

**PARTIE EXPERIMENTALE**

**Chapitre IV :  
Matériels et méthodes**

IV.1.Matériel végétal.....	50
IV.2.Les huiles essentielles.....	50
IV.3.Les principes actifs .....	52
IV.4.Le screening phytochimique.....	57

**Chapitre V :  
Résultats et discussions**

V.1. L'étude phytochimique.....	61
V.2. Dosage des polyphénol et flavonoïdes.....	70
V.3. Le screening phytochimique.....	73
V.4. L'activité antimicrobienne et antioxydante.....	74
V.5.Composition de l'huile essentielle .....	81
<b>Conclusion.....</b>	<b>84</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>86</b>

## *DÉDICACE*

*A mes parents*

*Qui ont toujours cru en moi*

*Qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras*

*A mon âme sœur, mon mari*

*Qui m'a appris le sens du défi.*

*A mes enfants, mes frères et mes sœurs*

*Qui m'ont poussé à continuer*

*Qui j'ai oublié pendant la réalisation de ce mémoire*

*A mon professeur*

*Pour le savoir qu'il m'a transmis*

*A mes amis*

*Pour leur soutien*

## REMERCIEMENTS

**Mes sincères remerciements s'adressent à Allah le tout Puissant pour son aide et son guide qui m'ont permis de réaliser ce travail.**

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur **Pr. D. Ouali** et **Dr. L. Benmekhbi, Pr. H. Laouar** qui ont guidé et surveillé le déroulement et l'exécution du travail de ce mémoire en me prodiguant tout aide possible et en me consacrant beaucoup de leur temps précieux.

Je remercie également **Pr. M.BOUNKHHEL** d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie **Dr. Z. Rahmouni, Mr. Benyahia, Mr. K. Rebbas, Mme L. Ouksel, Dr. H. Benabdalla. H., Dr. N. Benosmane, Mr. A. Zitouni, Mr. A. Mlouki** chargée de cours à l'université de M'sila pour leur coopération et leur aide.

Un remerciement très spécial à mes parents et à mon marie qui m'ont beaucoup soutenus depuis le premier jour de la réalisation de ce travail.

Sans oublier, à la fin, de dédier mes cordiaux remerciements à mes collègues Soumia, Abla, Saliha, Hafsa, Saadia, Nadjjet, Ahlem, Amina, Souhila, Dalal, Oum elkheir, Samra, Sana, Abir, Harrar, Noura, fatima, Samiha, Zoulikha, Fayrouz, Sassoui, Zinat, Naziha, Souria pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble et de m'avoir procurer l'aide quand j'en avais besoin.

## LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

**H.E:** Huile essentielle.

**°C:** Degré Celsius.

**CCM:** Chromatographie sur Couche mince.

**HPLC:** Chromatographie liquide à haute performance

**CPG/SM:** Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**RMN:** Résonance magnétique nucléaire

**IR:** Infra rouge.

**UV:** Ultra-Violet.

**GN:** Gélose nutritive

**MH:** Milieu de Mueller Hinton

**G:** Gramme.

**mg:** Milligramme.

**ml:** Millilitre.

**µl :** Microlitre

**V :** Volume.

**mm:** Millimètre.

**S:** Staphylococcus.

**E :** Escherichia.

**R<sub>f</sub> :** Rapport frontal.

**Dc:** Dichlorométhane

**Z.h:** *Zizyphora hispanica*.

**E<sub>1</sub>:** Le produit séparé de la phase n-butanolique.

**EAG/ g:** Equivalent acide gallique par un gramme.

**EQ/ g :**Equivalent quercitine par un gramme.

**MS:** Matière sèche

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b>	<i>Zizyphora capitata</i> L.....	8
<b>Figure 2:</b>	<i>Zizyphora tenuior</i> L.....	8
<b>Figure 3:</b>	<i>Zizyphora clinopodioides</i> L.....	9
<b>Figure 4:</b>	<i>Zizyphora hispanica</i> L. après la récolte.....	9
<b>Figure 5:</b>	Squelette de base des flavonoïdes.....	15
<b>Figure 6:</b>	Structure des flavonoïdes après l'oxydation.....	15
<b>Figure 7:</b>	Réaction des flavonoïdes avec les EOR.....	20
<b>Figure 8:</b>	Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.....	22
<b>Figure 9:</b>	Structure chimique des coumarines.....	26
<b>Figure 10:</b>	Quelques structures des Coumarines.....	26
<b>Figure 11:</b>	Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées.....	45
<b>Figure 12:</b>	Forme libre et réduite du DPPH.....	46
<b>Figure 13:</b>	Dispositif d'extraction type Clevenger.....	51
<b>Figure 14:</b>	Protocole d'extraction liquide- liquide.....	54
<b>Figure 15:</b>	Teneur en humidité du <i>Zizyphora hispanica</i> .....	61
<b>Figure 16:</b>	Rendement en HE du <i>Zizyphora hispanica</i> .....	62
<b>Figure 17:</b>	L'HE de <i>Zizyphora hispanica</i> .....	62
<b>Figure 18:</b>	Rendement des extraits du <i>Zizyphora hispanica</i> .....	63
<b>Figure 19:</b>	4', 5-Dihydroxy 7- O -rhamnoglucosyl flavanone (Naringine).....	67
<b>Figure 20:</b>	Série spectral UV du composé E <sub>1</sub> .....	68
<b>Figure 21:</b>	Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé E <sub>1</sub> entre (1.00 -12.00 ppm).....	69
<b>Figure 22:</b>	Courbe étalon de l'acide gallique.....	70
<b>Figure 23:</b>	Teneur en polyphenols dans les extraits de <i>Zizyphora hispanica</i> .....	71
<b>Figure 24:</b>	Courbe étalon de la Quercitine.....	72
<b>Figure 25:</b>	Teneur en flavonoïde des extraits de <i>Zizyphora hispanica</i> .....	72
<b>Figure 26:</b>	L'activité antibactérienne de HE des racines de <i>Zizyphora hispanica</i> sur <i>E.coli</i> .....	75
<b>Figure 27:</b>	L'activité antibactérienne de HE de <i>Zizyphora hispanica</i> sur <i>Listeria monocytogenes</i> .....	75

<b>Figure 28:</b>	Effet antifongique de l'extraits dichlorométhane sur <i>Aspergillus</i> Flavus.....	77
<b>Figure 29:</b>	Résultat du test antioxydant de l'extrait n-butanolique.....	78
<b>Figure 30:</b>	Résultat du test antioxydant de l'extrait dichlorométhane.....	78
<b>Figure 31:</b>	Résultat du test antioxydant de l'extrait éther de pétrole.....	79
<b>Figure 32:</b>	Résultat du test antioxydant de l'HE.....	79
<b>Figure 33:</b>	Résultat du test antioxydant de la standard BHT.....	80

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	Fiche technique 1.....	11
<b>Tableau 2</b>	Fiche technique 2.....	12
<b>Tableau 3</b>	Structure des différentes classes des flavonoïdes.....	16
<b>Tableau 4</b>	Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.....	22
<b>Tableau 5</b>	Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïde.....	23
<b>Tableau 6</b>	Classification chimique des alcaloïdes d'après la nature de leur noyau fondamental.....	28
<b>Tableau 7</b>	Protocole pour les HE (test du DPPH).....	47
<b>Tableau 8</b>	Protocole pour les autres métabolites secondaire.....	47
<b>Tableau 9</b>	Protocole expérimental (test Folin-Ciocalteu).....	55
<b>Tableau 10</b>	Les résultats de tests chromatographiques CCM.....	64
<b>Tableau 11</b>	Données de la série spectrale UV.....	65
<b>Tableau 12</b>	Données de la spectroscopie RMN <sup>1</sup> H.....	67
<b>Tableau 13</b>	Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.....	70
<b>Tableau 14</b>	Absorbances de la gamme de concentration de la quercitine.....	71
<b>Tableau 15</b>	Les diamètres des zones d'inhibition des extraits et de l'HE sur les Bactéries.....	74
<b>Tableau 16</b>	Les diamètres des zones d'inhibition des extraits et de l'HE sur les champignons.....	77
<b>Tableau 17</b>	Composition de l'huile essentielle de <i>Zizyphora hispanica</i> L.....	82

# **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

L'homme avait eu depuis la nuit des temps, recours à la nature en quête d'un remède pour se soigner. Tout un arsenal de plantes a été utilisé dans le traitement de différentes maladies sans connaître, pour autant, ni leur composition chimique, ni la dose à laquelle elles deviendront toxiques. Bien que ces plantes douées de propriétés thérapeutiques aient attiré l'attention de plusieurs auteurs la recherche dans ce domaine a reculé et la phytothérapie a connu une longue période d'oubli. Le monde s'est dirigé vers les médicaments de synthèse qui ont connu un nouvel essor. Parmi ces derniers figurent les antibiotiques qui sont utilisés dans le traitement des infections microbiennes [1]. L'utilisation abusive de ces produits a induit, en plus des effets secondaires tels que les accidents allergiques et sanguins [2].

Le diagnostic et le concept thérapeutique sont les mêmes en phytothérapie et en médecine traditionnelle. Les douleurs du patient, son examen physiologique complet et d'autres paramètres, comme les formules sanguines, renseignent sur la maladie, les remèdes servent d'une part à éliminer la principale cause du mal, dans la mesure du possible et d'autre part à soulager les symptômes. *Zizyphora hispanica* est une plante riche en huiles essentielles. Elle est utilisée dans la thérapie traditionnelle contre les douleurs de l'estomac [1], la céphalée, les douleurs abdominales, la toux et l'ictère.

Dans le but de tester de nouvelles plantes aromatiques locales, notre étude porte sur l'extraction et l'analyse chimique puis l'étude de l'activité antibactérienne, antifongique, antioxydante d'une plante appartenant à la famille des Lamiacées présentée par l'espèce *Zizyphora hispanica*. Notant que l'activité biologique et la détermination de la composition chimique de cette espèce n'ont pas été étudiées auparavant.

Le mémoire est divisé en deux parties: une partie bibliographique et une partie expérimentale. La partie bibliographique comprend deux chapitres ; le premier est

une vue générale sur les plantes médicinales et leurs propriétés et une étude botanique de l'espèce *Zizyphora hispanica* selon la bibliographie, le second traite les composés d'origine végétale : les polyphénols, les alcaloïdes, les terpènes, les huiles essentielles et enfin leurs méthodes d'analyses.

La partie expérimentale est consacrée à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne et antioxydante des métabolites secondaires. Cette partie est divisée en deux : la présentation du matériel et des méthodes utilisées et la discussion des résultats. Enfin, le manuscrit s'achève par une conclusion qui rappelle les résultats obtenus, des annexes et la listes des références.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# **Chapitre I**

## Etude des plantes médicinales

## **I.1. Généralités sur les plantes médicinales**

### **I.1.1. Les plantes et la médecine**

L'utilisation des plantes, à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques, arabes, chinoises, égyptiennes, hindoues, grecques et romaines [3].

Le premier livre de matière médicale, les Shen Nung Ben Cao jing ("Traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung") 4000 ans avant J.C. Les Arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie: Abu Bakr al-Razi fut l'un des grands médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina ou Avienne (900-1037) qui écrivit le "canon de la médecine". Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650, Ibn al Baytar (1197 – 1248) rédiger le très complet somme des simples: ce livre contenait une liste de 1400 préparation et plantes médicinales dont un millier étaient connues des auteurs grecs [4].

### **I.1.2. La phytothérapie**

#### **I.1.2.1. Définition**

La phytothérapie c'est le traitement ou la prévention des maladies par l'usage des plantes [5].

#### **I.1.2.2. Différents types de phytothérapie**

##### ***I.1.2.2.1. L'aromathérapie***

L'aromathérapie est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, huiles essentielles, substances aromatiques sécrétées par des nombreuses familles de plantes [5].

##### ***I.1.2.2.2. L'herboristerie***

L'herboristerie correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. La préparation repose sur des méthodes simple où les plus souvent à base d'eau : Décoction, infusion, macération [5].

### ***I.1.2.2.3. La phytothérapie pharmaceutique***

La phytothérapie pharmaceutique utilise des produits d'origine végétale obtenue par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou autre solvant. Les extraits sont présentés sous forme de sirops ou de gouttes [5].

## **I.1.3. Les plantes médicinales**

### **I.1.3.1 Définition**

Les plantes médicinales sont définies à la pharmacopée comme des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [6].

### **I.1.3.2. Les objectifs de l'étude des plantes médicinales**

Les objectifs de l'étude des plantes médicinales utilisées par une ethnie ou une communauté sont multiples. En outre, pour accélérer l'intégration des connaissances ethno-médicales dans la médecine moderne, afin de mieux répondre aux besoins de santé, pour rechercher de nouvelles plantes méconnues ou mal connues dans la flore médicinale et d'y rechercher également de nouvelles propriétés éventuelles et de nouvelles formes d'utilisation plus pratiques. Enfin, constituer une banque de données de plantes médicinales nécessaire à la contribution d'élaboration de la pharmacopée nationale, est un souhait de la communauté scientifique. Un autre intérêt économique de l'utilisation des ressources nationales en produits phytopharmaceutiques revêt une grande importance pour l'économie d'un pays, en particulier pour les pays en développement [1].

### **I.1.4. Cueillette et séchage des plantes médicinales**

Quel que soit les parties ou les plantes médicinales cueillies, le ramasseur doit connaître : ce qu'il faut ramasser ? Quand- il faut ramasser ? Comment-il faut ramasser ? Comment- il faut sécher ?et enfin, comment- il faut expédier ?

#### **I.1.4.1. Les lieux de cueillette**

Les sites où poussent les plantes médicinales ne sont pas forcément des lieux de cueillette appropriés, s'il s'agit d'un lieu pollué. Il est important de ne pas

ramasser les plantes le long des routes, car celles-ci peuvent être polluées par les gaz d'échappement. Abstenez-vous également de cueillir des plantes poussant près ou dans des champs sur lesquels des pesticides ou des engrais chimiques viennent d'être répandus. Pour plus de sécurité, n'utiliser que des plantes qui proviennent d'une culture biologique [1].

#### **I.1.4.2. Les périodes de cueillette**

Le calendrier de récolte répond à une question de floraison, d'épanouissement ou de maturité des végétaux. Ce calendrier est très approximatif, il est en fonction de la chaleur, du froid, de la sécheresse, de la pluie ou d'une saison tardive. La période de cueillette est celle où les plantes médicinales se sont développées jusqu'à pleine maturation de leur potentiel. La pratique et l'expérience restent primordiales pour adapter le savoir académique aux circonstances locales, car le moment de la cueillette peut être avancé ou retardé selon l'altitude du site, sa pluviosité ou son microclimat.

Généralement, les tiges sont sectionnées en période humide, les racines sont arrachées à la fin de l'automne et au début du printemps, les feuilles sont coupées en été et les fleurs lorsqu'elles sont largement ouvertes. Les fruits sont récoltés en automne lorsqu'ils sont mûrs. Les grains sont également ramassés à cette période de l'année, les écorces sont retirées au début du printemps tandis que la résine ou gomme est extraite au milieu de cette saison. Pellerin (1983) énumère en ce qui suit les conditions et certaines règles de cueillette :

- On doit faire la cueillette des fleurs et des feuilles par beau temps sec, jamais par la brume, la gelée, le brouillard et la pluie, car le séchage se fait mal et le produit jaunit ou noircit par fermentation.
- Généralement, la récolte se fera autant que possible par temps sec et ensoleillé et de préférence le matin ou le soir. Il n'y a d'exception que pour les lichens et les racines que l'on récolte à toute heure.

Le meilleur moment pour travailler est le matin, quand le soleil a séché la rosée, et on ne doit pas pousser trop tard la cueillette car le soir les fleurs ouvertes dans la matinée ne se prêtent déjà plus à une bonne dessiccation.

D'autre part, il faut craindre l'échauffement des herbes fraîches mises dans les paniers, enfin il faut pouvoir mettre les plantes au séchoir le jour même. Il est à indiquer qu'il ne faut jamais ramasser les plantes vénéneuses en même temps que les plantes inoffensives et réciproquement [1].

## **I.2. La famille des Labiées (Lamiacées)**

### **I.2.1. Généralités**

Les lamiacées (labiées) comprennent environ 3000 espèces dont l'aire de répartition est extrêmement étendue mais avec prépondérance pour les régions méditerranéennes : thym, lavande, romarin, qui caractérisent la flore des garrigues. C'est une famille exceptionnellement homogène ; une Lamiacée est très facile à reconnaître [7].

### **I.2.2. Définition**

Les Lamiacées constituent une vaste famille d'angiospermes dicotylédones à fleurs gamopétales irrégulières, qui regroupe surtout des plantes herbacées et sous arbustives réparties dans le monde entier. Elles sont faciles à reconnaître avec leurs tiges quadrangulaires garnies de feuilles opposées tomenteuses et odorantes insérées sur des nœuds bien marqués. Leurs fleurs possèdent une corolle aux pétales soudées (gamopétale) mais à deux lèvres bien marquées : la lèvre supérieure arrondie en forme de casque, la lèvre inférieure plane et trilobée [8].

### **I.2.3. Caractères généraux des Labiées**

Les Labiées comptent plus de trois mille cinq cents espèces, quelques deux cents genres, répartis en sept sous-familles. La fleur est habituellement pentamère zygomorphe bilabée; toutefois, chez les menthes, les pétales sont subégaux. Il y a typiquement quatre étamines fertiles, la cinquième n'apparaissant pas ; parfois aussi, deux des étamines se réduisent à des staminodes. Ce sont la position du style et les caractères du fruit et de l'embryon qui permettent de distinguer les divers groupes [8]. Dans la famille des labiées, on peut trouver plusieurs type des plantes qui appartient a cette famille, parmi ces plantes on peut citer la *Zizyphora*.

### I.3. Les différents espèces de *Zizyphora*

#### I.3.1. *Zizyphora capitata* L.

C'est une plante annuelle basse à petite dressé aromatique, à poils denses, tiges simples ou très ramifiées. Feuilles lancéolées à ovales, pointues vertes, ponctuées de glandes en dessous, entières ou à dents minuscules, pétiolées, fleurs roses. Elle est indiquée en Algérie sur les hautes plateaux méditerranéen [8].



Figure 1 : *Zizyphora capitata* L.

#### I.3.2. *Zizyphora tenuior* L.

Il a été également indiqué en Algérie par Desfontaines; il diffère de notre espèce par ses anthères appendicutées, à une seule loge fertile et non biloculaire, ainsi que par son inflorescence longuement spiciforme rétrécie et son calice très hispide [8].



Figure 2: *Zizyphora tenuior* L.

### I.3.3. *Zizyphora clinopodioides* L.



Figure 3: *Zizyphora clinopodioides* L.

### I.3.4. *Zizyphora hispanica* L.

#### I.3.4.1. Description

Petite plante annuelle à tige dressée, nettement rameuse; les feuilles ovales lancéolées, ciliées sur les marges, sont opposées par deux. L'inflorescence spéciforme formé de verticillastres superposés pauciflores; la couleur de la fleur est violette, la corolle longuement tubuleuse, rétrécie à lobes très courts et nettement connivents [8].



Figure 4: *Zizyphora hispanica* L. après la récolte

### I.3.4.2. Identification

**La famille :** Lamiacées.

**Espèce :** *Zizyphora hispanica* L.

**Nom français :** La menthe pouliot des lieux secs.

**Nom vernaculaire :** Flio.

### I.3.4.3. Position systématique de *Zizyphora* L. [9]

<b>Règne :</b>	Végétal.
<b>Embranchement :</b>	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement :</b>	Angiospermes
<b>Classe :</b>	Dicotylédones
<b>Sous-classe :</b>	Gamopétales
<b>Ordre :</b>	Lamiales.
<b>Famille :</b>	Lamiacées (Labiées).
<b>Genre :</b>	<i>Zizyphora</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Zizyphora hispanica</i> L.

Cette espèce est rare, caractérisée par une odeur très forte et agréable.

### I.3.4.4. Propriétés thérapeutiques et utilisation traditionnelle

Les riverains de la commune de Djebel Mesaad et Boussaâda utilisent cette plante comme tisane pour calmer les douleurs de l'estomac et la fatigue du cœur et de même ils l'ajoutent dans le café pour donner un meilleur goût.

**Usage interne :** Le décocté, le macérât et la poudre végétale de la partie aérienne de cette plante, sont préconisés pour les douleurs d'estomac, cependant le décocté est utilisé pour la céphalée, les douleurs abdominales, la toux et l'ictère.

**Usage externe :** La poudre végétale de la partie aérienne de la même plante est utilisée sous forme de cataplasme pour soulager les douleurs de la céphalée.

### I.3.4.5. Habitat de *Zizyphora hispanica* L.

*Zizyphora hispanica* L. se maintient dans le secteur de l'Atlas Saharien, dans les hautes-plateaux algérois et oranais, dans les hautes-plateaux constantinois et rare en Boussaâda (Djebel Messad).

**I.3.4.6. Les Fiches techniques****Nom :** Bakai L.**Age :** 62.**Sexe :** Masculin.**Habitat :** Village de Djebel Messad.**Tableau 1:** Fiche technique 1

<b>Question</b>	<b>Réponses</b>
Nom vernaculaire	Fléau
Epoque et modalité de récolte	- période de récolte : Fin de Mars - Mode de récolte: enlever la partie supérieure de la plante et laisser les racines.
Parties utilisées	La partie aérienne.
Mode de préparation (la recette)	- La plante sèche. - Mode de préparation : Infusion. - Utilisation : seule.
Usage et posologie	- Usage interne: calmer la douleur de l'estomac et ajouter dans le café pour donner un goût agréable.
Précaution d'emploi	- Interdit aux femmes enceintes.

**Nom :** Mme Ben Aissa.

**Age :** 54.

**Sexe :** féminin.

**Habitat :** Boussaâda.

**Tableau 2:** fiche technique 2

Question	Réponses
Nom vernaculaire	- Fléau El djebel.
Epoque et modalité de récolte	- période de récolte : Fin de juin - Mode de récolte : enlever la partie supérieure de la plante et laisser les racines.
Parties utilisées	La partie aérienne, surtout les feuilles
Mode de préparation (la recette)	- La plante fraîche ou sèche. - Mode de préparation : Infusion. - Utilisation : seule ou associée.
Usage et posologie	<p><b>Usage interne :</b></p> <p>Le décocté, le macérât et la poudre végétale de la partie aérienne de cette plante, sont préconisés pour les douleurs d'estomac, cependant le décocté est utilisé pour la céphalée, les douleurs abdominales, la toux et l'ictère.</p> <p><b>Usage externe :</b></p> <p>La poudre végétale de la partie aérienne de la même plante est utilisée sous forme de cataplasme pour soulager les douleurs de la céphalée.</p>

# **Chapitre II**

Valorisation des  
ressources végétales par  
l'étude des métabolites  
secondaires

## **II.1. Les substances d'origine végétale**

Les substances naturelles sont en général des métabolites secondaires produites par les organismes, stimulés par plusieurs facteurs extérieurs comme les changements nutritionnels, climatiques, les infections répétées. Ces substances sont classées selon leurs groupements fonctionnels en plusieurs groupes chimiques : les phénols, les alcaloïdes et les huiles essentielles [10].

### **II.1.1. Les phénols et les polyphénols**

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble des substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamentale qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est lié directement au moins d'un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside...etc) [11]. Le phénol est le composé de base de ce groupe, il est utilisé comme désinfectant et pour la synthèse chimique. Les dérivés portant plusieurs fonctions OH sont appelés les polyphénols.

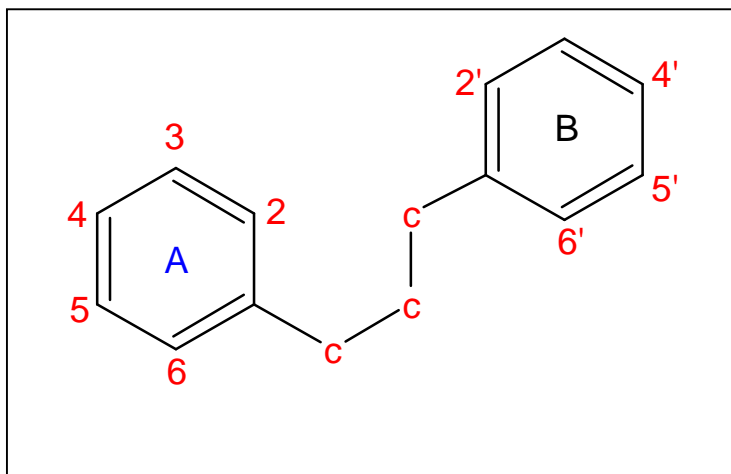
#### **II.1.1.1. Les flavonoïdes**

##### ***II.1.1.1.1. Définition***

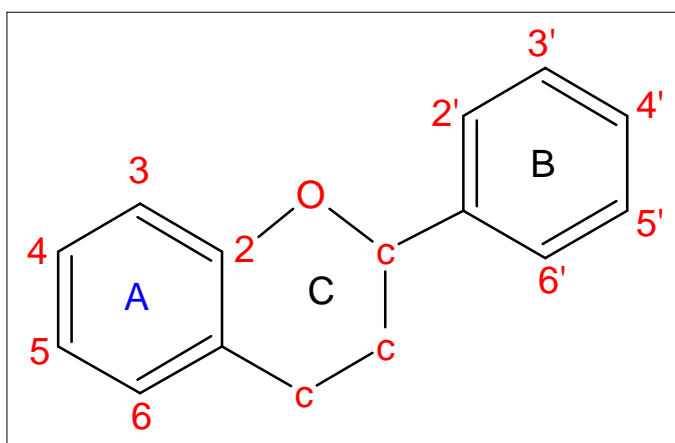
Les flavonoïdes sont des substances qui relèvent du métabolisme secondaire, le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels généralement polyphénoliques [12], très répandus chez les végétaux [13], presque toujours hydrocarbures, ils sont responsables de la coloration des fleurs [11].

##### ***II.1.1.1.2. La structure***

La plupart des flavonoïdes ont une structure de base relativement simple. Ils sont composés de deux cycles aromatique de type phényl (A et B) liées par un chaîne de trois (3) atomes de carbone généralement cyclique, soit un système C6 – C3 – C6 dont la configuration est la suivante [13]:



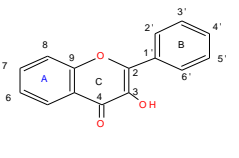







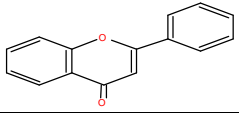



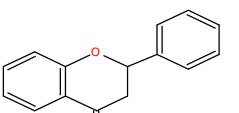


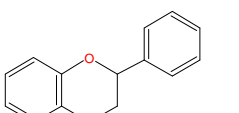



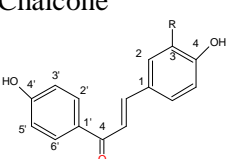


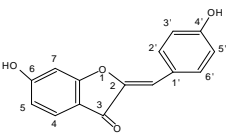

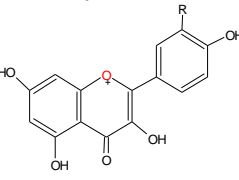


**Figure 5: Squelette de base des flavonoïdes**



**Figure6: Structure des flavonoïdes après l'oxydation**

Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes, la variation du degré d'oxydation de la chaîne carbonée (formant, en générale un hétérocycle C, par condensation avec un OH phénolique du noyau A comme le montre la figure (6)). Les différentes classes des flavonoïdes sont déterminées, par ailleurs, les différents cycles peuvent être modifiés par glucosation, méthylation, hydroxylation ou acylation.

**Tableau 3:** Structure des différentes classes des flavonoïdes [11].

Structure chimique	Flavonoïde (exemple)	Groupements hydroxyles								
		2'	3'	4'	5'	3	5	6	7	8
<p>Flavonol</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li> Quercétine</li> <li> Myricétine</li> <li> Fisétine</li> <li> Morine</li> <li> Kaempférol</li> <li> Rutine</li> <li> Quercétrine</li> </ul>		*	*		*	*	*	*	
<p>Flavone</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li> Lutéoline</li> <li> Apigénine</li> <li> Baicaléine</li> </ul>		*	*			*	*	*	
<p>Flavane</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li> Catéchine</li> <li> Méciadonol</li> </ul>		*	*		*	*		*	
<p>Flavanone</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li> Taxifoline</li> <li> Naringinine</li> <li> Naringine</li> </ul>		*	*		*	*		*	
<p>Chalcone</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li> Isoliquiritigénine</li> <li> Butéine</li> </ul>					H OH				
<p>Aurone</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li> Hispidol</li> </ul>									
<p>Anthocyanidine</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li> Pélargonidol (R = H)</li> <li> Cyanidol (R=OH)</li> </ul>									

### **II.1.1.1.3. Les propriétés physico-chimiques**

Les flavonoïdes sont des solides cristallisés dont la teinte varie du blanc et ivoire au jaune vif. Les hétérosides sont solubles dans l'eau (surtout à chaud), l'alcool et les autres solvants organiques polaires, insolubles dans les solvants organiques apolaires, les génines sont peu solubles dans l'eau et solubles dans l'éther[13, 14]. Les flavonoïdes sont solubles dans les solutions alcalines (ammoniaque ou potasse) en donnant une coloration jaune qui disparaît par l'addition d'acides [13].

Les flavonoïdes possèdent une bande d'absorption dans l'ultraviolet proche du visible; variant avec chaque type flavonique et permettant leur identification.

#### **▼ Substitution du squelette flavonique**

Les substitutions du squelette flavonique sont très diversifiées, on y trouve notamment des hydroxylations, des méthoxylations et des glycosylations. Les composés de chaque sous groupe se distinguent par le nombre, la position et la nature desubstituant sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C<sub>3</sub> intermédiaire [17] .

##### **1. La O-substitution**

###### **• L'hydroxylation**

D'une manière générale pour les flavones et les flavonols, et d'après les réactions debiogenèse, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [18].

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que lapolyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 4', 5') se fera par le biais des enzymes (hydroxylases) [19], [20]. Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylés[21].

Dans le cas des isoflavones, l'hydroxylation de la position 2' du cycle B conduit le plus souvent en présence des enzymes spécifiques à la formation du ptérocarpane [22].

- **La méthylation**

La fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (O-méthyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la S-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle.

Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone [19, 23].

Cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau B (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols [19].

Cependant, très peu de rapports parlent de la relation isoflavone-méthyltransferase. Par ailleurs la méthylation de la position 5 du cycle A et la position 4' du cycle B dans le cas de l'isoflavone se fait grâce à une enzyme séparée et purifiée par Khouri de l'espèce *Lupinus luteus* (fabacées) [24]

- **La O-glycosylation**

Elle s'effectue entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle alcoolique du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose). La O-glycosylation se fait en présence de l'enzyme Glucosyltransferase et un donneur de sucre comme UDP-Glu (Uridine diphosphate glucose).

D'une manière générale, l'hydroxyle de la position 7 constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones alors que dans le cas des flavonols c'est l'hydroxyle de la position 3 [18].

## 2. La C-substitution

- **La C-méthylation**

Le radical méthyle dans ce type de substitution va se lier directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison est rencontrée en position C-6 ou en position C-8, ou encore en position C-6 et C-8. L'enzyme catalysant la C-méthylation en position 6 et / ou en position 8 est toujours inconnue [25].

- **La C-glycosylation**

Les flavonoïdes C-glycosylés ne sont pas rares, on y trouve plus de 350 hétérosides [11].

Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide [26], D'une manière générale, la liaison carbone-carbone est rencontrée souvent en position C-6 et ou en position C-8.

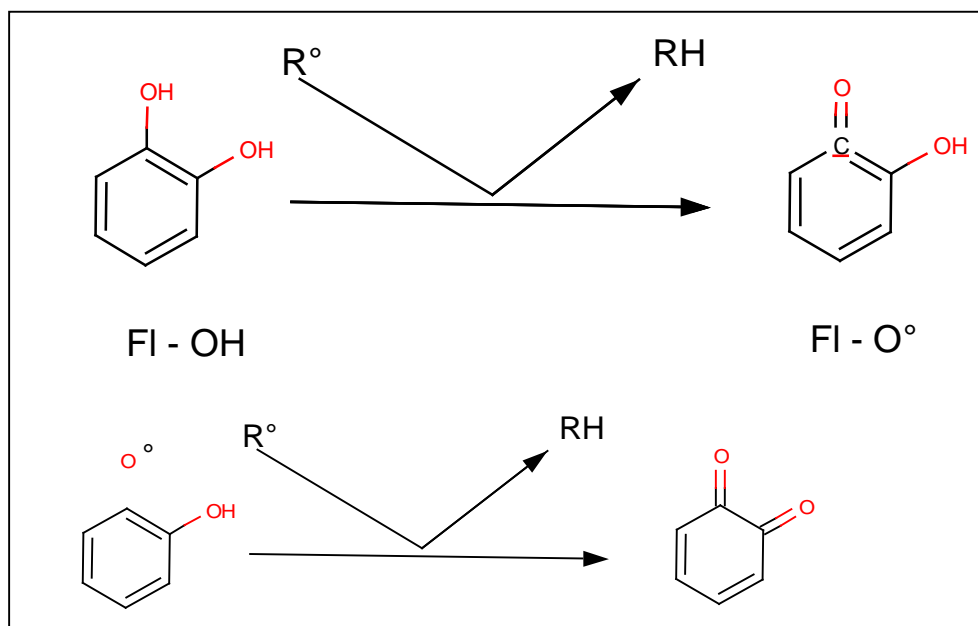
- ▼ **Activité antioxydante des flavonoïdes**

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes qui sont attribuées à; (i) leur capacité de piéger directement les RL, (ii) de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des EOR via les réactions de Fenton et Haber-Weiss, (iii) d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases, (iv) d'activer les enzymes antioxydantes et (v) de réduire les radicaux  $\alpha$ -tocophéryl [92 - 94].

- Û **Piégeage direct de radicaux libres**

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires.

À cause de leur faible potentiel redox [95], les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants ( $R\bullet$ ) comme le superoxyde, le radical peroxy et le  $OH\bullet$  par transfert d'hydrogène (Figure 7).



**Figure 7:**Réaction des flavonoïdes avec les EOR [95].

Le radical aroxyde résultant (Fl-O•) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable.

En outre, le radical aroxyde peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction qui peut prendre place en présence de taux élevés de métaux de transition, est responsable de l'effet prooxydant indésirable des flavonoïdes [96]. La capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend donc, non seulement du potentiel redox du couple Flav-O•/Flav-OH, mais aussi de la réactivité du radical aroxyde[97].

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur (scavenger) des radicaux libres [95, 98 - 103]. Ces travaux ont pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

- i) La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons (la substitution de ces groupements hydroxyles sur le cycle B par des groupements méthoxyles altère le potentiel redox et donc la capacité radical scavenger des flavonoïdes) [104, 105].

- ii) La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité radical scavenger des flavonoïdes [105].
- iii) La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 augmente également la capacité radical scavenger des flavonoïdes [105].

#### ***II.1.1.1.4. L'effet pharmacologique***

Les flavonoïdes ont des propriétés anti-inflammatoires, anticancérigènes et antioxydatives [15]. Ils sont des substances antimicrobiennes efficaces in vitro contre les microorganismes [16]. Ils ont des propriétés fongicides et insecticides (protègent l'arbre contre l'intrusion des champignons ou des insectes).

#### ***II.1.1.1.5. Analyse structurale des flavonoïdes***

L'identification des structures flavoniques est basée essentiellement sur les différentes techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) avec ses différents modes (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, COSY, etc...), ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible qui reste la méthode de choix pour ce type de composés [53], Elle donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution.

##### **a. La fluorescence sous lumière de Wood**

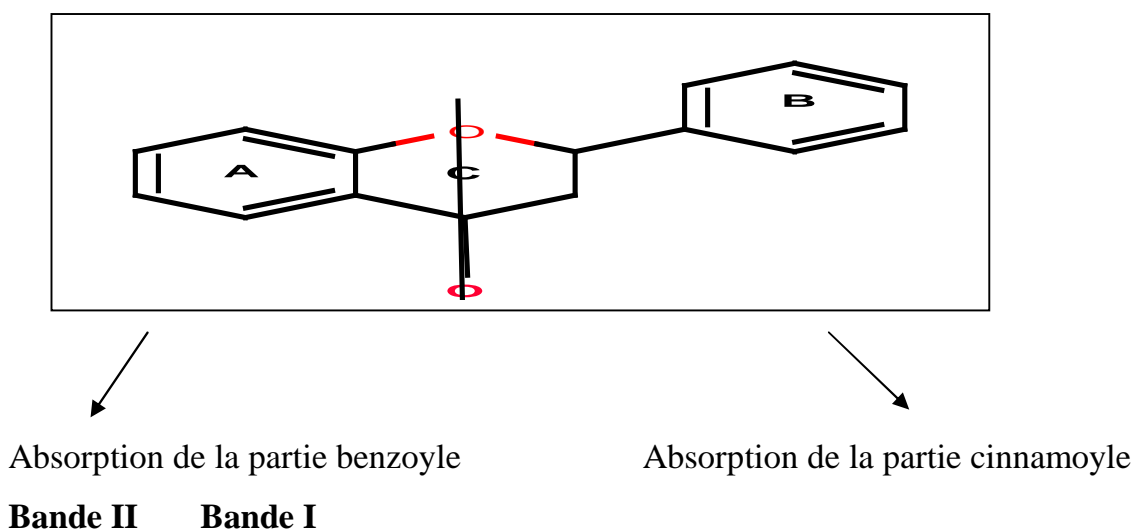
L'absorption des substances flavoniques sous lumière de Wood à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le tableau suivant montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique.

**Tableau 4:** Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques [53].

La fluorescence	Les structures possibles
<b>Violette noire</b>	Flavones avec 5, 6,7 ou 5,7, 8 trihydroxy flavone Flavonol avec 3-OR et flavanone Chalcones.
<b>Bleue</b>	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
<b>Jaune ou jaune terne</b>	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
<b>Orange fluorescente</b>	Isoflavones
<b>Jaune-verte</b>	Aurones
<b>Bleue-verte</b>	Flavanone sans 5-OH

#### b. La spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales [88].



**Figure 8:** Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

**Bande I** : présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau B, elle donne donc des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

**Bande II** : présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [88].

**Tableau 5** : Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes

Type de composé Flavonique	Bande I	Bande II
Flavone	320-350	250-270
Flavonol	352-385	250-280
Flavanone	300-330	245-275
Isoflavone	300-330 Epaulement	245-275

### c. Addition de réactifs (série spectrale UV) :

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que NaOH, NaOAc, AlCl<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et HCl. Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de complexe qui se traduira sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

- **Spectre en présence de NaOH :**

NaOH ou (NaOMe), une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Cet effet est plus important sur la bande I. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en 4'. Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de

l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres [115]. L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7. Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou 4' et 7.

Dans le cas des isoflavones hydroxylés sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est orthodihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [81]

- **Spectre en présence de NaOAc :**

L'acétate de sodium, NaOAc, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH.

Un faible déplacement bathochrome de la bande II des flavones, et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en 7. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8 [116].

Dans le cas des isoflavones, le NaOAc ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7 [116], ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20 nm). Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [116].

- **Spectre en présence de NaOAc +H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> :**

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système orthodihydroxyle sur le cycle B (3', 4') ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I [116].

- **Spectre en présence de AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub>+HCl :**

La présence du chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La

formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre  $\text{AlCl}_3$  et les groupes ortho dihydroxyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl [117], par contre, ceux formés entre  $\text{AlCl}_3$  et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I. par rapport au spectre après addition de  $\text{AlCl}_3$  et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le MeOH.

#### **d. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN**

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques [54]. C'est une méthode précise et efficace, mais nécessite une grande quantité du produit ce qui limite son utilisation par rapport aux autres méthodes d'analyses.

##### **ü La RMN du proton (RMN $^1\text{H}$ )**

RMN du proton informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm elle permet de connaître [54, 55].

- La position et le nombre de divers protons porté par le flavonoïde,
- Le nombre de substituants méthoxyles porté par le squelette flavonique,
- Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

##### **ü La RMN du carbone 13 (RMN $^{13}\text{C}$ )**

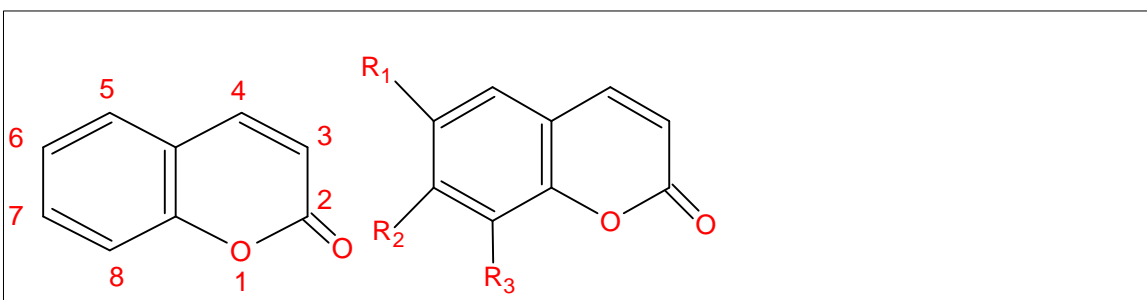
RMN du carbone 13 donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule [14, 55], telles que le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement, la connaissance de type des liaisons  $-\text{C}$  et / ou  $-\text{O}$  sucres.

## II.1.1.2. Les coumarines

### II.1.1.2.1. Définition

Les coumarines tirent leur nom de "coumarou", d'où fut isolée en 1820 la coumarine. Elles sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy -z - cinnamique. Plus d'un millier de coumarines ont été décrites et les plus simples d'entre elles sont largement distribuées dans le règne végétal [11].

### II.1.1.2.2. Structure chimique



**Figure 9:** Structure chimique des coumarines

$R_1 = R_3 = H$ ,  $R_2 = OH$  ... Ombelliférone.

$R_1 = R_3 = H$ ,  $R_2 = OCH_3$  ... Herniarine.

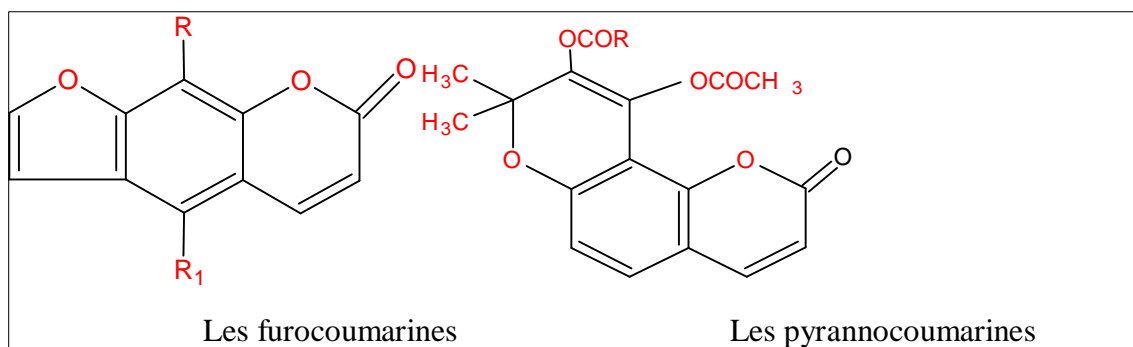
$R_1 = OCH_3$ ,  $R_2 = R_3 = OH$  .... Fraxétole [11].

Ces constituants possèdent une ou plusieurs fonctions phénoliques, étherifiées ou non; C'est pourquoi on les rattache souvent aux polyphénols. On les divise en :

Ø **Coumarines simples** : Les plus répandues dans le végétal possèdent des substitutions ( $OH$  ou  $OCH_3$ ) en 6 et 7 [11].

Ø **Coumarines complexes** : On distingue :

- Les furocoumarines (Rutacées, Umbellifères).
- Les pyranocoumarines.



**Figure 10:** Quelques structures des coumarines

### ***II.1.1.2.3. Les propriétés physico-chimiques***

Les coumarines sont des solides cristallisés blancs ou jaunâtres de saveur généralement amère. Elles sont sublimables et entraînaient à la vapeur d'eau. Les coumarines hydroxylées possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette. Leur spectre UV est également caractéristique et sert à leur identification. Les propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone insaturée, notamment l'ouverture de l'anneau lactonique en milieu alcalin.

### ***II.1.1.2.4. Les propriétés pharmacologiques***

L'intérêt pharmacologique des drogues à coumarines est limité d'une façon générale, ainsi que leurs dérivés contre les troubles veineux (exulose, exulétol). La coumarine a fait l'objet d'études chimiques chez des patients atteints de cancers avancés; elle est immunostimulante et développerait une activité cytotoxique. Rapidement métabolisée au niveau du foie en 7-hydroxy coumarine, elle peut rarement, induire une hépatonécrose sévère [11, 13].

## **II.1.2. Les alcaloïdes**

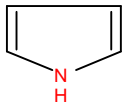
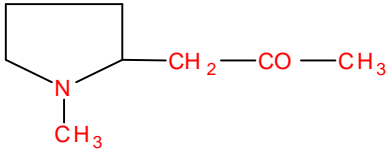
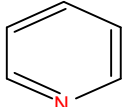
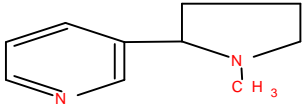
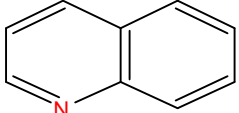
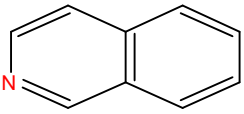
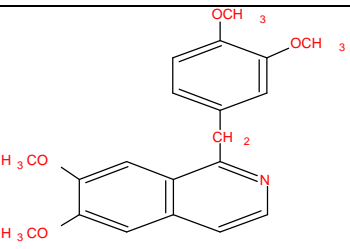
### **II.1.2.1. Définition**

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées, le plus souvent, d'origine végétale, pour la plupart de série cyclique, basique, donnant des réactions de précipitation avec certains réactifs appelés "réactifs généraux des alcaloïdes" et données à faibles doses, des propriétés physiologiques et pharmacodynamiques marquées [13, 15].

### **II.1.2.2. Structure et Classification**

Nous nous bernerons à donner ici la classification chimique des alcaloïdes d'après la nature de leur noyau fondamental [13, 27].

**Tableau 6:** Classification chimique des alcaloïdes d'après la nature de leur noyau fondamental [28].

Noyau fondamental	Exemple	La structure
Pyrole 	Hygrines de COCA	
Pyridine 	Nicotine de Tabac	
Quinoléine 	Quinine de quinquina	
Iso quinoléine 	Papavérine de Pavot	

### II.1.2.3. Les propriétés physicochimiques

Les alcaloïdes sous leur forme alcaline ne sont pas hydrosolubles, tandis qu'ils sont très solubles dans les solvants organiques non polaires et les alcools (très concentrés) [29]. Sous la forme alcaline, les alcaloïdes sont sensibles à la température, à la lumière et à l'oxydation.

Les alcaloïdes forment avec les acides minéraux ou organiques des sels solubles dans l'eau et dans les alcools dilués, mais insolubles dans les solvants organiques [29, 30].

Les réactifs de précipitation pour les alcaloïdes sont appelés "les réactifs généraux des alcaloïdes", ce sont des solutions des complexes à base d'iode ou de métaux lourds utilisés pour l'identification de ces composés dans la plante, tels que: Solution neutre de mercuriodure de potassium: Réactif de Valser-Mayer (précipité blanc jaunâtre). Solution acide d'iodobismuthite: Réactif de Drangendorf

(précipité rouge orange). Solution d'iodure de potassium iodé: Réactif de Bouchardat (précipité brun).

Les alcaloïdes ont des masses moléculaires variant de 200 à 900 g. mol<sup>-1</sup> exp: Conicines (C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N, 127), Vincristine (C<sub>46</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>, 824). A l'état de base, les alcaloïdes sont peu ou pas solubles dans l'eau sauf l'atropine, hyoscyamine, la nicotine, la conine et la pelletiérine [11].

Leur saveur est en général amère. Les alcaloïdes non volatils sont inodores; ceux qui se volatilisent ont une odeur pénétrante, en général désagréable, et propre à chaque espèce [31]. Les alcaloïdes oxygénés sont le plus souvent solides, cristallisables et colorables, par contre les alcaloïdes non oxygénés sont des liquides à la température ordinaire mais volatiles à la vapeur d'eau (exp. Nicotine) sauf la caféine, colchicine, alcaloïdes phénoliques qui sont solubles dans l'eau sous forme moléculaire [31].

#### **II.1.2.4. L'effet pharmacologique**

Les alcaloïdes ont une activité biologique et à ce titre, ils entrent dans la composition de nombreux médicaments comme principe actif. Doués de propriétés physiologiques et toxicologiques remarquables: Au niveau du système nerveux central, qu'ils soient dépresseurs (Morphine) ou stimulants (Caféine). Au niveau du système nerveux autonome sympathomimétique (éphédrine) ou sympatholytique (ésérine), anticholinergiques (atropine), ganglioplégiques (nicotine) [11, 32].

D'autres ont des propriétés anesthésiques locales (cocaïne), antiferillants (quinidine), antioécidés (émétine) [6]. Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans le système de défense contre les herbivores et les pathogènes [33].

#### **II.1.3. Huiles essentielles**

##### **II.1.3.1. Définition**

Les H.E sont des produits du métabolisme secondaire spécifiques aux végétaux supérieurs [34], elles sont généralement odoriférantes et volatiles, obtenues par les méthodes de distillation ou par l'extraction à l'aide de solvants, dans les conditions normales, ces huiles sont aussi connues sous les noms d'huiles

volatiles, des huiles étheriques ou encore essences [35]. Elles se différencient des huiles fixes par leurs caractères physiques et leurs compositions chimiques.

### **II.1.3.2.La qualité des huiles essentielles**

La qualité est mesurée par sa conformité à des normes qui peuvent varier selon l'utilisation de l'huile essentielle, par exemple: les normes "AFNOR" (Association Française pour la Normalisation) et ISO (Organisation Internationale de Standardisation) sont les barèmes utilisés pour juger la qualité des huiles essentielles dans les secteurs des parfums.

- En phytothérapie, leur qualité peut être assurée par la présence d'une certaine quantité de substances biologiquement actives.
- En pratique, la qualité des huiles essentielles est évaluée de deux façons: premièrement par des analyses chimiques et physico-chimiques et deuxièmement par les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle.
- La première est effectuée par des laboratoires spécialisés et la deuxième par un panel de personnes expérimentées ou encore par un "nez artificiel"[36].

### **II.1.3.3.Localisation au niveau de la plante**

Les H.E peuvent être stockées dans tous les organes aériens de la plante (fleurs, fruits, feuilles, graines). Dans une même plante, elles peuvent être présentées à la fois dans différents organes, pour cela la composition des essences peut varier d'un organe à l'autre (huile essentielle de fleurs, de feuilles et de fruits...). Elles sont particulièrement riches dans certaines familles[6]:

- Myrtacées, Rytacées: elles sont localisées dans des poches sécrétrices schizogènes.
- Conifères, Ombellifères: elles sont localisées dans des canaux sécréteurs.
- Labiées, Composées: elles sont localisées dans des poils sécréteurs.

### **II.1.3.4.Rôle des huiles essentielles dans la plante**

Le rôle que les huiles essentielles jouent est mal connu. On conçoit toutefois que les terpèneoides aient un rôle de protection contre les prédateurs (insectes, champignons) et un rôle dans l'attraction des pollinisateurs [36]. Certains auteurs rapportent l'effet inhibiteur des huiles sur la germination de graines des autres

espèces [11]. Dans un bulletin de l'UNESCO (1960), on signale que la formation d'H.E par certaines plantes semble jouer un rôle dans leur protection contre la sécheresse [28].

#### II.1.3.5. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont liquides aux températures ambiantes généralement incolores ou faiblement colorées lorsqu'elles sont fraîchement extraites, à l'exception des essences renfermant de l'azulène qui sont bleues (ex : *Matricaria chamomilla* L.). Elles se caractérisent par une odeur aromatique et une volatilité très remarquable. Elles ont généralement une densité inférieure à celle de l'eau (0,85 à 0,95) et sont entraînable à la vapeur d'eau. Seules trois huiles essentielles ont une densité supérieure à celle de l'eau (les huiles de *Cinnamomum zeylanicum* L., d'*Eugenia caryophyllata* L. et de *Sassafras albidum*), elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire [13, 37, 38].

- Elles s'oxydent facilement et donnent des produits résinifères par fixation de l'oxygène de l'air sous l'action de la lumière en même temps que leur odeur se modifie, leur point d'ébullition augmente, leur solubilité diminue.

Aussi, devrait-on conserver les huiles essentielles dans des flacons bien bouchés, à l'abri de la lumière et à une température de l'ordre de 4°C.

#### II.1.3.6. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants dont un ou plusieurs sont généralement majoritaires et donnent l'aspect odorant particulier à l'huile essentielle. Les autres apportent en plus, selon Paris et Hurabielle (1981), une finesse plus ou moins grande. Les constituants appartiennent de façon quasi exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: les groupes des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils [11].

### II.1.3.7. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été utilisées depuis les temps les plus anciens dans le traitement de très nombreuses maladies.

- ✚ Par voie externe (en onction, en bain aromatique ou pulvérisation).
- ✚ Par voie externe, certaines d'entre elles sont appliquées directement sur la peau, leur pouvoir de reconstitution tissulaire, donc cicatrisant [38], d'autres sont utilisées contre le rhumatisme car elles agissent en augmentant le flux sanguin dans les régions traitées [2, 39] ou dans le traitement des différentes dermatoses, d'acnés et des rougeurs [2].
- ✚ Par voie interne, elles peuvent être utilisées par voie buccale [39].

En général, l'activité des huiles essentielles est loin d'être celle de la plante entière ou celle d'un constituant isolé, Bruneton [11] a noté que l'activité cholérétique attribuée au Romarin est due à la présence d'acides phénoliques alors que l'huile essentielle peut être antiseptique.

\* Ausloos [40], résume les bienfaits de chaque groupe chimique des constituants des huiles essentielles comme suit :

- ✚ Les acides : il s'agit de molécules possédant des propriétés anti-inflammatoires très puissantes et qui – secondairement - présentent des aspects hypothermisants et hypotenseurs.
- ✚ Les alcools monoterpéniques: ces molécules jouent un rôle important en matière d'immuno-stimulation et de traitements anti-infectieux (bactéricides et fongicides).
- ✚ Les alcools sesquiterpéniques: sont des composés immunostimulants et des tonifiants qui ne présentent pas de toxicité.
- ✚ Les aldéhydes: se présentent sous deux formes : les aldéhydes aromatiques et les aldéhydes terpéniques. Les premiers ont des propriétés et des effets secondaires identiques à celles des phénols, tandis que les aldéhydes terpéniques ont des propriétés calmantes, anti-inflammatoires et antalgiques.
- ✚ Les azulènes et les sesquiterpènes: sont des molécules anti-allergiques utilisées également comme sédatives, activateurs veineux et anti-inflammatoires.

- ✚ Les acétones: sont des molécules aromatiques les plus délicates à manipuler. Les acétones ont trois fonctions principales: ils sont mucolytiques, lipolytiques et cicatrisants.
- ✚ Les coumarines: elles ont des effets anti-coagulants, anti-convulsivants et des effets hypotensifs.
- ✚ Les monoterpènes: sont surtout utilisés comme antalgiques.
- § Les oxydes: sont utilisés pour leurs pouvoirs expectorants, antiviraux et anti-parasitaire, secondairement ils présentent des propriétés décongestionnantes et mycolytiques (au niveau de l'arbre broncho-pulmonaire essentiellement).

De nombreuses propriétés thérapeutiques sont attribuées aux plantes ou aux huiles essentielles différemment qu'aux constituants majoritaires seuls de ces huiles. Il n'est donc pas nécessaire d'attribuer l'activité à un constituant majoritaire actif, car souvent une combinaison de plusieurs constituants présents en faibles quantités présente une activité biologique importante [1].

#### **II.1.3.8. La teneur**

Quantitativement, le rendement en H.E est faible (de l'ordre de 1% à 1%) et variable d'un groupe taxonomique à un autre [11]. Les meilleurs rendements sont obtenus au moment de la floraison.

#### **II.1.3.9. Conservation des Huiles Essentielles:**

Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et perdent rapidement leurs propriétés. Elles commencent à vieillir au bout de six mois, elles perdent leurs propriétés quand elles sont exposées, à la chaleur et à la lumière. Par conséquent il est recommandé:

- § D'utiliser des flacons de faible volume en Aluminium, en verre brun, entièrement rempli et fermé de façon étanche.
- § De stocker à basse température qui doit être entre 3° et 4° pendant une durée de 12 à 18 mois après leur fabrication.
- § De garder les bouteilles dans la position verticale.
- § De garder les huiles essentielles dans un endroit sombre frais et sec pour éviter son oxydation et sa polymérisation [41].

### II.1.3.10. Facteur influençant sur la composition chimique

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions: l'environnement, le génotype, origine géographique, la période de récolte, le séchage: lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, les virus et mauvaises herbes [39, 42].

### II.1.3.11. Activités biologiques

Les huiles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des parfums [42]. Les huiles ont des propriétés antiseptiques (Eucalyptus), dépuratives ou cicatrisantes (Lavande) [43]. Ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux [44] ont montrés dans une étude portant sur l'huile essentielle de Thymus (*Thymus vulgarae*L.) que les chemotypes phénoliques (Thymol et carvacrol) et non phénoliques (cinalvol) sont capable de réduire le radical DPPH (2,2 – diphenyl -1-picrylhydrazyl) avec un effet plus élevé enregistré pour les chemotype phénoliques, ces observation sont expliquées par la concentration élevé de Thymol et carvocrol dans ces derniers.

## II.2. Les différentes méthodes d'extraction et de séparation des métabolites secondaires

### II.2.1. Les méthodes d'extraction

#### II.2.1.1. La distillation

La distillation peut être définie comme étant un procédé de séparation des composés d'un mélange de deux ou plusieurs constituants liquides, elle est basée sur la différence virtuelle des pressions de vapeur de ces constituants. La distillation comporte l'hydrodistillation et la distillation à la vapeur d'eau ou les deux à la fois [45].

##### II.2.1.1.1. L'hydrodistillation

Cette méthode exige le contact direct de l'eau et de l'organe végétal qui sera ensuite chauffée dans un récipient. Elle présente plusieurs inconvénients tels que: Le non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau +organe végétal), Calcination ou cuisson des organes végétaux.

### **II.2.1.1.2. l'entraînement à la vapeur**

Cette méthode d'extraction se base sur le caractère volatil des H.E facilitant leur entraînement par la vapeur. Le matériel végétal est traversé par la vapeur d'eau qui se charge des H.E. Ensuite, elle est condensée dans un serpentin refroidi par un courant d'eau froide. Les constituants volatils après condensation donnent un mélange hétérogène formé par les molécules et l'eau aromatique. On laisse décanter le mélange et on isole les huiles par différence densité [11]. En conclusion, l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau nous permettant d'obtenir des huiles, qui diffèrent qualitativement et quantitativement, dont la deuxième est préférable à la première dans l'extraction totale des H.E (distillation à la vapeur peut améliorer le rendement de 33% par rapport à l'hydrodistillation) [6].

### **II.2.1.2. Extraction par les solvants**

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des phénoliques, notamment les flavonoïdes [11, 46]. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire, les étapes essentielles sont:

- Macération répétée du matériel végétal dans une solution hydroalcoolique (méthanolou éthanol).
- Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. Les solvants les plus utilisés sont : le dichlorométhane ou le chloroforme qui permettent l'extraction des aglycones méthoxylés et hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés, et en dernier le n-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.

### **II.2.1.3. Expression**

Réservée aux agrumes (citron, orange..), cette méthode d'extraction est très simple. Le zeste ou l'écorce est retiré puis soumis à une forte pression, d'où l'H.E se libère alors de minuscules vésicules qui éclatent [13].

## II.2.2. Les méthodes de séparation chromatographique

### II.2.2.1. La chromatographie

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des métabolites secondaires. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase [47]. Plusieurs méthodes existent.

#### II.2.2.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La Chromatographie sur couche mince est utilisée comme technique de routine, pour l'analyse rapide de fractions obtenues à la suite d'une séparation initiale. La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption: la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant [48]. Après la migration, le repérage des molécules s'effectue soit par ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode. La distance de migration des composés est ensuite mesurée et comparée à celle du front de la phase mobile, ceci permet de définir la référence frontale  $R_f$  caractéristique de chaque composé.

#### II.2.2.1.2. Chromatographie sur colonne

La chromatographie liquide classique utilise des colonnes avec un diamètre interne de 1cm. (Ou plus) et des particules de 100 à 200 $\mu$ m de diamètre. Dans une colonne en verre, munie d'un robinet, on introduit le support de séparation choisi, un bouchon de laine de verre placé avant la sortie de la colonne pour empêcher le passage des particules les plus fines.

## Principe

L'échantillon est déposé au sommet de la colonne d'éluant coule ici sous pression atmosphérique à travers la colonne. L'éluant qui contient des substances dissoutes dans la phase mobile sera récupéré (par exemple en fraction), et on fait le C.C.M pour chaque fraction puis on mélange les fractions similaires qui ont le même  $R_f$ [49].

### *II.2.2.1.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)*

Chromatographie en phase gazeuse s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés dans l'injecteur. C'est de loin la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide absorbant (silice, alumine...), on parle de chromatographie gaz-solide [49]. La CPG permet une évaluation quantitative et qualitative de la composition chimique des huiles essentielles. Elle présente de nombreux avantages: facilité de mise en œuvre, temps d'analyse assez court et fiabilité des résultats [11].

### *II.2.2.1.4. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)*

Si la chromatographie permet à elle seule de séparer correctement les différents constituants d'un mélange, il est néanmoins délicat de se livrer à une interprétation structurale permettant une identification certaine, car les paramètres déduits de la rétention sélective des solutés au travers de la colonne sont souvent lourds à manier et, dans la plupart des cas, peu reliés aux édifices moléculaires organiques.

L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, dans le but d'ajouter à la chromatographie une

deuxième dimension analytique, s'est concrétisée dès 1960 dans la combinaison entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (CPG / SM)[50] .

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables [11, 51].

#### ***II.2.2.1.5. La chromatographie liquide à haute performance***

La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine. Les particules solides ont un diamètre pouvant atteindre jusqu'à 5 µm. Le garnissage est tassé dans une colonne fermée. La phase mobile liquide circule sous l'effet d'une haute pression.

L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques microlitres) dans l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne.

Un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données [49, 52]. Cette technique est peu intéressante pour les fractions volatiles, toutefois elle est efficace pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour opérer des préfractionnements, on peut la coupler également à un analyseur de masse [11].

# **Chapitre III**

## L'activité biologique

### III.1.L'activité antibactérienne et antifongique

#### III.1.1. Les souches testées

Les souches utilisées dans les tests font parties de trois groupes de microorganismes qui sont les champignons, les levures et les bactéries. Ces dernières proviennent de l'American Type Culture Collection :

##### **Les bactéries:**

*Citrobacter freundu* ATCC 8090, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Klebsilla pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter banmanu* ATCC 19606, *Proteus miralibis* ATCC 35659, *Lysterial monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus Sp*, *Pseudomonas aeruginosa*.

**Les champignons:** *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*.

**Levure :** *Candida albicans*.

#### III.1.2. Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10ml de milieu de culture incliné (PDA acidifié pour les moisissures, gélose nutritive pour les bactéries et levures).

#### III.1.3. Les milieux de cultures

La culture des bactéries nécessite l'utilisation du milieu de culture Muller Hinton (MH), la gélose nutritive et le bouillon nutritif qui proviennent de l'institut Pasteur d'Alger. Pour la culture des moisissures, le milieu utilisé est celui de sabouraud.

**III.1.4. Les antibiotiques****III.1.4.1. Définition**

Les antibiotiques sont des substances organiques produits par des micro-organismes ou issue de la synthèse et exercent à faible dose une action envers d'autres micro-organismes [59-61].

**III.1.4.2. Les caractéristiques générales des substances antibactériennes**

Un agent bactéricide tue l'organisme cible, mais son activité dépend de la concentration et dans certains cas, aux faibles concentrations, il peut être seulement bactériostatique. L'effet d'un agent varie également selon l'espèce cible : un agent bactéricide pour une espèce peut être bactériostatique pour une autre. On peut avoir une idée sur l'efficacité des agents chimiothérapeutiques contre un microorganisme en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est la concentration la plus faible d'un antibiotique capable d'empêcher le développement d'un microorganisme particulier.

**III.1.4.3. Classification des antibiotiques**

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères: l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. Yala et al. (2001) classent les antibiotiques tout en adoptant la classification en grandes familles :

- 1- Les Bêta-lactamines.
- 2- Les aminosides ou aminoglycoside.
- 3- Phénicoles.
- 4- Les tetracyclines.
- 5- Les polypeptides.
- 6- Les macrolides.
- 7- Les quinolones.
- 8- Sulfamides et association.
- 9- Les nitrofuranes.
- 10- Les nitroimidazoles.
- 11- Acide fusidique.

- 12-Novobiocine.
- 13-Les rifamycines.
- 14-Les antifongiques.

### **III.1.5. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de *Zizyphora hispanica***

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion, qui initialement est conçue pour les antibiotiques (antibiogramme), mais en substituant les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés par de l'huile essentielle (aromatogramme). Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 18 à 24h. Après ce délai, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque.

En ce qui concerne les champignons, des suspensions de cellules fongiques et de spores sont préparées à partir de cultures pures et jeunes, dans de l'eau physiologique stérile. Ces suspensions servent à ensemercer la gélose Sabouraud simple (moisissures). Les géloses sont préparées au préalable dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, l'épaisseur de la gélose est de 4 mm. L'ensemencement des milieux se fait par écouvillonnage selon les recommandations de l'OMS [63]. L'incubation des champignons se fait à une température de 28°C alors que celle des levures se fait à 37°C.

## **III.2. L'activité antioxydante**

### **III.2.1. Stress oxydant et radicaux libres**

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles [111].

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, donc très réactifs et, par conséquent leur durée de vie est généralement très courte, de l'ordre de  $10^{-4}$  secondes, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron [64-65].

Les radicaux libres ne sont pas toujours néfastes, ils permettent au corps de contrôler la tonicité des muscles lisses, de combattre les inflammations et de lutter contre les bactéries [67]. Cependant la notion de « radicaux libres » et de « stress oxydant » est de plus en plus utilisée pour expliquer les différentes atteintes pathologiques, soit comme un facteur déclenchant, soit comme des causes de complication dans leur évolution [68-69].

L'oxygène ( $O_2$ ) est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ), puis en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS) [66]. La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau (réaction 1). Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase [106].

Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser fuir une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène. C'est ainsi qu'environ 2% de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (réaction 2) conduisant à la formation du radical superoxyde  $O_2$  au niveau de l'ubiquinone [107].



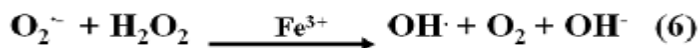
Le radical superoxyde est soumis à une réaction de dismutation catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (réaction 3).



Le  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut traverser les membranes biologiques et former le plus puissant des espèces réactives, le radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ), par interaction avec les métaux de transition comme  $\text{Fe}^{2+}$  (réaction 4) et  $\text{Cu}^+$  (réaction 5).



Le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2$  donnent aussi naissance au radical hydroxyle (réaction 6) via une réaction dite de Haber et Weiss [106,109].



### III.2.2. Source des radicaux libres

L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement via les cellules phagocytaires. On s'ajoute d'autres facteurs qui peuvent contribuer dans la formation des radicaux libres dont les rayonnements UV capables de générer des anions superoxyde ou de l'oxygène singulet, les rayons X ou  $\gamma$  sont aussi capables de couper la molécule d'eau en deux radicaux par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants [70]. Les poussières d'amiante et de silice sont des sources des ROS [71,72]. Les fumées de combustion (de cigarettes, de bois, etc.), la consommation de l'alcool et l'effort physique intense sont aussi des paramètres à ne pas écarter [67,73,74].

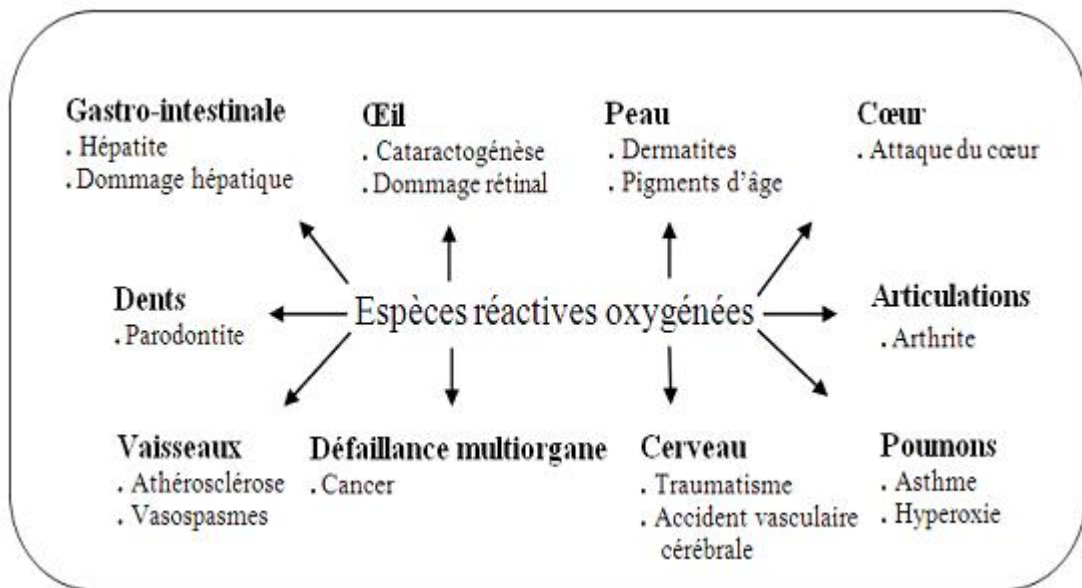
### III.2.3. Stress oxydant et atteintes pathologiques

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [75]. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [76].

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales,

on dit que la balance antioxydants, prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé «stress oxydant » [71].

Le stress oxydatif, principale cause initiale de plusieurs maladies: cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré.



**Figure 11. Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées [112]**

### III.2.4. Les moyens de protection (les antioxydants)

Un antioxydant est toute substance capable de retarder ou d'inhiber l'oxydation des substrats biologiques [75,77-78]. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs [79]. Ces antioxydants ont deux origines, l'une apportée par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes ou acide lipoïque, tandis que l'autre est endogène représentée par des enzymes, tels que les superoxydases dismutases (SOD) et la catalase (rôle de protection).

### III.2.5. Test de l'activité antioxydante

L'activité antiradicalaire des extraits et des huiles essentielles a été évaluée par la capacité de balayage du radical libre DPPH. Cette méthode décrite par Masuda consiste à suivre la réduction du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par un antioxydant à l'aide de spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des huiles essentielles et des extraits.

Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (Fig.12). Cette décoloration est représentative de la capacité des composés de l'huile essentielle à piéger ces radicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique. Ce test nous permet donc d'obtenir des informations sur ce pouvoir

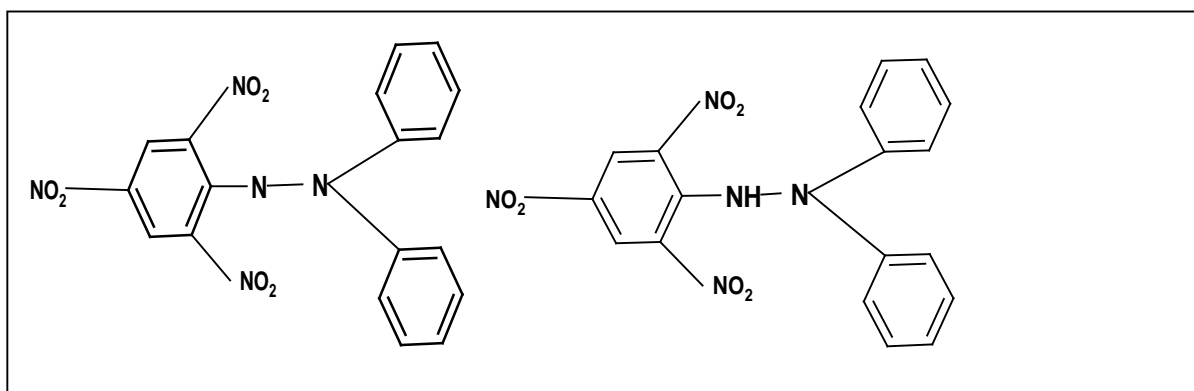


Figure 12 : Forme libre et réduite du DPPH [81]

#### III.2.5.1. Préparation de la solution DPPH

Le DPPH 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$  ; Mr : 394.33), est solubilisé dans du méthanol absolu (4mg/100ml).

#### III.2.5.2. Solution d'extrait

Pour le test les échantillons ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu [82]. Pour tous les extraits, on prépare des solutions dans du méthanol absolu. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour en avoir

différentes concentrations. D'autres concentrations ont été rajoutées pour les préparations huileuses.

### III.2.5.3. L'essai au DPPH

Le protocole utilisé pour l'évaluation de l'effet scavenger des huiles essentielles contre le radical DPPH est celle de Masuda .Ce protocole a été résumé dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 7 :** Protocole pour les HE

	DPPH	MeOH	Extrait
Blanc	/	600µl	600µl
Control	600µl	600µl	/
Echantillon	600µl	/	600µl

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 600µl de la solution à tester, on ajoute 600µl de solution au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre. Le contrôle négatif est composé de 600 µl de la solution méthanolique au DPPH et de 600 µl de méthanol.

Egalement, le même test a été réalisé avec les autres extraits du plante mais avec un autre protocole "Cuendet "qui a été résumé dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 8:** Protocole pour les autres métabolites secondaires

	DPPH	MeOH	Extrait
Blanc	/	1250µl	50µl
Control	1250µl	50µl	/
Echantillon	1250µl	/	50µl

#### III.2.5.4. Expression des résultats

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50%, les résultats sont exprimés en activité antioxydante. L'activité antioxydante, qui exprime les capacités de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. L'activité antioxydante "AA%" est donnée par la formule suivante :

$$\text{AA \%} = 100 - \{[(\text{Abs}_{\text{test}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}) \times 100] / \text{Abs}_{\text{control}}\} \quad [76]$$

$$\text{Inhibition \%} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}) / \text{Abs}_{\text{control}} \times 100 \quad [72]$$

**AA** : Activité Antioxydante.

**Abs** : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures  $\pm$  écart type. La valeur EC50 (autrement appelée la valeur IC 50) a été déterminée pour chaque extrait, est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constitué de méthanol et DPPH. Les valeurs IC50 moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée est représentée par l'activité antioxydante en pourcentage [84].

**PARTIE  
EXPERIMENTALE**

# **Chapitre IV**

## **Matériels et méthodes**

## **IV.1. Matériels végétal**

### **IV.1.1. Récolte des plantes**

Les parties aériennes de *Zizyphora hispanica* L. sont recueillies dans la région de Boussaâda, située à environ 68km de la ville de M'sila en fin du juin 2010.

### **IV.1.2. Conservation**

Les plantes, fraîchement récoltées, sont lavées, et laissées sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Devenues sèches, les parties utilisées sont récupérées dans des sacs propres. Notant qu'avant le lavage, une certaine quantité des plantes sont récupérées pour la mesure du taux d'humidité.

### **IV.1.3. Détermination de l'humidité**

Le contenu en humidité des plantes a été déterminé par un analyseur d'humidité.

## **IV.2. Les huiles essentielles**

### **IV.2.1. Procédé d'extraction**

La plante est coupée en parties très fines et soumises à l'hydrodistillation en se servant du dispositif d'extraction type Clevenger (fig11). L'hydrodistillation se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles (HE). L'opération consiste à immerger une quantité de la masse végétale dans un grand ballon (1) en verre (de 6 litres) contenant une quantité suffisante d'eau distillée sans remplir complètement le ballon (le contenu du ballon ne doit pas dépasser les trois tiers) pour éviter les débordements au cour de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon (2). Les vapeurs chargées de l'huile essentielle passent à travers le tube vertical (3), puis à travers le réfrigérant (4) où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli au préalable d'eau distillée (5). En raison de la différence de densité, l'huile surnage à la surface de l'eau distillée (6). L'HE obtenue est récupérée puis séchée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été

retenu dans l'huile. L'hydrodistillation est réalisée pendant 3 heures. L'huile essentielle obtenue est conservée dans un flacon opaque bien scellé à l'abri de la lumière et à température de 4 à 6 C°.[1]

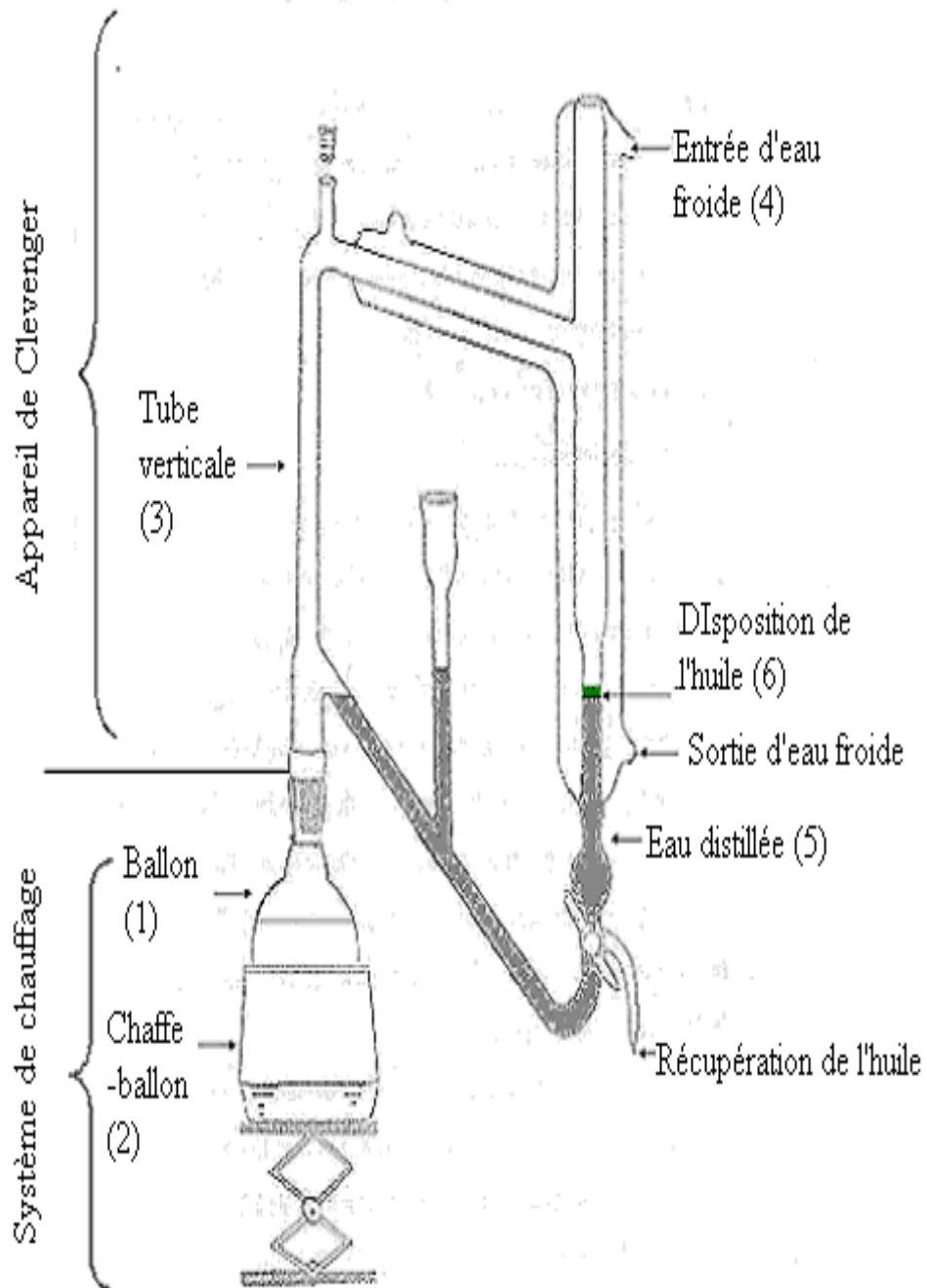


Figure13: Dispositif d'extraction Type Clevenger[1].

### **IV.2.2. Calcul du rendement**

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter [56]. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$R = (P_B / P_A) \times 100$$

**P<sub>B</sub>**: la masse d'H.E obtenue.

**P<sub>A</sub>**: la masse de la matière végétale sèche.

### **IV.2.3. Mesure de la densité**

La densité relative de l'huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à 20°C [41].

### **IV.2.4. L'indice de réfraction**

L'indice de réfraction est mesuré par un réfractomètre

## **IV.3. Les principes actifs**

### **IV.3.1. Protocole d'extraction**

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée selon le protocole préconisé par Lebreto modifié par Boutard. La plante pulvérisée en poudre (450g), subit une macération dans un mélange des solvants. MeOH/H<sub>2</sub>O:70/30 (v/v) pendant 24 h, ce procédé est répété 3 fois. Les divers fractions récupérées sont réunies et évaporées sous pression réduite à une température 40°C.

Une décantation pendant une nuit permet le dépôt des composés comme la chlorophylle, les cires, le sable. La solution obtenue subit une filtration, permette de faciliter la chromatographie [89].

### **IV.3.2. Décantation**

La phase aqueuse obtenue subit une extraction Liquide- Liquide dans une ampoule à décanter, on utilise les solvants suivants: Ether de pétrole, dichlorométhane, n-butanol. Après la séparation des deux phases. On utilise le rotavapeur pour éliminer le solvant utilisé. On obtient 3 extraits: l'extrait de l'éther de pétrole, l'extrait de dichlorométhane et l'extrait de n-butanol.

La figure 14 montre les différentes étapes d'extraction Liquide- Liquide de l'espèce *Zizyphora hispanica*

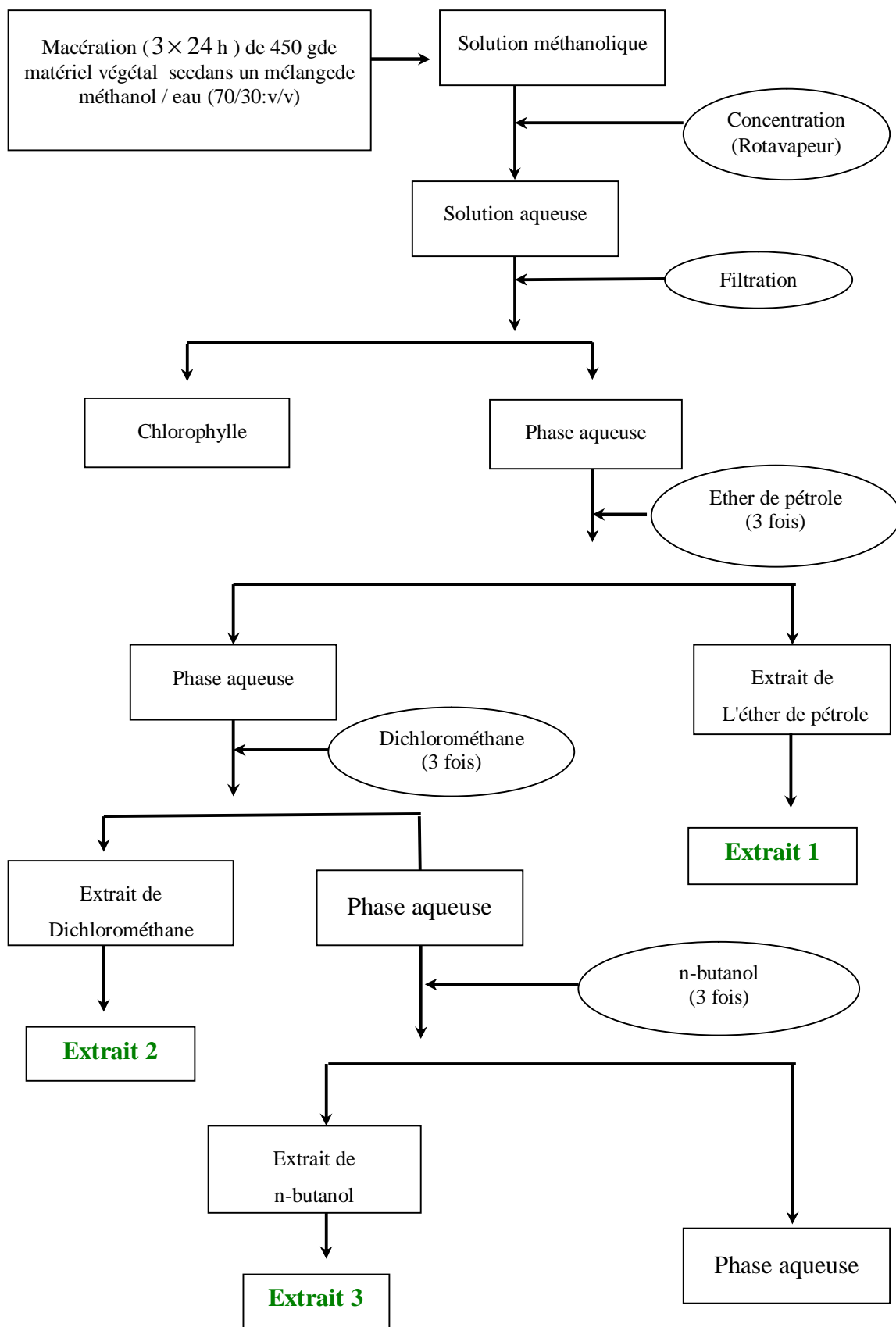


Figure 14 : Protocole d'extraction liquide- liquide.

### IV.3.3. Détermination du rendement

Le Poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein et le poids du ballon vide.

### IV.3.4. Dosage des polyphénols totaux

#### Principe

Les polyphénols ont été déterminés par la méthode de Folin Ciocalteu [110], On a additionné à 200  $\mu$ l de l'extrait 1ml du réactif de Folin Ciocalteu , l'ensemble est incubé à température ambiante pendant 4 minutes ; ensuite on ajoute 800 $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75g/l) et le tous est incubé pendant 2 heures. L'absorbance a été mesuré à 765 nm. La quantification des polyphénols a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire de l'acide gallique. On a ( $y= a x + b$ ) à différentes concentrations (10, 20, 40, 60,80, 100, 120,140  $\mu$ g/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Elle est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par 1 g de matière sèche

#### Protocole

**Tableau 9: Protocole expérimental (test Folin-Ciocalteu)**

	Blanc	Echantillon
Extrait (100 $\mu$ g/ml) ( $\mu$ l)	200	200
H <sub>2</sub> O distillée (ml)	1	
Réactif de Folin 1N (ml)		1
Incuber pendant 4 min		
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ 20% ( $\mu$ l)	800	800
Volume total (ml)	2	2

### IV.3.5. Dosage des flavonoïdes

La méthode à  $\text{AlCl}_3$ [57] a été employée pour la détermination de la teneur totale en flavonoïde des extraits échantillons. Un millilitre (1ml) de la solution de l'extrait a été ajoutée à un volume égal d'une solution de 2%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2 g dans 100ml méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité, et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

Une courbe d'étalonnage ( $y = ax + b$ ) réalisée par le quercitine à différentes concentrations (1, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 40  $\mu\text{g/ml}$ ) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons servira à la quantification des flavonoïdes. Les résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes ont été effectués en triplicatas.

### IV.3.6. Séparation et purification des composants de l'extrait n-butanolique

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'Aluminium, la meilleure séparation obtenue était avec le système de solvant: Méthanol / acétone (1/1; v/v), les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 366 nm et les  $R_f$  des spots ont été enregistrées.

- **Séparation sur colonne :**

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduit à utiliser comme système d'élution (méthanol / acétone) en gradient la polarité.

Une masse d'environ 13 g d'extrait n-butanolique est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans l'acétone. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système (méthanol / acétone), en commençant par l'acétone pur et en terminant par le méthanol pur avec un fractionnement tous les 10 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'acide sulfurique et chauffées pendant 3mn à

100°C. Les fractions qui présentent la même composition ou présentent peu de différence sont réunies.

**Remarque:**

Pour la confirmation de la purification du produit séparé, on a fait une deuxième colonne remplie de gel de sephadex et on a réalisé une chromatographie bidimensionnelle, avec différents systèmes (Méthanol/acétone) (1/1), (Méthanol/dichlorométhane) (1/1).

**IV.3.7. Analyse du produit séparé**

L'identification des composants de la phase n-butanolique a été réalisée par UV, RMN. L'appareillage utilisé pour la détermination structurale des produits séparés

- Les spectres UV-Visible sont réalisés sur un appareil **Spectrophotometer SCHIMADZU** (UV-2401PC, UV-Vis Recording).
- Les spectres RMN<sup>1</sup>H sont réalisés sur des appareils **BRUKER**, de fréquences 300 MHz.

**IV.4. Le screening phytochimique**

Le screening phytochimique ne renseigne pas sur la structure d'une molécule bien déterminée. Il met seulement en évidence la présence de telle ou telle famille chimique pouvant contenir dans un échantillon. Les méthodes ont été décrites suivant les références [90,91].

- **Saponosides**

Dans un tube à essai on dissout quelques mg d'extrait dans de l'eau distillée et on agite vigoureusement pendant au moins 5 mn.

L'apparition d'une colonne de mousse d'environ 1cm et persistant pendant au moins 15 mn indique la présence de saponosides.

- **Coumarine**

**Test de confirmation**

1g de poudre végétal est placé dans un tube, en présence de quelque gouttes d'eau. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NAOH dilué et sont portés à l'ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous UV [90].

- **Tanins**

1,5g de matières végétal sec sont placés dans 10 ml de MeOH 80%. Après 15 minutes d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes, l'ajout de FeCl<sub>3</sub> 1% permet de détecter la présence ou non de tanins. la couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchétiques[90].

- **Flavonoïdes**

**Test de wilstater** : on utilise ce test pour le produit séparé (E<sub>1</sub>).

HCL concentré en présence de trois ou quatre tournures de magnésium et une petite quantité du produit E1 (solubilisée dans 1ml de MeOH). Le changement de coloration est observé : virage au rouge (flavones), virage au rouge pourpre (flavonols), rouge violacée (flavanones et flavanols).

- **Les triterpènes**

**Test de libermann-Burshard:**

Deux millilitres d'infusion sont ajoutés à trois gouttes d'anhydride acétique puis agiter légèrement, ajouter une goutte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré, le changement de coloration est observé pendant une heure: une coloration bleu-vert indique la présence des triterpènes [90].

- **Recherche des anthocyanes**

Deux millilitres d'infusion sont ajoutés à 2ml d'acide chlorhydrique 2N. L'apparition d'une coloration rose qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes [91].

- **Recherche de l'amidon**

On ajoute quelques gouttes de l'iode ( $I_2$ ) à la décoction contenue dans un tube à essai et on observe le changement de la couleur vers le bleu, ce que indique la présence d'amidon [91].

- **Recherche des acides organiques**

**Etude qualitative:** mettre quelques gouttes du bleu de bromothymol dans un tube à essai contenant la décoction, si la couleur change au jaune canari, l'extrait contient des acides organiques [91].

# **Chapitre V**

## **Résultats et discussion**

## V.L'étude de la plante

### V.1. L'étude phytochimique

#### V.1.1.Le taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, l'analyse de notre échantillon a révélé un taux d'humidité important d'environ 48%. Ce la signifie approximativement la moitié du poids de la plante fraîche est constitué par l'eau. Nous constatons suivant la figure 15 que *zizyphora hispanica* est très riche en eau.

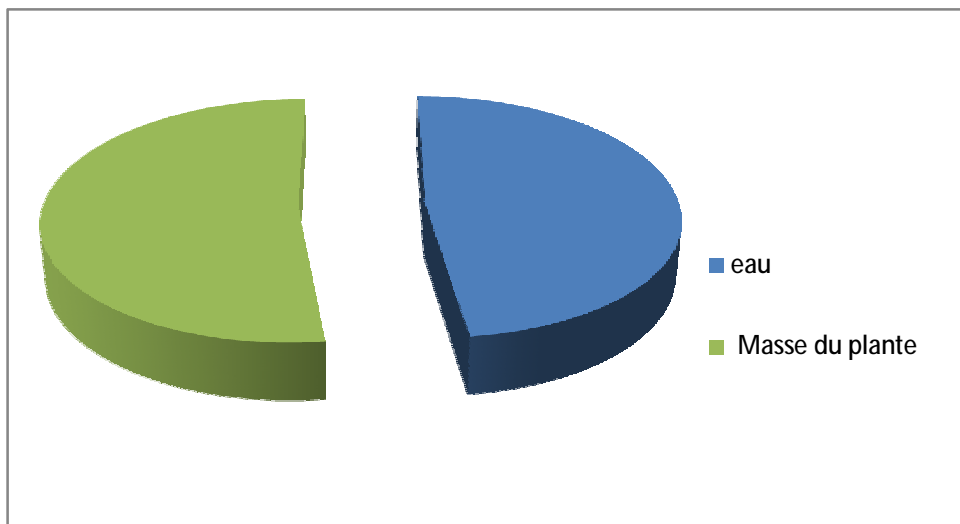
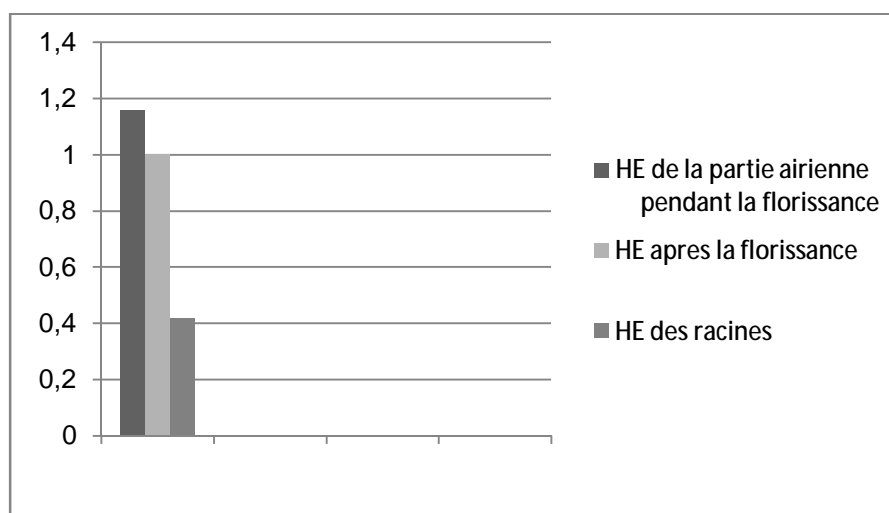


Figure15: Teneur en humidité du *Zizyphora hispanica*

#### V.1.2.Le rendement des huiles essentielles

L'huile de *Zizyphora hispanica* est visqueuse de couleur jaune pâle, d'odeur aromatique. La plupart des plantes contiennent des huiles essentielles, mais le rendement se différent de plante à l'autre, les analyses de nos échantillons ont révélé un rendement important compris entre 1.16% et 0.42%. Cela signifie approximativement que la plante est riche en HE. Nous constatons suivant la figure (16) que les parties aériennes de notre plante pendant la période de floraison est très riche en HE avec un rendement d'environ 1.16%. Les mêmes parties de la plante mais cette fois, c'est après la floraison ont un rendement d'environ 0.9%, alors que le rendement des racines est 0.42%.



**Figure16:Rendement en HE du *Zizyphora hispanica***

Donc ces différences de rendement sont dues à plusieurs facteurs notamment l'espèce végétale elle-même l'organe végétal, la teneur en huiles essentielles dépend aussi du moment de la récolte, les sommités fleuries et les feuilles doivent être récoltées avant la floraison, car selon Salle et Pelletier [38], après la floraison, 70% des huiles essentielles s'évaporent dans l'air. Par contre, la plante entière est généralement récoltée pendant la floraison [58].

### V.1.3. Densité des huiles essentielles

La valeur de la densité des huiles essentielles du *Zizyphora hispanica* à température de 27°C,  $D/27^0 = 0.875$ .

### V.1.4. L'indice de réfraction

L'indice de réfraction est mesuré par un réfractomètre  $I=4.8$

### V.1.5.Détermination des caractères organoleptiques

**Aspect :** liquide visqueux.

**Couleur :** jaune pâle.

**Odeur :** aromatique.



**Figure 17: L'HE de *Zizyphora hispanica***

### V.1.6.Extraction des flavonoïdes

#### V.1.6.1. Rendement en extrait sec

Les extraits méthanoliques récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Le rendement a été déterminé par rapport à 450 g de matériel végétal sec; rendu en poudre; subissant une extraction douce à la température ambiante durant (24×3) heures. La plante a donné une masses en extraits sec méthanoliques inférieurs à 14g /450g de plante en poudre.

#### V.1.7.Les résultats d'extraction des principes actifs

Extrait de l'éther de pétrole: 0.3g.

Extrait de dichlorométhane : 0,36g.

Extrait de n-butanol: 13g.

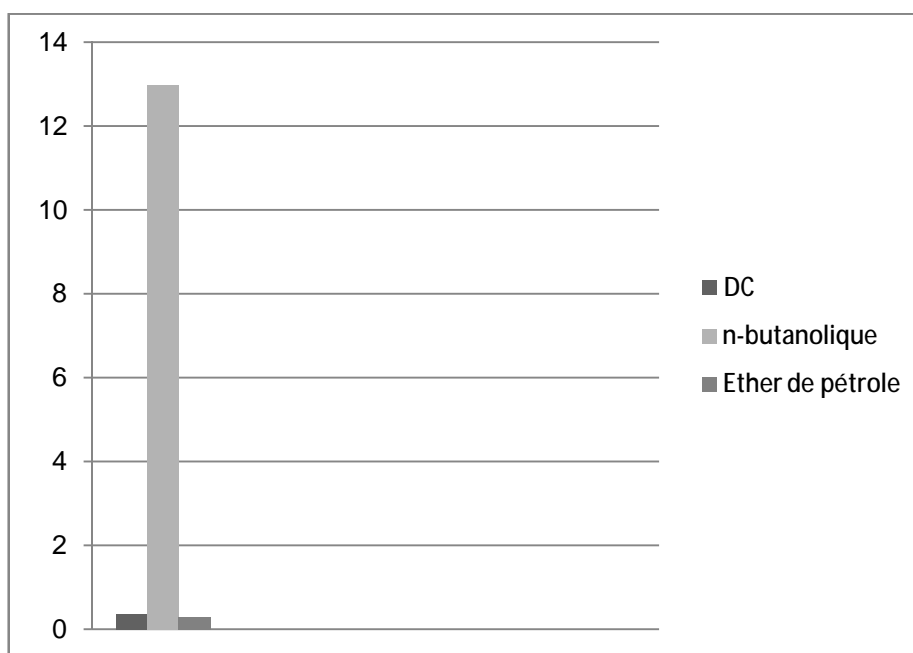


Figure 18:Rendement des extraits du *Zizyphora hispanica*

#### V.1.8. Tests chromatographiques CCM.

Pour les tests chromatographiques CCM, on a trouvé des complexes, nous ne pouvons pas les séparés, sauf pour la fraction: méthanol /acétone (50/50; v/v)

C.-à-d. méthanol /acétone : (1/1; v/v), on a trouvé deux taches

Les résultats de cette analyse sont exprimés dans le tableau suivant:

**Tableau 10:** Les résultats de tests chromatographiques sur plaques CCM.

Extrait	Extrait de <i>n</i> -butanol
Système	Méthanol/ Acétone (1/1)
Nombre de tache	Deux
Rf	Rf <sub>1</sub> = 0,62 Rf <sub>2</sub> = 0,81

### V.1.9. La chromatographiques sur colonne

Dans cette partie expérimentale, nous avons pu isoler deux produits, le premier produit a une grande quantité alors que le deuxième a une faible quantité donc le produit (E1) sera identifié par les méthodes spectroscopiques (UV, RMN <sup>1</sup>H).

#### V.1.9.1. L'interprétation des séries spectrales UV

L'étude de la série spectrale UV (tableau 11, figure20) montre que :

Cette structure flavonique est confirmée par une fluorescence violette sous la lumière de Wood et d'autre part par l'étude de la série spectrale UV dont on peut tirer les indications suivantes :

- Le spectre UV enregistré dans le méthanol du composé E<sub>1</sub> montre deux bandes d'absorption, à 282 nm (bande II) et l'autre à 328 nm (bande I) indiquant la présence d'un squelette flavonique de type flavanone ou flavone.
- L'addition du réactif NaOH provoque un déplacement bathochromique de la bande I, ce qui suppose la présence d'un OH libre en position C-4' [114], l'absence d'une nouvelle bande d'absorption dans l'intervalle [320-335] indique une substitution du carbone C-7.
- Le déplacement bathochromique de la bande II entre le MeOH et NaOAc est faible donc il existe un groupement OR sur le carbone C-7.

- Le déplacement bathochromique de la bande I enregistré après l'addition de  $\text{AlCl}_3$  comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en position C-5.
- Le faible déplacement bathochromique de la bande I en comparant les spectres  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  et  $\text{AlCl}_3$ , laisse prévoir l'absence d'un système ortho di-OH sur le cycle B.

Les données de la série spectrale UV du  $E_1$  sont rassemblés dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaires
MeOH	328	282	/	Flavanone
+ NaOH	<b>395</b>	288	/	OH libre en C-4' Absence d'un OH libre en C-7
+ $\text{AlCl}_3$	<b>385</b>	285	345 et 300	OH libre en C-5
+ $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$	<b>384</b>	284	346 et 300	OH libre en C-5 Absence d'un ortho di-OH sur le cycle B
+ NaOAc	370	<b>284</b>	/	OR libre en C-7
+ NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$	340	284	/	/

### V.1.9.2. L'étude du spectre $\text{RMN}^1\text{H}$

Les analyses du spectre  $\text{RMN}^1\text{H}$  ont été faits dans le laboratoire de **chimie de coordination école de chimie HUBERT CURIEN CRONENBOURG STRASBOURG France.**

L'étude du spectre  $\text{RMN}^1\text{H}$  (figure 21) montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavanone reconnaissable par :

- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}=12.2$  ppm caractéristique d'un groupement hydroxyle en position C-5.

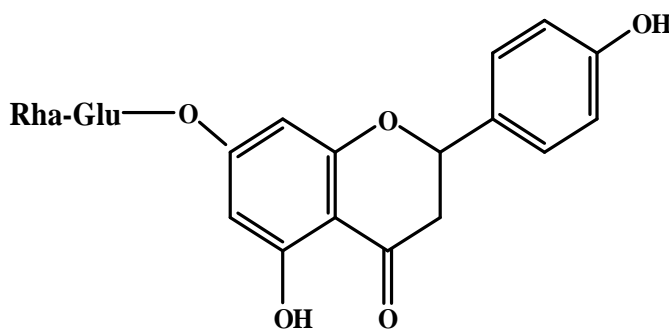
- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 9,77$  ppm caractéristique d'un groupement hydroxyle en position C-4'.
- Un doublet dédoublé d'intégration 2H à  $\delta_{\text{H}} = 7,39$  ppm ( $J = 8.51$  et  $J = 1.8$  Hz) caractérisant les deux protons H-6' et H-2'.
- Un doublet dédoublé d'intégration 2H à  $\delta_{\text{H}} = 6.95$  ppm caractérisant les deux protons H-5' et H-3'.
- Deux doublets superposables, d'intégration 1H chacun, à  $\delta_{\text{H}} = 6,2$  ppm ( $J = 2.1$  Hz) attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement.
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 5.2$  ppm ( $J_{\text{cis}} = 5.3$  et  $J_{\text{trans}} = 12$  Hz) caractérisant H-2.
- Le doublet à 5.09 ppm indique la présence d'un sucre de type glucose lié à l'aglycone par une liaison C-O.
- Le doublet à 4.85 ppm indique la présence d'un sucre de type Rhamnose.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, à  $\delta_{\text{H}} = 3.16$  ppm et  $\delta = 2.7$  ppm attribuables aux protons H-3<sub>trans</sub> et H-3<sub>cis</sub> respectivement.
- Un doublet d'intégration 3H, à  $\delta_{\text{H}} = 1.2$  ppm ( $J = 6$  Hz) caractéristique d'un groupement méthyl "CH<sub>3</sub>" du rhamnose.

L'ensemble des données du spectre RMN<sup>1</sup>H de ce composé est reproduit dans le tableau 12.

**Tableau 12:** Données de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ .

Déplacement chimique ( $\delta$ ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
12.2	1H	<i>S</i>	<b>OH-5</b>
9.77	1H	<i>S</i>	<b>OH-4</b>
7,39	2H	<i>dd</i> (8,51; 2.1)	<b>H-6', H-2'</b>
6.95	2H	<i>dd</i> ( 8.45; 2.3)	<b>H-3', H-5'</b>
6.20	1H	<i>d</i> (2,1)	<b>H-8</b>
6.20	1H	<i>d</i> ( 2.1)	<b>H-6</b>
5.20	1H	<i>dd</i> (5,3 ; 12)	<b>H-2</b>
5.09	1H	<i>d</i>	<b>H-1'' (Glucose)</b>
4.85	1H	<i>d</i>	<b>H-1'' (Rhamnose)</b>
2.70	1H	<i>d</i>	<b>H-3<sub>cis</sub></b>
3.16	1H	<i>d</i>	<b>H-3<sub>trans</sub></b>
1.20	3H	<i>d</i> (6)	<b>CH<sub>3</sub></b>

L'ensemble de ces données spectroscopiques suggère la présence de la structure suivante :

**Figure19:** 4', 5- Dihydroxy 7- O – rhamnoglucosylflavanone( Naringine )

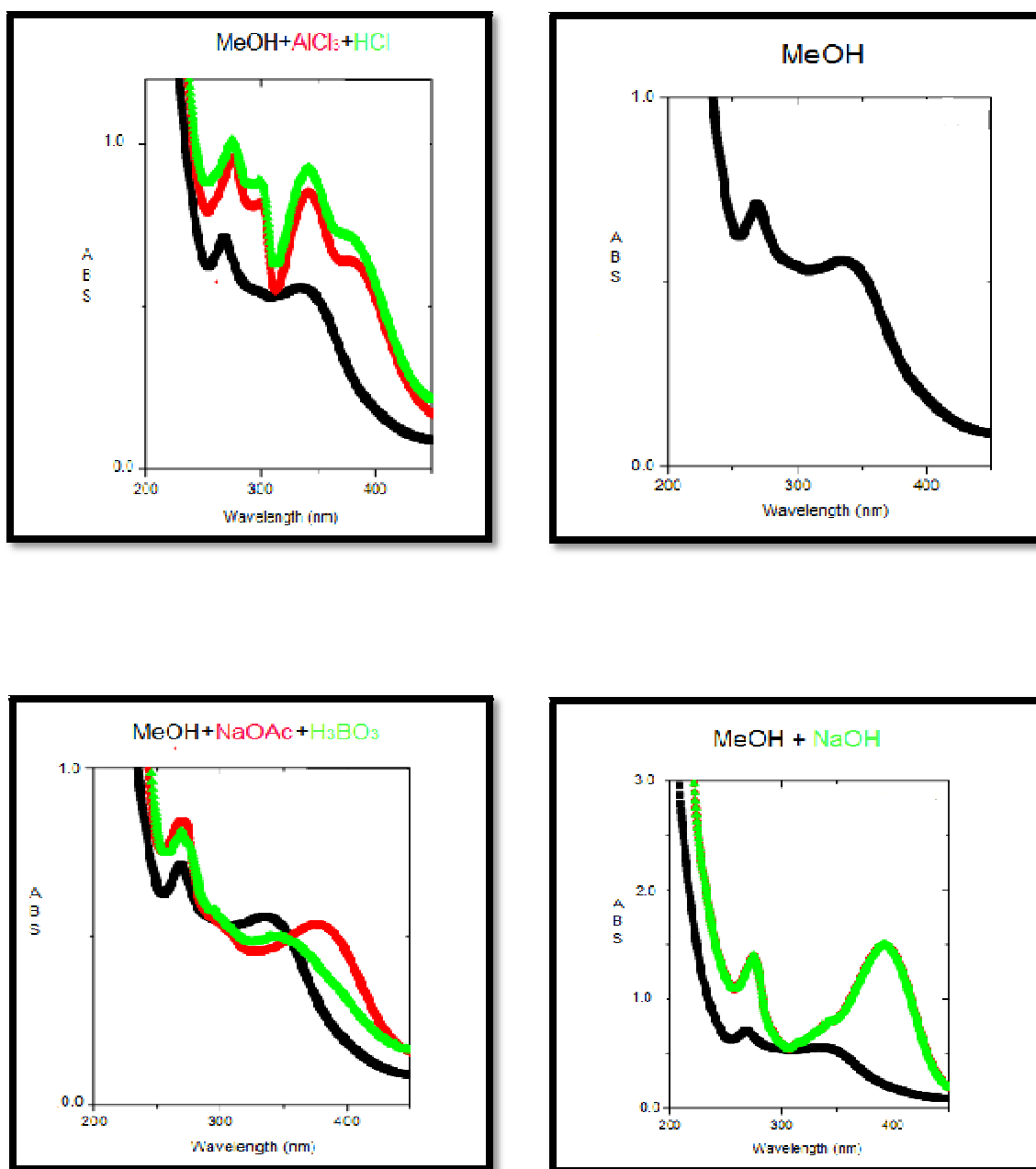
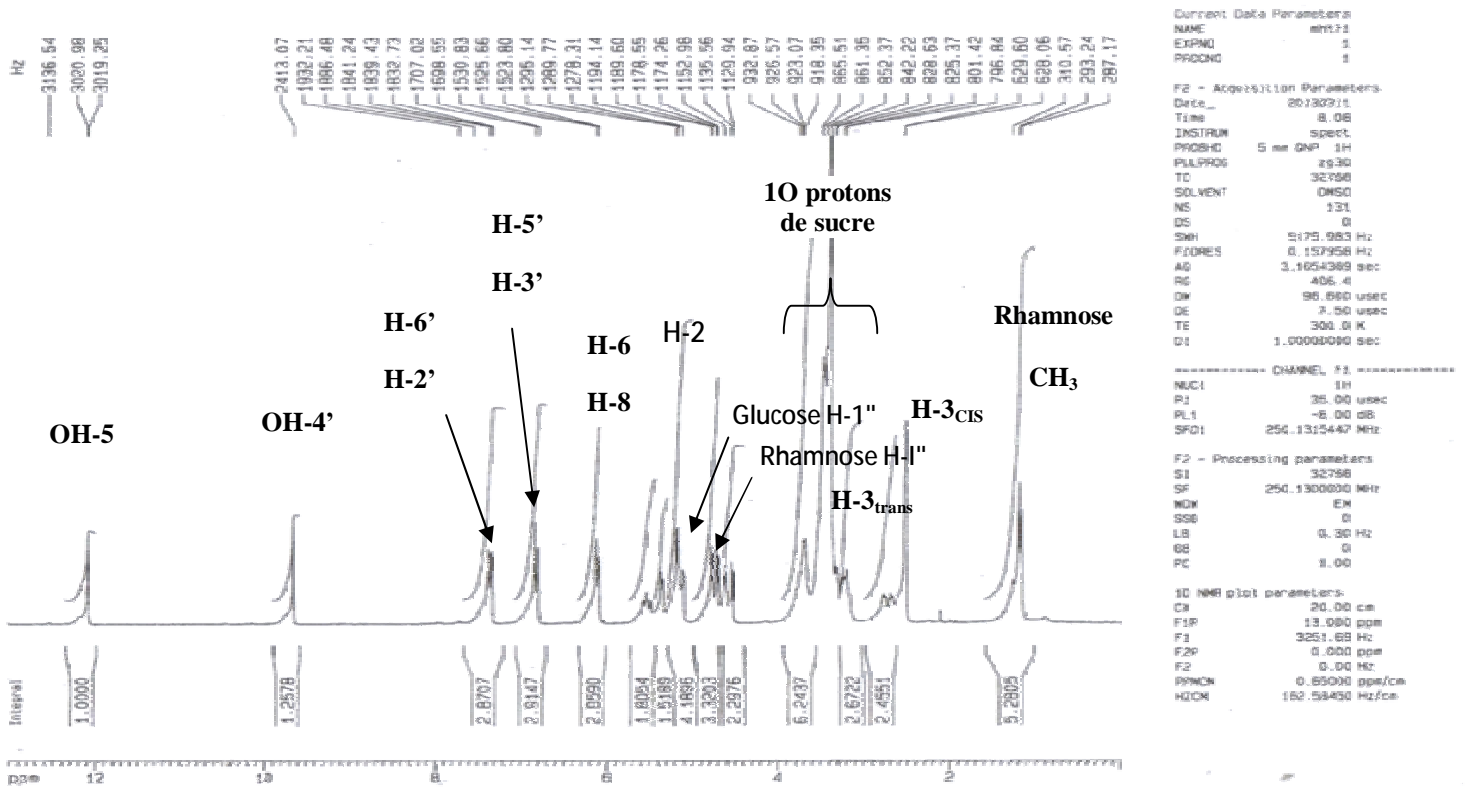


Figure 20: Série spectral UV du composé E<sub>1</sub>

Figure 21 : Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé E<sub>1</sub> entre (1.00-12.00 ppm)



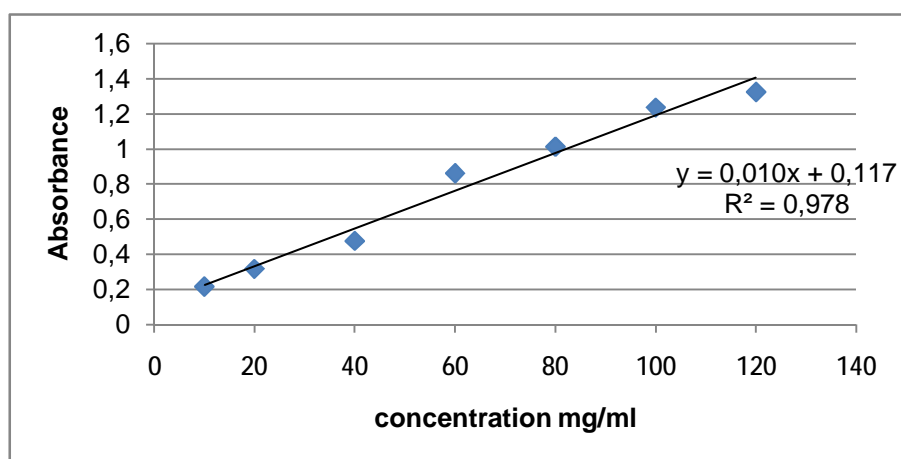
## V.2. Dosage des polyphénols et flavonoïdes

### V.2.1. Dosage des polyphénols

La gamme de concentrations d'acide gallique utilisée pour le dosage des polyphénols et les absorbances respectives mesurées à 765nm sont représentés dans le tableau 13.

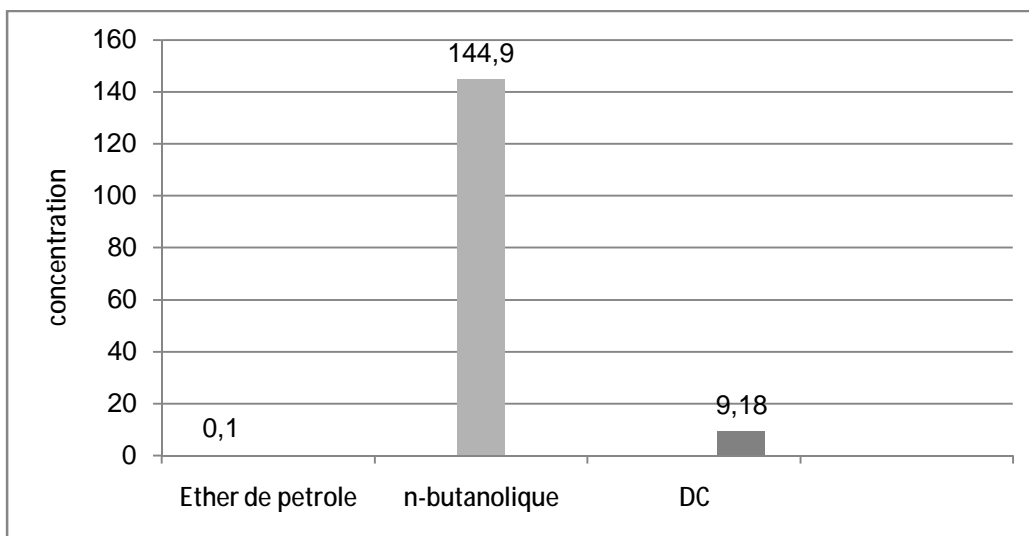
**Tableau 13:** Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique

Acide gallique [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Absorbance
10	0,216
20	0,317
40	0,476
60	0,862
80	1,0143
100	1,2383
120	1,3266
140	1,4146



**Figure22:** Courbe étalon de l'acide gallique

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 9.18, 144.9 mg EAG/g de MS dans les extraits: dichlorométhane , n-butanol respectivement.



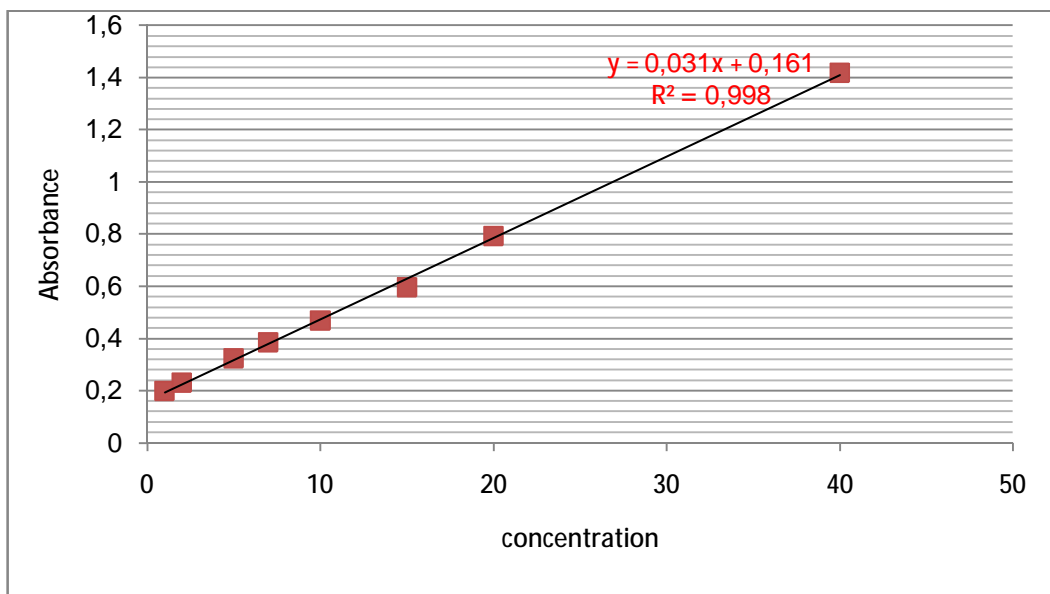
**Figure23:**teneur en polyphenols dans les extraits de *Zizyphora hispanica*

### V.2.2.Dosage des flavonoïdes

La gamme de concentrations de la quercitine utilisée pour le dosage des flavonoïdes et les absorbances respectives mesurées à 430nm sont représentés dans le tableau 14.

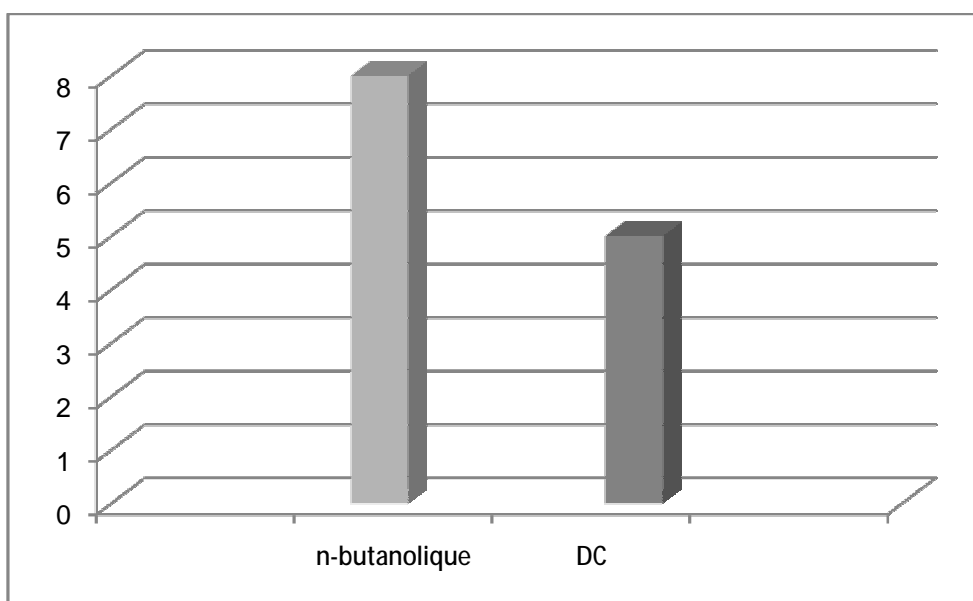
**Tableau 14 :** Absorbances de la gamme de concentration de la quercitine.

La quercitine mg/ml	Absorbance
1	0,198
2	0,229
5	0,324
7	0,386
10	0,468
15	0,596
20	0,792
40	1,418



**Figure 24: Courbe étalon de la Quercitine**

Les flavonoïdes ont été évalués par les chlorures d'aluminium  $AlCl_3$ , la teneur est estimée à 5 et 8 mg EQ/ g de MS dans les extraits: dichlorométhane , n-butanol respectivement. Alors que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait éther de pétrole est non déterminée puisque la quantité de l'extrait est insuffisante.



**Figure 25: Teneur en flavonoïde des extraits de *Zizyphora hispanica***

### V.3. Le screening phytochimique

- **Saponosides:**

L'apparition d'une colonne de mousse d'environ 1cm, donc on a la présence de saponosides.

- **Coumarine:**

Après examen sous UV, on a une fluorescence jaune, donc on a la présence de coumarines.

- **Tanins:**

La couleur vire au bleu noir, donc on a la présence de tanins galliques.

- **Flavonoïdes:**

-  **Test de wilstater**

Le changement de coloration est observé: rouge violacée, donc on a un flavanone.

-  **Test de libermann-Burshard**

Le changement de coloration est observé pendant une heure: une coloration bleu-vert donc on a la présence des triterpènes .

- **Recherche des anthocyanes:**

Aucun changement de couleur, donc on a l'absence des anthocyanes.

- **Recherche de l'amidon :**

On observe le changement de la couleur vers le bleu, donc on a la présence d'amidon.

- **Recherche des acides organiques :**

Le changement de la couleur vers le jaune canarie, donc l'extrait contient des acides organiques.

## V.4. L'activité antimicrobienne et antioxydante

### V.4.1. L'activité antibactérienne

Les diamètres des zones d'inhibition des 2 extraits, de la gentamicine et l'HE sur les souches bactériennes testés sont représentés dans le tableau (15) suivant :

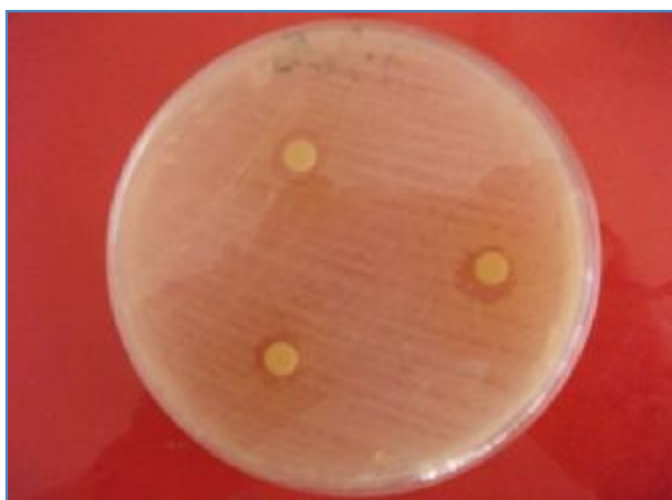
**Tableau15:** Les diamètres des zones d'inhibition des deux extraits et de la gentamicine et l'HE sur les bactéries

Souches bactériennes		Diamètres des zones d'inhibition mm			
		La gentamicine	L'extrait de dichlorométhane	L'extrait n-butanolique	L'huile HE
1	<i>citrobacterfeundu</i> ATCC 8090	13	18	12	26
2	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	18	12	10	24
3	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	30	20	6	44
4	<i>Salmonellatyphimurium</i> ATCC 13311	15	8	12	18
5	<i>Klebsilla pneumoniae</i> ATCC 70060	/	12	8	8
6	<i>Acinetobacter banmanu</i> ATCC 1966	11	24	8	34
7	<i>Proteus miralibis</i> ATCC 35659	/	8	10	18
8	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	11	10	10	10
9	<i>E.coli</i>	21	12	10	26
10	<i>S. aureus</i>	/	8	8	30

Les figures suivantes montrent les zones d'inhibition des extraits et l'HE.



**Figure 26:** L'activité antibactérienne de HE des racines de *Zizyphora hispanica* sur *E.coli*



**Figure 27:** L'activité antibactérienne de HE de *Zizyphora hispanica* sur *Listeria monocytogenes*

Nous avons étudié l'activité antibactérienne des extraits "n-butanolique, dichlorométhane" et l'huile essentielle du *Zizyphora* L. vis-à-vis plusieurs souches de références.

Les tests que nous avons effectués montrent que l'extrait n-butanolique a une activité surtout vis-à-vis de "*Citrobacter freundii* ATCC 8090 et *Salmonelle*

*typhimurium* ATCC 13311 avec une zone d'inhibition de 12 mm pour chaque souche bactérienne. Le même extrait a une faible activité avec *Acinetobacter banmanu* ATCC 19606 avec une zone d'inhibition de 8 mm.

L'extrait dichlorométhane a manifeste aussi une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des souches de *Acinetobacter bonmanu* ATTC 19606 et *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 avec une zone d'inhibition de 23 et 20 mm respectivement.

Le même extrait a une faible activité vis-à-vis "*Proteus miralibis* ATCC 35659, avec une zone de 7 cm. Alors que l'huile essentielle présente une très bonne activité antibactérienne vis-à-vis les souches de références *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Acinetobacter banmanu* ATCC 19606 avec une zone d'inhibition de 44cm et 33 cm respectivement.

Le même huile présent une faible activité avec *klebsilla pnenmoniae* ATCC 70603 avec une zone d'inhibition de 9mm.

#### **V.4.2. L'activité antifongique**

Outre leur potentiel antibactérien, les huiles essentielles constituent un remarquable moyen pour lutter contre la prolifération de champignons et de levures. L'aromathérapie compte dans sa troupe de guerriers des phénols, certains monoterpénols et des aldéhydes, dont il a été démontré qu'ils sont de puissants fongicides pouvant lutter de façon très efficace contre *Candida albicans* [1].

Nous avons étudié l'activité antifongique des extraits "n-butanolique, dichlorométhane" et l'huile essentielle de *Zizyphora* L. vis-à-vis plusieurs champignons. Les teste que nous avons effectués montrent que l'extrait n-butanolique a une activité surtout vis-à-vis *Aspergillus niger* et *Aspergilus flavus* avec une zone d'inhibition de 12mm pour chaque champignon.

L'extrait dichlorométhane a aussi manifesté une bonne activité antifongique vis-à-vis *Candida albicans* et *Aspergillus niger* avec une zone d'inhibition de 20 et 18mm pour chaque champignon respectivement. Alors que l'huile essentielle présente une très bonne activité antifongique vis-à-vis *Candida albicans* avec une zone d'inhibition de 44cm.

**Tableau16:** Les diamètres des zones d'inhibition des extraits et l'HE sur les champignons

Les champignons		Diamètre en mm		
		L'extrait de dichlorométhane	L'extrait n-butanolique (E2)	HE
1	<i>Aspergillus niger</i>	18	12	26
2	<i>Aspergillus flavus</i>	12	12	24
3	<i>Candida albicans</i>	20	8	44

La figure suivante montre les zones d'inhibition de l'extrait dichlorométhane.



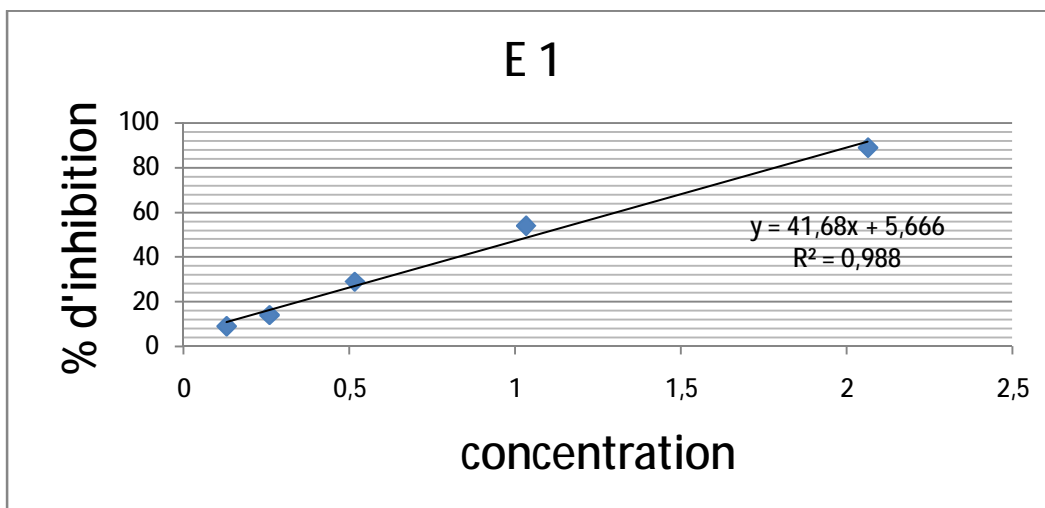
**Figure 28:** Effet antifongique de l'extrait dichlorométhane sur *Aspergillus flavus*

#### V.4.3. L'activité antioxydante

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour nos extraits, nous avons employé la méthode au DPPH, ce radical libre présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite conféré à la solution une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire.

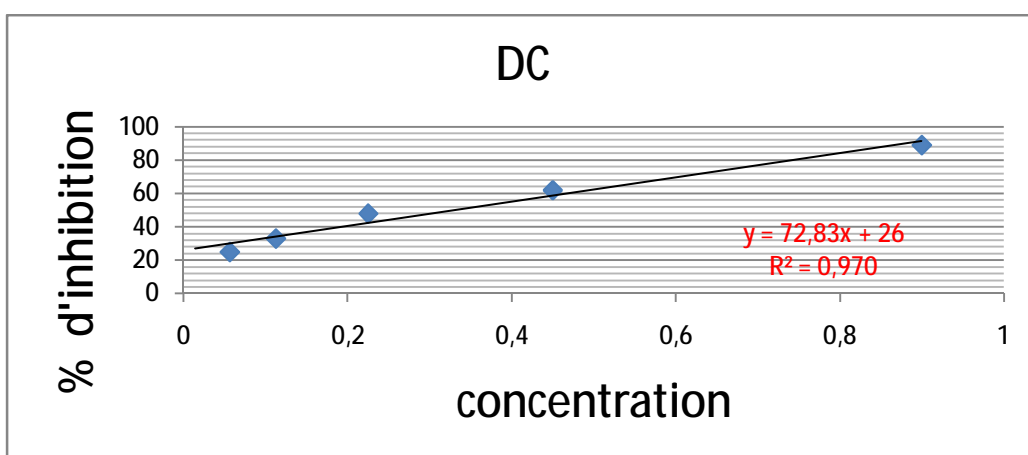
### V.4.3.1. Les flavonoïdes

Tous les extraits ont présenté un très bon pouvoir antioxydant, ce qui est confirmé par les bibliographies que les flavonoïdes d'origine naturel sont des capteurs puissants de radicaux [82, 85 - 87].



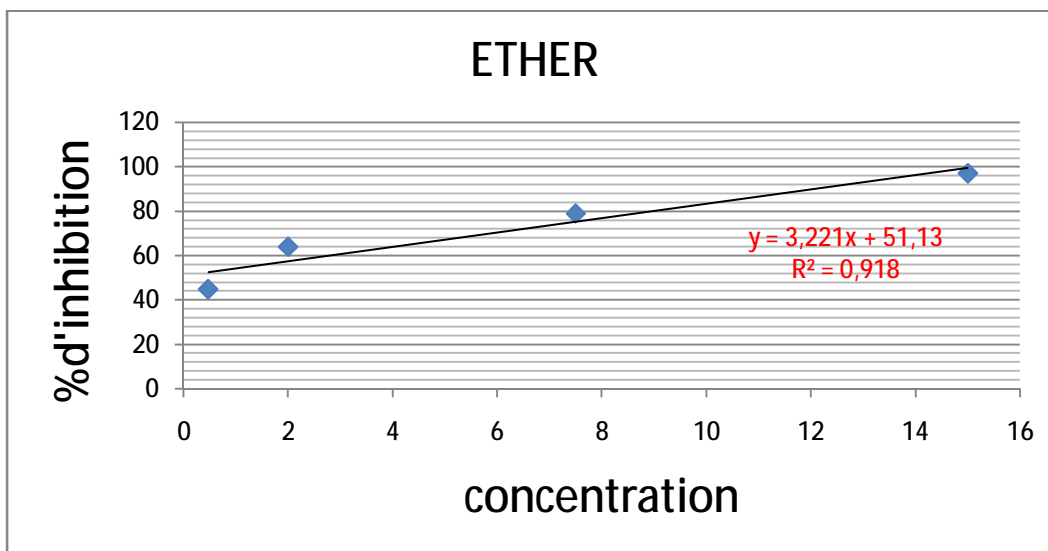
$$IC_{50} = 1,06353125 \text{ mg/ml}$$

**Figure 29:** Résultat du test antioxydant de l'extrait n-butanolique



$$IC_{50} = 0,32952548 \text{ mg/ml}$$

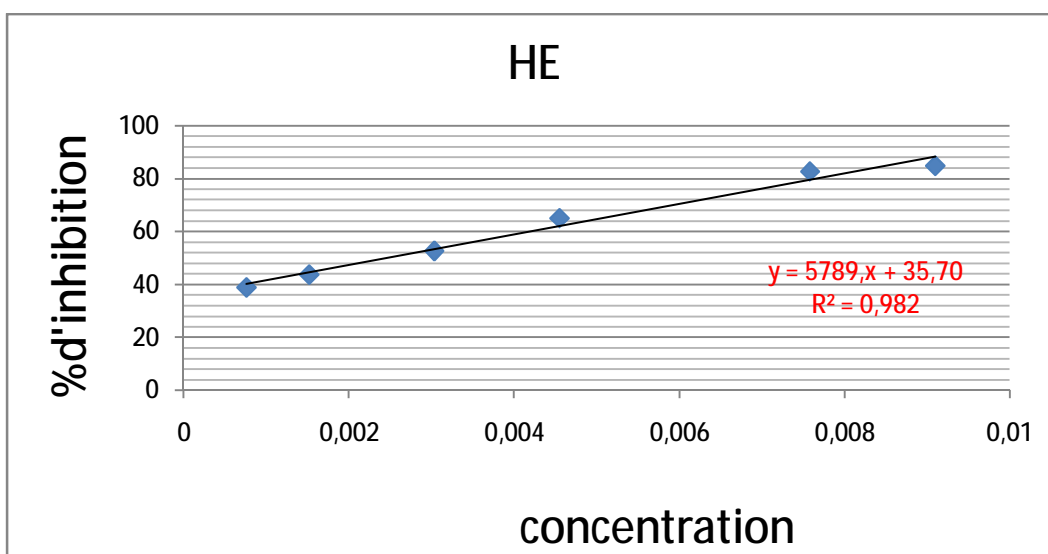
**Figure 30:** Résultat du test antioxydant de l'extrait dichlorométhane



$$\text{IC50} = 0,91472849 \text{ mg/ml}$$

**Figure 31:** Résultat du test antioxydant de l'extrait éther de pétrole

#### V.4.3.2. Les huiles essentielles

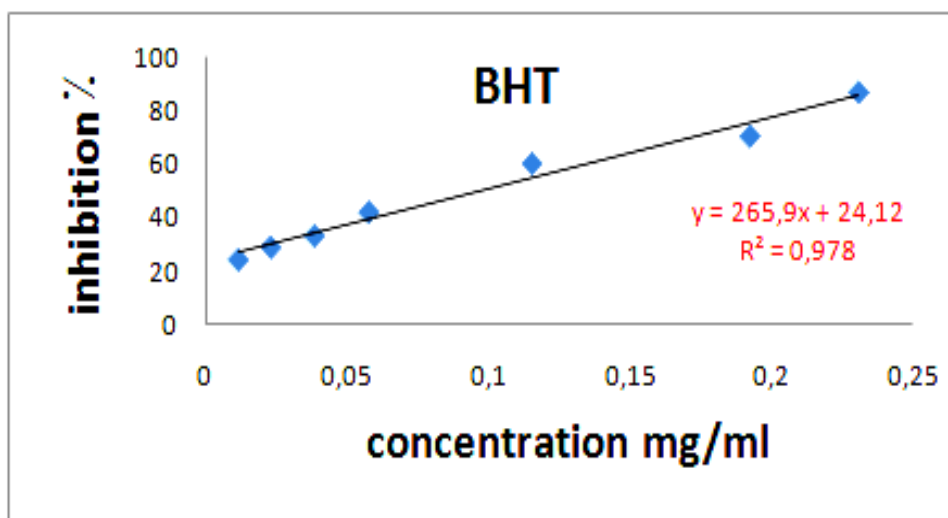


$$\text{IC50} = 0,00236834 \text{ mg/ml}$$

**Figure32:** Résultat du test antioxydant de l'HE

Le huile essentielle-elle aussi présente une capacité de réduction du radical libre.

- Le standard BHT



IC50 0,00594815

**Figure 33:** Résultat du test antioxydant de la standard BHT

On compare IC 50 des différents extraits et l'HE avec le standard BHT. Les IC50 dans l'ordre du pouvoir antioxydant était : l'extrait n-butanolique (1,06 mg/ml) > l'extrait éther de pétrole (0,91 mg/ml) > l'extrait dichlorométhane (0,33mg/ml) > BHT (0,0059 mg/ml) > HE (0,002 mg/ml).

Suivant les résultats qu'on a obtenu, nous pouvons prédire que les huiles essentielles sont plutôt des antimicrobiennes alors que les flavonoïdes sont des agents antioxydants de première classe.

### V. 5. Composition de l'huile essentielle de *Zizyphora hispanica* L.

L'huile essentielle (HE) de *Zizyphora hispanica* a été extraite par la dispositif d'extraction, type Clevenger. On a un rendement important 1.16%, L'analyse de HE a été réalisé par chromatographie phase gazeuse couplée avec spectroscopie de masse (CPG/MS) où nous avons trouvé 53 composé donc le composé majoritaire est le pulégone .

L'huile contient une proportion élevée de **monoterpènes** (91,41%) dans lesquels **pulégone (86,8%)**, le **limonène (2,3%)**, **isopulégone (1,5%)**, le **p-Menth-3-en-8-ol (1,4%)** et **peperitenone (1,4%)** sont les principaux constituants. Contrairement aux résultats obtenus par Negueruela et Rico (1986) sur l'huile essentielle de *Zizyphora hispanica*, qui ont confirmé que **pulégone** et **piperitenone** sont les principaux monoterpènes. Des quantités moindres de **limonène**, le **1,8-cinéole**, **isopulégol**, **trans-isopiperitenol** et le **thymol** sont présents. **δ-cadinène** est le principal sesquiterpène avec de l'oxyde de **caryophyllène** et **cis-nérolidol**.

**Tableau 17:**Composition de l'huile essentielle de *Zizyphora hispanica*.L

Constituants	IR	%	Constituants	IR	%
(E)-2-hexenal	856	Weak	<i>Trans</i> -verbenol	1144	Tr
$\alpha$ -thujene	931	Tr	<i>Cis</i> -verbenol	1146	Tr
$\alpha$ -pinene	939	0.7	<i>p</i> -menth-3-en-8-ol	1150	1.4
Benzaldehyde	962	Tr	Menthone	1154	Tr
Sabinene	977	0.2	Isopulegol	1160	Tr
$\beta$ -pinene	980	0.8	Isomenthone	1164	0.7
Myrcene	992	0.3	Isopulegone	1175	1.5
3-octanol	995	Tr	$\alpha$ -terpineol	1190	0.5
<i>p</i> -mentha-1(7),8-diene	1004	Tr	Myrtenol	1194	Tr
( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal	1015	Tr	Verbenone	1206	0.2
$\alpha$ -terpinene	1018	Tr	<b>Pulegone</b>	<b>1237</b>	<b>86.8</b>
<i>p</i> -cymene	1026	Tr	Geraniol	1257	0.1
Limonene	1031	2.3	Anethole	1283	Tr
1,8-cineole	1041	0.1	piperitenone	1343	1.4
( <i>Z</i> )-beta-ocimene	1041	Tr	Piperitenone oxide	1363	Tr
Phenyl acetaldehyde	1045	Tr	$\alpha$ -copaene	1376	Tr
( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimene	1051	Tr	$\beta$ -bourbonene	1384	Tr
Gamma ( $\gamma$ )-terpinene	1062	Tr	$\beta$ -cubebene	1390	Tr
<i>p</i> -mentha-3,8-diene	1073	0.2	$\beta$ -caryophyllene	1418	Tr
Terpinolene	1089	Tr	Germacrene D	1480	Tr
6,7-epoxy-myrcene	1095	Tr	( <i>E</i> )- $\beta$ -ionone	1485	Tr
Linalool	1099	0.2	g-cadinene	1524	Tr
Nonanal	1103	Tr	Caryophyllene oxide	1581	0.2
<i>Trans-p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol	1123	Tr	Humulene epoxide II	1606	Tr
$\alpha$ -campholenal	1127	Tr	Caryophylla-4(14),8(15)-diene-5-a-ol	1636	Tr
<i>Cis-p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol	1139	Tr	T-cadinol	1641	Tr
<b>Total identified</b>	<b>97.6%</b>				

**IR** : Indice de rétention.

**Tr**: trace.

# **CONCLUSION GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

Nous avons réalisé une étude phytochimique et biologique sur l'une des plantes de la flore d'Algérie, il s'agit de la *Zizyphora hispanica* L. C'est une plante herbacée, très rare qui pousse dans l'Atlas saharienne (exp. Djebel Messad) elle est très odorante et très riche en l'huile essentielle.

Pour l'étude phytochimique, on a réalisé une extraction (liquide-liquide) des principes actifs de la plante par des solvants à différentes polarités (Ether de pétrole, dichlorométhane, n-butanol) et après la séparation avec la chromatographie sur colonne de la phase n-butanolique, on obtient un flavanone.

L'huile présente des activités antimicrobiennes et antifongique sur *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* alors que *Klebsilla pneumoniae* est résistant. Les extraits du *Zizyphora hispanica* sont actifs sur quelques bactéries et sur les moisissures alors que *S. aureus* est résistant.

Le dosage des composés phénoliques contenus dans les trois extraits méthanoliques a révélé des teneurs considérables en polyphénols avec des quantités appréciables en flavonoïdes.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes à piéger les radicaux libres. Suivant les résultats qu'on a obtenu expérimentalement, nous pouvons prédire que les huiles essentielles sont plutôt des antimicrobiennes alors que les flavonoïdes sont des agents antioxydants de première classe.

Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus in-vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

## Résumé

*Zizyphora hispanica* est une plante médicinale annuelle elle est rare, caractérisée par une odeur très forte et agréable. Pour l'étude phytochimique, on a réalisé une extraction (Liquide- Liquide) des principes actifs de la plante par des solvants à différentes polarités (Ether de pétrole, dichlorométhane, n-butanol), et après la séparation de la phase n-butanolique avec la chromatographie sur colonne, on obtient un flavanone.

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 9.18, 144.9 mg EAG/g de la matière sèche (MS), dans les extraits : dichlorométhane , n-butanol respectivement.

Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode de chlorures d'aluminium  $AlCl_3$ , la teneur est estimée à 5 et 8 mg EQ/ g de matière sèche dans les extraits : dichlorométhane , n-butanol respectivement.

Des activités antimicrobiennes variables avec les extraits et l'huile essentielle se sont réalisés sur 10 souches de bactéries; deux espèces de moisissures et une souche de levure. L'huile présente des activités antimicrobiennes et antifongiques sur la pluparts des souches alors que les extraits du *Zizyphora hispanica* sont actifs sur quelques souches. Les extraits méthanoliques ont présenté de fortes propriétés de piéger les molécules du radical libre DPPH.

**Mots clés :** plantes médicinales, *Zizyphora hispanica*, huile essentielle, flavonoïdes, Polyphénols, activité antibactérienne, activité antioxydante,

## المخلص

من بين النباتات الطبية الموسمية النادرة التي تتميز برائحة قوية نبتة *Zizyphora hispanica* ، لقد قمنا بإجراء دراسة فيتو كيميائية لهذه النبتة، حيث قمنا باستخلاص اغلب موادها الفعالة بواسطة مذيبات مختلفة القطبية (الايثر البترولي، ثنائي كلور الميثان، البتانول. ولقد قمنا بعملية الفصل لمستخلص البتانول وذلك بواسطة كروماتوغرافيا العمود فتحصلنا على فلافانولون وقد تم تحديد نسبة متعدد الفينولات في كل من مستخلص ثنائي كلور الميثان و مستخلص البتانول وهي على التوالي 9.18 مغ، 144.9 مغ مكافئ حمض الغاليك لكل غ من النبتة وهي جافة. وقد تم كذلك تحديد نسبة الفلافونويدات في كل من مستخلص ثنائي كلور الميثان و مستخلص البتانول فكانت على التوالي 5 , 8 مغ مكافئ الكارستين لكل غ من النبتة وهي جافة. بالإضافة إلى المستخلصات الثلاث قمنا باستخلاص الزيوت الأساسية بواسطة جهاز كلافنجر، ثم قمنا بدراسة النشاطية المضادة للميكروبات و النشاطية المضادة للأكسدة لجميع المستخلصات ومقارنتها فيما بينها ومن ثمة مقارنتها بنشاطية الزيوت الأساسية.

**الكلمات المفتاحية :** النباتات الطبية ، الزيوت الأساسية ، متعدد الفينولات ، الفلافونويدات ، النشاطية المضادة للميكروبات، النشاطية المضادة للأكسدة.

## Abstract

*Zizyphora hispanica* is a rare annual and medicinal plant, characterized by a very strong and pleasant odor. phytochemical study was carried by extraction (liquid-liquid) of bioactives compounds of *Zizyphora hispanica* with solvents of increasing polarity (petroleum ether, dichloromethane and *n*-butanol). After the separation of the *n*-butanol extract with column chromatography, we identify a flavanone.

The polyphenol content was determined by the reactive of Folin-Ciocalteu , it is 9.18 to 144.9 mg EAG/g of dry matter (DM), in the extracts dichloromethane and *n*-butanol respectively.

The flavonoids were evaluated by the method of aluminum chloride  $AlCl_3$ , the content is estimated at 5 and 8 mg EQ/g of the dry matter in the extracts: dichloromethane and *n*-butanol respectively.

Antimicrobial activities performed on the extracts and essential oils of *Zizyphora hispanica* plant against ten strains of bacteria, including two species of mold and yeast strain. The essential oil has shown antimicrobial and antifungal activity on most of the other strains; the extracts from *Zizyphora hispanica* are active in some strains. The anti-oxidant activity was estimated on the methanolic extract by the DPPH test.

**Keywords:** medicinal plants, *Zizyphora hispanica*, essential oil, flavonoids, polyphenols, antibacterial, antioxidant activity,

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Laouer H. (2004). Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif. Bejaia. Djelfa. Thèse de doctorat en écologie végétale. Uni. Sétif.
- [2] Valnet J.(1984). Phytothérapie. Traitement des maladies par les plantes .5ème éd. Maloine.258-601.
- [3]Anonyme (1974).Précis de la phytothérapie. La santé par les plantes.éd. Alepen.
- [4]Fouché J. G.Marquet A. et Hambuckers A.(2000). Les Plantes Médicinales. de la plante au médicament. Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman.
- [5] Yves M .(2003). Petit Larousse de la médecine. 1<sup>ère</sup> éd. Edith Ybert.705.
- [6]Bruneton J.(1993). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales.1ere éd. éd. Lavoisier. Paris.
- [7] Guignard J. L. (1998). Abrèges de Botanique. éd. Masson. 278.
- [8] Quezel P. et Santa (1962-1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. éd. CNRS.Paris. 1170.
- [9] Rebbas Kh.(2006).Cours et travaux dirigés du module de Taxonomie végétale (2<sup>ème</sup> année Biologie). Dép. Biologie. Univ. M'sila.
- [10] Iserin P.(2001).Encyclopédie des plantes médicinales. Identification préparation et soins. éd. Larousse
- [11]Bruneton J. (1999).Pharmacognosie. phytochimie. Plantes médicinales.3eme édition .édition Lavoisier. paris.
- [12]Gabar M. (1988). Plants flavonoids in biology and medicine II. biochemical . cellular and medicinal properties. éd.V. cody. New York.
- [13]Hurabielle M.(1981).Abrégé de matière médicale. pharmacognosie. tome I.éd. Masson .182-189.
- [14] Markham K.R. (1982) . Technique of flavonoid identification. Academic press. London

- [15] Meltzer H.M. et Maltrud. (1997). Candetary falconoid influence the development of coronary heart disease. scand. J. Nuth.
- [16] Cos P. Yicine L. Calomme M. (1998). Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitions of xanthine oxidase and super oxide scavengers. J. Nat Prod.
- [17] Ikan R. (1991). Natural products. Department of organic chemistry. Hebrew University. Jerusalem. 2<sup>ième</sup> edition. 3. Academic Press.
- [18] Harborne J.B. and Williams C.A.. (1988). In the flavonoids advances in research since 1986. ed. J.B. Harborne. Chapman and Hall. Ltd. 303.
- [19] Heller W. and Forkmann G. (1988). In the flavonoids advances in research since 1980. ed. J.B. Harborne. Chapman and Hall. London. 399-425.
- [20] Deluca V. and Ibrahim R. K. (1985). Arch. Biochem. Biophys. 606.
- [21] Inuma M. and Mizuno M. (1989). Phytochemistry. 28- 681.
- [22] Kochs G. and Grisebach H.. (1986). Eur. J. Biochem. 155- 311.
- [23] Ebel J. and Hahlbrock K.. (1982). In the flavonoids advances in research. ed. J. B. Harborne and T. J. Mabry. Chapman and Hall. London. 641.659.
- [24] Khouri H.E.. Tahara S. and Ibrahim R.K. (1988). J. Chromatography. 291.
- [25] Heller W. and Forkmann G. (1993). In the flavonoids advances in research since 1986. ed. J.B. Harborne. Chapman and Hall. London. 499.535.
- [26] Chopin J. (1966). Actualité de phytochimie fondamentale. II<sup>ème</sup> série. édition Masson. Paris. 119.
- [27] Adlerl S. et Wink. (2001). Transfer of quinolizine alkaloids in analysis of floral and vegetative tissues.
- [28] Laouer H. (1995). Contribution à l'étude des plantes médicinales du massif de boutal. Mém. magister en biologie végétal. Uni. Sétif. 125-136.
- [29] Lelier A. et Renoll. (1948). Précis de la pharmacie clinique. éd. Maloine. 722.
- [30] Mirijalily. (April-May ). (1998). The management and exploiting of medicinal plants. Jihad magazine.

- [31] Fabre R. et Truhaut R. (1965). Précis de toxicologie. Tom II. éd. Sedes. paris.279-445.
- [32] Bruneton J.(1987). Eléments de phytochimie et pharmacognosie. Technique et documentation. éd. Lavoisier. Paris.
- [33] Moreau F. (1964). Alcaloïdes et plantes alcaloidères. Séries "que sais-je?".point de connaissances actuelles. press universitaires de France .éd n° 276000.
- [34] Janicsak G. Mathe I. Miklossy-Vary V. et Blunden G..(1999). Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of lamiaceae species. Biochemical Systematics and Ecology. 733-738.
- [35] Belaiche P.(1979). Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome I. l'aromatogramme . Maloine .
- [36] Svoboda K. P. and Hampson J. B.(1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants. antibacterial. antioxidant. anti-inflammatory and other related pharmacological activities.
- [37] Duraffourd C. D'hervicourt L. et Lapraz J.(1990). Cahier de phytothérapie clinique. examens de laboratoire galénique. éléments thérapeutiques synergiques .2<sup>ème</sup> éd. éd. Masson.23-37.
- [38] Salle J.L. et Pelletier J. (1991).Les huiles essentielles. synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche.19-45.
- [39] Volak J. et Stodola J.(1997). Plantes médicinales. 10<sup>ème</sup> édition. édition Librairie Grund. Paris.31.32.
- [40] Ausloos P.(2002). L'huile essentielle. un triangle corps –esprit- émotion. Revue électronique aromatiques.
- [41] AFNOR.(1992).Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles. Paris.
- [42] Smallfield B.(2001).Introduction to growing herbs for essential oils. medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research.Number 45 .4.
- [43] Caillard J.(2003).Les plantes. Des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires. CRDP Midi-Pyrénées. 6.

- [44] Jukić M. et Miloš M.(2005).Catalytic Oxidation and antioxidant Properties of Thyme essential Oils (*Thymus vulgarae* L.).*Croatica Chemica Acta*. 105-110.
- [45] Mamouni H.(1994). Application des différents procédés d'extraction aux grains de craindre. *Mém. Génie chimique. Uni. Alger*. 19-11.
- [46] Ribereau-Gayou J.B.(1968).The phenolic compound of vegetals. Edition Dundo. Paris.
- [47] Scwedt G.(1993). *Méthodes d'analyse*. éd. Flammarion.
- [48] Caude M. et JardyA. (1996). *Méthodes chromatographiques. Dossier.Base documentaire. Techniques d'analyse*.1445.
- [49] Audigie Cl., Dupont G.,Zonszain F.( 1995). *Principes des méthodes d'analyse biochimique. Tome I. Doin éditeur. Paris*.
- [50] De Maack F. et Sablier M.. (1994).Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. *Bases documentaries. Techniques d'analyse*.2614.
- [51] Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F, (1997).Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. 13-16.
- [52] Bencheikh H. (2005). Contribution à l'étude de la composition. de l'activité antimicrobienne et de la cytotoxicité des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Foeniculum vulgare*. Mémoire de Magistère. Département de biologie. Faculté des sciences. UFA de Sétif.
- [53] Mabry T.J. Markham K.R. and Thomas M.B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York. Heidelberg. p. 254.
- [54] Markham. K.R. and Geiger. H. (1993).The Flavonoids Advances in research since 1986.Edited by J. B. HARBORNE. Chapman & Hall. London.
- [55] Markham. K.R(1976).<sup>13</sup>C NMR of flavonoides-II. Flavonoids other then flavone and flavonol aglycones.2607.2612.

- [56]Caree P. (1953). Précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Ed. Ballière JB. et fils.
- [57] Bahorun T. Gressier B.,Trotin F., Brunete C., Dine T.,Vasseur J.,Gazin J.C.,inkas M., uycky M. and Gazin M.(1996).Oxigen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation.Arzneimittel-forschung. 46.1086-1094.
- [58]Flück H. (1942). Nos plantes médicinales. Traduit par Weitzel R.. librairie Payot. Lausanne. 8-14.
- [59]Avril J.L., Dabernat H.,Denis F., Moteil H. (1992). Bactériologie clinique.1<sup>ere</sup> éd.Marketing. paris.
- [60]Bousseboua H. (2005). Eléments de microbiologie .2<sup>ème</sup> édition. édition campus – club.169-213.
- [61] Breche P.,Gaillard J., Simonet M. (1989).Bactériologie. Les bactéries des infections humaines. 1ere éd. éd. Flammarion. paris.
- [62] Yala D., Merad A.S.,Mohamedi D., Ouar Korich M.N.(2001).Classification et Mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb.
- [63] Rahal K. (2005). Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS. 4ème édition. éd Ministère de la Santé. de la Population et de la Réforme Hospitalière.
- [64 ]André R. (1998). La maladie de parkinson. Ed. Masson.16-19.
- [65] Beckman K. B. and Ames B. N.(1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* (78).574-581.
- [66] Sies H.(1993). Strategies of antioxidant defense. *Europe Journal. Biochemistry.* 213-219
- [67] Pincemail J. et Defraigne J.O.(2004). Les antioxydants. un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Symposium « antioxydant et alimentation ». institut Danone.

- [68]Halliwell B. Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture. How should you do it and what do the results mean?. *J Pharmacol.* 231-255.
- [69]Huang D.J. Lin C.D. Chen H.J. and Lin Y.H.(2004). Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipouroea batatas*) Lam «Tamong 57» constituents. *Botanical Bulletin of Academi. Sinica.* 175-186.
- [70] Tamer F.M.D. (2003). Free Radicals. Types. Sources and Damaging Reactions. *Internal Medicine Articles.*
- [71] Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.*108-115.
- [72] Wang B.S. Li B.S .and Zeng Q.X.(2008). Antioxidant and free radical scavenging. activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater. *Food chemistry.* 1198-1204.
- [73] Pincemail J. Defraigne J.O. and Limet R. (2001).Vitamines. acides gras et prévention des maladies cardiovasculaires. *Medi Sphère.*130.
- [74]Lee J., Koo N. and Min D. (2006). Reactive oxygen species. aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 21-33.
- [75]Boyd B.. Ford C., Koepke Michael C., Gary K.. Horn E., McAnalley S. et McAnalley B.(2003).Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé.*Glyco. Science et Nutrition.* 4-7.
- [76] Morel Y. et Barouki R..(1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* 481-496.
- [77] Al-Mamary M..Al-Meeri A. and Al-Haboui M.. (2002).antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research.*1041-1047.
- [78] Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. and Traore A.S. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in

chloroplasts a submolecular approach. *Agriculture. Ecosystems and Environment*. 119-133.

- [79] Vansant G., (2004). Radicaux libres et antioxydants. principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.
- [80] Masuda T., Yonemori S., Oyama Y., Takeda Y., Tanaka T. and Andoh. T., (1999). Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants. activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1749-1754.
- [81] Molyneux P., (2004). The use of the stable free radical diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* Vol. 26 .N°2. 211-219.
- [82] Panichayupakaranant P. et Kaewsuwan S.. (2004). Bioassay-guided isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata* L. leaves. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 103-107.
- [83] Leitão G. G., Leitão S. G. et Vilegas W. (2002) .Quick Preparative Separation of Natural Naphtho pyranones with Antioxidant Activity by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Z. Naturforsch.* 57c. 1051-1055.
- [84] Mensor L. L., Menezes F. S., Leitão G. G., Reis A. S., Santos T. C., Coube C. S. et Leitão S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant iso activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* 15. 127-130.
- [85] Bartošíková L., Nečas J., Suchý V., Kubínová R., Veselá D., Beneš L., Illek J., Šalplachta J., Florian T., Frydrych M., Klusáková J., Bartošík T., Fráňa P. et Džúrová J. (2003). Antioxidative Effects of Morine in Ischemia-Reperfusion of Kidneys in the Laboratory Rat. *Acta Vet. Brno.* 72. 87-94.
- [86] Heilerová L., Bučková M., Tarapčík P., Šilhár S. et Labuda J. (2003). Comparison of antioxidative Activity Data for Aqueous Extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*Origanum vulgare* L.), Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and Agrimony (*Agrimonia*

eupatoria L.) obtained by Conventional Methods and the DNA-Based Biosensor. Czech J. Food Sci. 21 (2). 78–84.

- [87] Lahouel M., Fillastre J-P.(2004). Role of flavonoids in the prevention of haematotoxicity due to chemotherapeutic agents. Haema.p. 313-320.
- [88] JurdL. and Horowitz. R.. (1962). Spectral properties of flavonoid compounds. pergamon press.Oxford. 107-2055.
- [89]Benmekhbi L.(2004). Etude phytochimique et biologique de l'extrait butanolique et des huile essentielle des grains et des tiges de l'espèce endémique de *chabka* du m'zaba " pituranthos scoparius"(apiacéas).Mém. magistère en chimie.
- [90]DouhouN.et al.(2003).Screening phytochimique d'une endémique *IBERO MAROCAINE THYME LAEA LYTHROIDES*.Bull.Soc.Pharm.Bordeaux.61-78.
- [91]Senhaji O et al.(2005).Etude de l'activité antifongique de divers extraits de gingembre .J. Mycologie Med.220-229.
- [92] Cotelle. N. (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. Current topics in medicinal chemistry. 1. 569-590.
- [93] Lin. J.K., Weng. M.S. (2006) Flavonoids as Nutraceuticals. In . The science of flavonoids. Grotewold. E. Eds. Springer. 217
- [94] Heim. E.K., Tagliaferro. A.R., Bobilya. D.J. (2002) Flavonoid antioxidants . chemistry . metabolism and structure-activity relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry. 13. 572-584.
- [95] Javanovic. S.V., Steenken. S., Tomic. M.. Marjanovic. B., Simic. M.J. (1994) Flavonoids as antioxidants. Journal of the American Chemical Society. 116. 4846-4851.
- [96] Densiov. E.T., Afanas'ev. I.B. (2005) IN. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds. Taylor & Francis Group (U.S.A). Pp. 703-861.

- [96] McCord. J.M. (1995) Superoxide radical. Controversies, contradictions and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 202. 112-117.
- [97] Rice-Evans.C. (2001) Flavonoid as Antioxidants. *Current medicinal chemistry*. 8. 797-807.
- [98] Van Acker. S.A.B.E., Van Den Berg. D.J., Tromp. M.N.L., Griffioen. D.H., Bennenkom. W.P.V., Van Der Vijgh. W.J.F., Bast. A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free radical biology & medicine*. 20. 331-342.
- [99]Rice-Evans.C. (2001) Flavonoid as Antioxidants. *Current medicinal chemistry*. 8. 797-807.
- [100] Cotelle. N. (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*. 1. 569-590.
- [101] Cos. P., Ying. L., Calomme.M.,Hu. J.P.,Cimanga.K., Van Poel. B., Pieters. L., Vlietinck. A.V., Berghe. D.K. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products*. 61. 71-76.
- [102]Pietta. P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 63. 1035-1042.
- [103] Seyoum. A. Asres. K., El-Fiky. F.K.(2006) Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids . *Journal of phytochemistry* .67. 2058-2070.
- [104]Hendrich. A.B. (2006) Flavonoid-membrane interactions . possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica*. 27. 27-40.

- [105] Balasundram. N., Sundram. K., Samman. S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products. Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. 9. 191-203.
- [106] Gardès-Albert M. Bonnefont-Rousselot D. Abedinzadeh Z et Jore D (2003). Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*. 91-96.
- [107] Cadenas E and Davies J A (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 29. 222-230. Cadenas E and Davies J A (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 29. 222-230.
- [108] Lee J. Koo N and Min D B (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3 (1). 21-33.
- [109] Ahsan H. Ali A and Ali R (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*. 131. 398-404.
- [110] Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F. and Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*. 771-776.
- [111] Pincemail J. Meurisse M. Limet R et Defraigne J O (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu. une réalité pour le médecin. *Vaisseaux. Coeur. Poumons*. 4 (5).
- [112] Lee J, Koo N and Min D B (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1), 21-33.
- [112] Lee J, Koo N and Min D B (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1), 21-33.

- [113] Seghiri, R., 2006. Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. niceansis*. Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine, Algérie
- [114] Voirin, B., 1983. UV spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy-3-methoxy-flavones with mono-(4'), di-(3'-4') or tri (3',4'-5')-substituted B rings. *Phytochemistry*. 22, 2107-2145.
- [115] Markham, K.R. (1982), *Technique of flavonoides identification*, Academic press, London.
- [116] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970), *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag. New York, Heidelberg. 254p.
- [117] Markham, K.R. and Mabry, T.J. (1968), *Phytochemistry*, 7, pp. 1197.

#### **SITES WEB .**

[www.ziziphora.htm](http://www.ziziphora.htm)

[www.naturamedic.com](http://www.naturamedic.com)