

N° d'ordre...

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES  
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
Département des Sciences de l'Environnement

# ***THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES***

***Présentée par :***

Mr BOUTERFAS Karim

***Spécialité : Environnement***

***Option : Biodiversité végétale et valorisation***

***Intitulé***

**Étude écobiochimique et activités biologiques  
des composés phénoliques de  
*Marrubium vulgare* L.**

***Soutenue le .....***

***Devant l'honorable jury composé de :***

***Président de jury :*** Mr LATRECHE Ali

**Professeur, UDL/SBA**

***Examineurs :*** Mme MEHRAS Rachida

**Professeur, UHBB/Chlef**

Mme SOUIDI Zahira

**M.C.A, Univ. Mascara**

Mme MAHROUG Samira

**M.C. A, UDL/SBA**

Mr CHADLI Rabah

**M.C. A, Univ. Ibn Badis/Mostaganem**

***Directeur de thèse :*** Mr MEHDADI Zoheir

**Professeur, UDL/SBA**

**Année universitaire 2014 - 2015**

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mes très **chers parents** pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements. Que ce travail soit pour eux un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse,

À ma **femme**,

À mes **frères**,

À mon oncle **Ahmed** pour le soutien qu'il m'a apporté et pour sa présence constante aux cours de toutes mes années d'études,

À ma grande mère et à toute la famille **Sohbi**,

À toute ma belle famille **Elaoufi**,

À tout le groupe de ma **promotion de post-graduation**,

À mes **collègues de laboratoire** de « Biodiversité végétale : valorisation & conservation ».

À tous **mes amis**.

À toute personne qui me connaît.

**BOUTERFAS Karim**

# Remerciements

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent  
du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers  
par qui nos âmes sont fleuries.*

**Marcel Proust**

Louange à ALLAH, seigneur de l'univers, le tout puissant et miséricordieux, qui m'a inspiré et comblé de bienfaits, je lui rends grâce.

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant en grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de thèse, **Mr MEHDADI Zoheir**, Professeur à l'université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbès pour ses qualités d'encadrant, à la fois scientifiques et humaines. Je lui suis très reconnaissant pour sa disponibilité, sa bienveillance et son soutien permanent, et d'avoir prêté un intérêt constant au sujet. Je lui dois beaucoup pour le contenu du travail présenté, pour ses critiques constructives et son aide aux différentes entraves rencontrées, pour sa gentillesse et surtout son amitié.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble du membre de mon jury :

À **Mr LATRECHE Ali**, Professeur à l'université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbès qui nous fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je lui adresse mes respectueux remerciements.

À **Mme MEHRAS Rachida**, Professeur à l'université Hassiba Ben Bouali de Chlef, qui a bien voulu juger ce travail et d'avoir très aimablement consenti à prendre part au jury de cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma très haute considération.

À **Mme SOUIDI Zahira**, Maitre de conférences « A » à l'université de Mascara, pour avoir eu l'amabilité de juger sans hésitation cette thèse et d'accepter de siéger parmi les membres de jury. Je lui en suis profondément reconnaissant.

À **Mme MAHROUG Samira**, Maitre de conférences « A » à l'université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbès qui a accepté de participer au jury et d'examiner cette thèse. Mes sincères remerciements.

À **Mr CHADLI Rabah**, Maitre de conférences « A » à l'université Ibn Badis de Mostaganem pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie du jury de cette thèse. Je vous transmets ma plus grande gratitude.

Ce travail a bénéficié du soutien de plusieurs personnes à qui je dois adresser mes remerciements les plus sincères :

Je dois beaucoup à **Mr KHALED Meghit Boumediene**, Maitre de conférences « A » à l'université Djillali Liabes qui avec sérieux et enthousiasme réconfortant m'a beaucoup aidé dans l'accomplissement de cette thèse.

Je suis profondément reconnaissant à **Mr Benmansour Djamel**, Docteur à la faculté des sciences de la nature et de l'univers, université Abou-Bekr Belkaïd de Tlemcen pour son aide dans les différents traitements statistiques réalisés.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde gratitude à **Mme AOUAD Linda**, Maitre de conférences « A » à l'université Djillali Liabes de Sidi Bel abbés pour m'avoir guidé, conseillé et orienté avec beaucoup de pertinence dans la réalisation de la partie microbiologique.

Mes sincères remerciements vont également à **Mr CAFFARRI Stefano**, Maitre de conférences en Biochimie à la faculté des sciences de Luminy, université Aix Marseille (France). Merci d'avoir géré, avec beaucoup de pertinence, les tests de chromatographie liquide à haute performance. Merci aussi pour sa disponibilité, ses conseils, sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je remercie vivement **Mr ROBAGLIA Christophe**, Directeur du Laboratoire de Génétique et Biophysique des Plantes (LGBP), faculté des sciences de Luminy, université Aix Marseille (France) pour m'avoir chaleureusement accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que pour la mise à notre disponibilité des produits et matériels nécessaires à l'accomplissement des tests HPLC et une partie des dosages.

En écrivant ces remerciements, je ne peux pas m'empêcher de remercier très chaleureusement **Mme LATIFI Amel**, Professeur à l'université Aix Marseille (France) qui a malgré ces nombreuses occupations, accepté de d'apporter son aide. Je lui exprime ma sincère gratitude.

J'adresse encore mes remerciements à tous les **membres du Laboratoire de recherche « Biodiversité Végétale : Conservation et Valorisation »**, qui contribuent par leurs bonnes humeurs à créer un cadre de travail agréable.

Je remercie tout les **membres du Laboratoire de Génétique et Biophysique des Plantes (LGBP)**, de la faculté des sciences de Luminy, Aix Marseille, France, pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler durant la période de mon stage en France. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun d'eux m'ont beaucoup apporté.

Enfin, je suis reconnaissant à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

À tous ces gens-là, je serais éternellement reconnaissant. Merci.

## TABLE DES MATIÈRES

	<b>Page</b>
DÉDICACE	I
REMERCIEMENTS	II
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES PLANCHES	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
RÉSUMÉ	XVII
الملخص	XVIII
ABSTRACT	XIX
Introduction générale	1
<b>PARTIE I : Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I: Marrube blanc (<i>Marrubium vulgare</i> L.): caractéristiques et propriétés</b>	
I.1. Introduction	6
I.2. Aspects historiques	6
I.3. Description morpho-anatomique et botanique	7
I.3.1. Les feuilles	7
I.3.2. Les tiges	8
I.3.3. Les racines	8
I.3.4. Fleurs et calices	9
I.4. Classifications systématiques	14
I.4.1. Ancienne classification	14
I.4.2. Classification récente	14
I.5. Noms vernaculaires et synonymes taxonomiques	15
I.6. Origine, habitat et écologie	15
I.7. Usages traditionnels décrits dans le monde Maghrébin	16
I.7.1. En Algérie	16
I.7.2. En Tunisie	16
I.7.3. Au Maroc	16
I.8. Composition chimique	17
I.8.1. Les ditéropènes	17
I.8.2. Les huiles essentielles	18
I.8.3. Les flavonoïdes	19
I.8.4. Les phénylpropanoïdes	20
I.9. Propriétés pharmacologiques	21
I.9.1. Potentiel vasodilatateur et antihypertenseur	21
I.9.2. Propriétés antidiabétiques et cardiovasculaires	21
I.9.3. Propriétés antimicrobiennes	21
I.9.4. Activités antioxydantes	22
I.9.5. Potentiel analgésique	23
I.9.6 Effet anticancéreux	23
I.9.7. Propriétés molluscicide et anti-moustique	23
<b>Chapitre II: Les composés phénoliques végétaux: flavonoïdes et tanins</b>	
II.1. Introduction	24

II.2. Les flavonoïdes	24
II.2.1. Définition et généralités	24
II.2.2. Structure et classification	25
II.2.2.1. Flavones et flavonols	25
II.2.2.2. Flavanones et hydroflavonols	25
II.2.2.3. Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols	25
II.2.2.4. Chalcones et aurones	26
II.2.3. Localisation, distribution et biodisponibilité	26
II.2.4. Rôle dans les plantes	27
II.2.5. Intérêts thérapeutiques	28
II.2.5.1. Activité antibactérienne	28
II.2.5.2. Activité antifongique	29
II.2.5.3. Potentiel antioxydant	29
II.2.5.4. Activité antivirale	30
II.2.5.5. Propriété anti-cancérogène	30
II.2.5.6. Activité antiparasitaire	30
II.3. Les tanins	31
II.3.1. Définition et généralités	31
II.3.2. Structure et classification	31
II.3.2.1. Les tanins hydrolysables (tannoïdes ou pyrogallique)	32
II.3.2.2. Les tanins condensés (tanins catéchiques ou proanthocyanidols)	32
II.3.3. Localisation et rôle chez la plante	33
II.3.4. Activités pharmacologiques	34
II.3.4.1. Activité antibactérienne	34
II.3.4.2. Activité antifongique	34
II.3.4.3. Potentiels antidiarrhéique et antiseptique	35
II.3.4.4. Activité antiparasitaire	35
II.3.4.5. Activité anti-tumorale	35
II.3.4.6. Autres activités	35
II.4. Facteurs influençant la synthèse des composés phénoliques	36
II.4.1. Influence de l'environnement sur la synthèse des composés phénoliques	36
II.4.1.1. Lumière	36
II.4.1.2. Température de l'environnement	37
II.4.1.3. Période de l'année	37
II.4.1.4. Nutrition minérale	38
II.4.1.5. Enrichissement en CO <sub>2</sub>	39
II.4.1.6. Région géographique	39
II.4.2. Influence des conditions d'extraction sur la synthèse des composés phénoliques	39
II.4.2.1. Préparation de la matière végétale	40
II.4.2.2. Technique d'extraction	40
II.4.2.3. Température d'extraction	41
II.4.2.4. Temps d'extraction	41
II.4.2.5. Nature et concentration du solvant d'extraction	42
II.4.2.6. Rapport solvant-soluté	43
<b>Chapitre III: Rappels sur les activités biologiques: antimicrobienne et antioxydante</b>	
III.1. Introduction	44
III.2. Aperçu sur les propriétés thérapeutiques des plantes médicinales	44
III.3. Activité antimicrobienne	45
III.3.1. Généralités sur les antibiotiques et les antifongiques	46

III.3.1.1. Les antibiotiques	46
III.3.1.2. Les antifongiques	47
III.3.1.3. Résistances aux antibiotiques et aux antifongiques	47
III.3.2. Techniques d'évaluations de l'activité antimicrobienne	48
III.3.2.1. La méthode de diffusion sur disque	48
III.3.2.2. La méthode de dilution	48
III.4. Activité antioxydante	49
III.4.1. Radicaux libres et stress oxydant	49
III.4.1.1. Définition, origine et types	49
III.4.1.2. Dommages oxydatifs	50
III.4.2. Antioxydants	51
III.4.2.1. Définition et mécanisme d'action	51
III.4.2.2. Classification	51
III.4.2.2.A. Antioxydants synthétiques	51
III.4.2.2.B. Antioxydants synergiques	52
III.4.2.2.C. Antioxydants naturels	52
III.4.2.3. Techniques d'évaluation de l'activité antioxydante	53
III.4.2.3.A. Test de réduction du radical stable, DPPH	53
III.4.2.3.B. Test de blanchiment : $\beta$ -carotène/acide linoléique	54
III.4.2.3.C. Test de réduction du fer (FRAP)	54
III.4.2.3.D. Test de capture des radicaux peroxydes: ORAC et TRAP	54
<b>Partie II : Etude expérimentale</b>	
<b>Chapitre I: Présentation des sites d'études</b>	
I.1. Introduction	56
I.2. Contexte géographique	56
I.3. Orographie et hydrographie	57
I.4. Pédologie	59
I.5. Cadre climatique	60
I.5.1. Choix des stations météorologiques	60
I.5.2. Précipitations (P mm)	61
I.5.3. Températures (T °C)	62
I.5.4. Synthèse climatique	63
I.5.4.1. Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausсен	63
I.5.4.2. Régime saisonnier des précipitations (RS) et coefficient relatif de Musset (Crs)	65
I.5.4.3. Amplitude thermique ou indice de continentalité (IC)	67
I.5.4.4. Indice de sécheresse estivale (ISE)	67
I.5.4.5. Quotient pluviométrique d'Emberger (Q <sub>2</sub> )	68
I.5.4.6. Indice d'aridité de De Martonne (IDM)	69
I.6. Formations végétales	71
<b>Chapitre II: Matériels biologiques et méthodes d'étude</b>	
II.1. Choix des stations d'échantillonnage	74
II.1. Etude quantitative et qualitative des composés phénoliques	76
II.1.1. Etude quantitative des composés phénoliques	76
II.1.1.1. Matériel végétal et préparation des extraits	76
II.1.1.1.A. Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles de <i>Marrubium vulgare</i> L.	76
II.1.1.1.B. Effet des paramètres environnementaux sur les concentrations en polyphénols chez différents organes de <i>Marrubium vulgare</i> L.	77

II.1.1.2. Dosage des composés phénoliques	77
II.1.1.2.A. Dosage des phénols totaux (PT)	77
II.1.1.2.B. Dosage des flavonoïdes (FLA)	78
II.1.1.2.C. Dosage des tanins condensés (TC)	78
II.1.2. Etude qualitative des composés phénoliques	78
II.1.2.1. Matériel végétal	78
II.1.2.2. Extraction des composés phénoliques	79
II.1.2.3. Standards phénoliques testés	79
II.1.2.4. Séparation des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée	79
II.1.2.4.A. Phase mobile	79
II.1.2.4.B. Pompe	80
II.1.2.4.C. Injecteur	80
II.1.2.4.D. Colonne analytique	80
II.1.2.4.E. Détecteur	81
II.1.2.4.F. Système de traitement des données	81
II.1.3. Traitements statistiques	81
II.2. Activités biologiques des flavonoïdes extraits des feuilles	82
II.2.1. Matériel biologique	82
II.2.2. Extraction des flavonoïdes	82
II.2.3. Screening (criblage) phytochimique de quelques classes polyphénols	83
II.2.3.1. Détection des polyphénols	83
II.2.3.2. Caractérisation des tanins	83
II.2.3.3. Caractérisation des flavonoïdes	84
II.2.3.4. Détection des coumarines	84
II.2.3.5. Recherche des flavanes	84
II.2.3.6. Recherche des flavanols	84
II.2.3.7. Recherche des anthocyanes	84
II.2.3.8. Recherche des proanthocyanidols	84
II.2.4. Activités antimicrobiennes	85
II.2.4.1. Les souches microbiennes testées	85
II.2.4.1.A. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	85
II.2.4.1.B. <i>Escherichia coli</i>	85
II.2.4.1.C. <i>Bacillus cereus</i>	86
II.2.4.1.D. <i>Staphylococcus aureus</i>	86
II.2.4.1.E. <i>Proteus mirabilis</i>	86
II.2.4.1.F. <i>Penicillium digitatum</i>	87
II.2.4.1.G. <i>Aspergillus niger</i>	87
II.2.4.1.H. <i>Candida albicans</i>	87
II.2.4.2. Les milieux de culture	88
II.2.4.3. Tests de sensibilité : technique de diffusion en milieu solide	88
II.2.4.3.A. Préparation des concentrations	88
II.2.4.3.B. Méthode d'étude	88
II.2.4.3.B.1. Test antibactérien	88
II.2.4.3.B.2. Test antifongique	89
II.2.4.3.C. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques	89
II.2.4.3.C.1. Antibiogramme	90
II.2.4.3.C.2. Antifongigramme	90
II.2.4.3.D. Classement des souches testées selon leurs sensibilités aux antibiotiques	91

et aux extraits	
II.2.4.4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) : technique de dilution en milieu liquide	91
II.2.5. Activités antioxydantes	92
II.2.5.1. Quantification des phénols totaux et des flavonoïdes	92
II.2.5.2. Test de piégeage du radical libre DPPH	92
II.2.6. Analyses statistiques	93
<b>Chapitre III: Résultats et discussions</b>	
III.1. Résultats	94
III.1.1. Étude quantitative et qualitative des composés phénoliques	94
III.1.1.1. Étude quantitative des composés phénoliques	94
III.1.1.1.A. Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles	94
III.1.1.1.A.1. Variations quantitatives des composés phénoliques	94
III.1.1.1.A.2. Analyse en composantes principales (ACP)	99
III.1.1.1.A.3. Méthode de réponse de surface	100
III.1.1.1.B. Effet des paramètres environnementaux sur les concentrations en polyphénols chez différents organes	103
III.1.1.1.B.1. Variations saisonnières et mensuelles des composés phénoliques	103
III.1.1.1.B.2. Analyse factorielle des correspondances (AFC)	110
III.1.1.2. Étude qualitative des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée	112
III.1.1.2.A. Standards phénoliques	112
III.1.1.2.B. Variation saisonnière des acides phénoliques extraits des feuilles de quatre provenances	117
III.1.1.2.C. Variation saisonnière des flavonoïdes extraits des feuilles de quatre provenances	126
III.1.2. Activités biologiques des flavonoïdes	135
III.1.2.1. Activités antimicrobiennes	135
III.1.2.1.A. Test préliminaire : pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de <i>M. vulgare</i> en provenance du mont de Tessala	135
III.1.2.1.A.1. Rendements des extractions	135
III.1.2.1.A.2. Criblage phytochimique	136
III.1.2.1.A.3. Tests antimicrobiens	136
III.1.2.1.A.3.1. Test de sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques commercialisés	136
III.1.2.1.A.3.2. Sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des extraits flavonoïques	139
III.1.2.1.A.3.3. Classement des souches microbiennes et des extraits flavonoïques	142
III.1.2.1.B. Variation du pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de <i>M. vulgare</i> en fonction de la localité d'échantillonnage	144
III.1.2.1.B.1. Rendements en extraits flavonoïques	144
III.1.2.1.B.2. Screening phytochimique	145
III.1.2.1.B.3. Activités antibactériennes et antifongiques	146
III.1.2.1.B.3.1. Antibiogramme et antifongigramme	146
III.1.2.1.B.3.2. Pouvoir antimicrobien des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage	149
III.1.2.1.B.3.2.1. Flavonoïdes extraits des feuilles de <i>M. vulgare</i> en provenance du mont de Tessala	149
III.1.2.1.B.3.2.2. Flavonoïdes extraits des feuilles de <i>M. vulgare</i> en provenance de Aïn Skhouna	154

III.1.2.1.B.3.2.3. Flavonoïdes extraits des feuilles de <i>M. vulgare</i> en provenance de la forêt domaniale de M'sila	158
III.1.2.1.B.3.2.4. Analyse de la variance (ANOVA)	161
III.1.2.1.B.3.2.5. Catégorisation des souches microbiennes et des extraits flavonoïques	162
III.1.2.2. Activités antioxydantes	165
III.1.2.2.A. Quantification des phénols totaux et des flavonoïdes	165
III.1.2.2.B. Test de réduction et pourcentages d'inhibition du radical stable (DPPH)	166
III.1.2.2.C. Concentrations minimales inhibitrices 50 (CI <sub>50</sub> )	170
III.1.2.2.D. Analyse de la variance (ANOVA)	171
III.2. Discussion	172
III.2.1. Étude quantitative et qualitative des composés phénoliques	172
III.2.1.1. Étude quantitative des composés phénoliques	172
III.2.1.1.A. Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles	172
III.2.1.1.A.1. Effet de la nature du solvant organique	172
III.2.1.1.A.2. Effet de la concentration du solvant organique	173
III.2.1.1.A.3. Effet du temps d'extraction	174
III.2.1.1.A.4. Effet de la température d'extraction	175
III.2.1.1.B. Effet des paramètres environnementaux sur les concentrations en polyphénols chez différents organes de <i>M. vulgare</i>	177
III.2.1.1.B.1. Influence de l'organe analysé	177
III.2.1.1.B.2. Influence de la saison de prélèvement	178
III.2.1.1.B.3. Influence du mois de prélèvement	179
III.2.1.1.B.4. Influence de la localité d'échantillonnage	180
III.2.1.1.B.5. Influence de l'altitude de la station de prélèvement	182
III.2.1.1.B.6. Influence de l'exposition de la station de prélèvement	183
III.2.1.2. Étude qualitative des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée	185
III.2.2. Activités biologiques des flavonoïdes	190
III.2.2.1. Activités antimicrobiennes	190
III.2.2.1.A. Test préliminaire : pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de <i>M. vulgare</i> en provenance du mont de Tessala	190
III.2.2.1.B. Variation du pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de <i>M. vulgare</i> en fonction de la localité d'échantillonnage	193
III.2.2.2. Activités antioxydantes	201
Conclusions et perspectives	206
Références bibliographiques	209
Annexes	
Publications internationales	

## LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
Tabl. 1	Place de <i>Marrubium vulgare</i> L. dans la classification classique de Cronquist (1988)	14
Tabl. 2	Place de <i>Marrubium vulgare</i> L. dans la classification phylogénétique APG II (2003)	14
Tabl. 3	Sources alimentaires de quelques flavonoïdes	26
Tabl. 4	Contenu en flavonoïdes de quelques aliments végétaux (mg / kg)	27
Tabl. 5	Caractéristiques des différentes stations météorologiques	61
Tabl. 6	Répartition mensuelle et annuelle des précipitations moyennes (exprimées en mm) des différents sites d'étude	61
Tabl. 7	Répartition mensuelle et annuelle des températures moyennes (exprimées en °C) des différents sites d'étude	62
Tabl. 8	Répartition saisonnière des précipitations, régime saisonnier (RS) et coefficient relatif de Musset (Crs) des différents sites d'étude	65
Tabl. 9	Indice de continentalité (IC) es différents sites d'étude	67
Tabl. 10	Indice de sécheresse estivale (ISE) des différents sites d'étude	68
Tabl. 11	Quotient pluviométrique (Q <sub>2</sub> ) d'Emberger des différents sites d'étude	68
Tabl. 12	Indice d'aridité de De Martonne (IDM) des différents sites d'étude	70
Tabl. 13	Paramètres stationnels des différentes stations d'échantillonnage	73
Tabl. 14	Les antibiotiques commercialisés utilisés	90
Tabl. 15	Les antifongiques commercialisés utilisés	91
Tabl. 16	Classement des souches microbiennes selon leurs sensibilités	91
Tabl. 17	Analyse de la variance (ANOVA) à plusieurs critères de classification : effet des conditions d'extraction sur les concentrations moyennes en polyphénols.	98
Tabl. 18	Valeurs expérimentales et théoriques maximales des concertations en polyphénols dosés et des paramètres d'extraction	101
Tabl. 19	Concentrations moyennes mensuelles (maximales et minimales) des polyphénols dosés sur différents organes.	107
Tabl. 20	Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet des saisons (automne-hiver-printemps) sur les organes végétatifs (feuilles-tiges-racines).	108
Tabl. 21	Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet des mois de l'automne (octobre-novembre-décembre) sur les organes végétatifs (feuilles-tiges-racines)	108
Tabl. 22	Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet des mois de l'hiver (janvier-février-mars) sur les organes végétatifs (feuilles-tiges-racines).	109
Tabl. 23	Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet des mois du printemps (avril-mai-juin) sur les organes végétatifs (feuilles-tiges-racines).	109
Tabl. 24	Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet des mois l'été (juillet-août-septembre) sur les organes analysés (feuilles-tiges-racines-fleurs)	110
Tabl. 25	Temps de rétention et aires des pics des standards phénoliques testés (acides phénoliques et flavonoïdes).	112
Tabl. 26	Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des acides phénoliques extraits des feuilles du mont de Tessala.	119

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tabl. 27</b>	Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des acides phénoliques extraits des feuilles de la forêt domaniale de M'sila.	121
<b>Tabl. 28</b>	Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des acides phénoliques extraits des feuilles de Béni Saf	123
<b>Tabl. 29</b>	Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des acides phénoliques extraits des feuilles de Aïn Skhouna	125
<b>Tabl. 30</b>	Variation saisonnière (temps de rétention et aires de pics) des flavonoïdes extraits des feuilles du mont de Tessala.	128
<b>Tabl. 31</b>	Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des flavonoïdes extraits des feuilles de la forêt domaniale de M'sila.	130
<b>Tabl. 32</b>	Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des flavonoïdes extraits des feuilles de Béni Saf.	132
<b>Tabl. 33</b>	Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des flavonoïdes extraits des feuilles de Aïn Skhouna.	134
<b>Tabl. 34</b>	Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions flavonoïques extraites des feuilles en provenance du mont de Tessala	135
<b>Tabl. 35</b>	Screening phytochimique des extraits flavonoïques obtenus des feuilles du mont de Tessala	136
<b>Tabl. 36</b>	Diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ écart-type) et sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques commercialisés	137
<b>Tabl. 37</b>	Diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ écart-type), concentrations minimales inhibitrices ( $\mu\text{g/ml}$ ) et sensibilité des souches Microbiennes	139
<b>Tabl. 38</b>	Classement des extraits flavonoïques de <i>M. vulgare</i> en provenance du mont de Tessala selon leurs effets antimicrobiens et des souches microbiennes selon leurs sensibilités	142
<b>Tabl. 39</b>	Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions flavonoïques extraites des feuilles des trois localités d'échantillonnage	144
<b>Tabl. 40</b>	Criblage phytochimique des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage	145
<b>Tabl. 41</b>	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de l'antibiogramme et de l'antifongogramme et sensibilités des souches microbiennes	146
<b>Tabl. 42</b>	Diamètres moyens des zones d'inhibition (en mm) et CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits flavonoïques du mont de Tessala	149
<b>Tabl. 43</b>	Diamètres moyens des zones d'inhibition (en mm) et CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits flavonoïques de Aïn Skhouna	154
<b>Tabl. 44</b>	Diamètres moyens des zones d'inhibition (en mm) et CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila	158
<b>Tabl. 45</b>	Analyses de la variance à plusieurs critères de classification : effet de l'extrait flavonoïque, du type de la souche microbienne et la localité d'échantillonnage sur le pouvoir antimicrobien	161
<b>Tabl. 46</b>	Classement des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités	163
<b>Tabl. 47</b>	Analyses de la variance à plusieurs critères de classification : effet de l'extrait flavonoïque et de la localité d'échantillonnage sur l'activité antioxydante	169

## LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
Fig. 1	Structures chimiques de quelques diréerpènes isolés de l'espèce <i>Marrubium vulgare</i> L.	18
Fig. 2	Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés de l'espèce <i>Marrubium vulgare</i> L.	20
Fig. 3	Structures chimiques de quelques phénylpropanides isolés de l'espèce <i>Marrubium vulgare</i> L.	20
Fig. 4	Structure tricyclique commune aux flavonoïdes	25
Fig. 5	Structure des tanins condensés	32
Fig. 6	Carte des situations géographiques des sites d'étude	57
Fig. 7	Diagramme ombrothermique ( $P = 2T$ ) des différents sites d'étude	64
Fig. 8	Régime saisonnier des précipitations (mm) des différents sites d'étude	66
Fig. 9	Climagramme d'Emberger des différents sites d'étude	69
Fig. 10	Abaque de l'indice d'aridité de De Martonne des différents sites d'étude.	71
Fig. 11	Effets de la nature du solvant organique (A, B, C) et de sa concentration (D, E, F) sur les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés	
Fig. 12	Effets du temps d'extraction (A,B,C) et de la température d'extraction (D,E,F) sur les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés	96
Fig. 13	Analyse en composantes principales (ACP)	100
Fig. 14	Tracé de surface de réponse de l'effet de la concentration du solvant-température d'extraction (A), concentration du solvant-temps d'extraction (B) et temps d'extraction-température d'extraction (C) sur les concentrations en composés phénoliques	102
Fig. 15	Variations saisonnières des concentrations moyennes en composés phénoliques dosés sur les feuilles (A, B et C) et les tiges (D, E et F)	105
Fig. 16	Variations saisonnières des concentrations moyennes en composés phénoliques dosés sur les racines (A, B et C) et les fleurs (D, E et F)	106
Fig. 17	Analyse factoriel des correspondances (AFC)	111
Fig. 18	Profils du chromatogramme CLHP ( $\lambda = 370$ nm) des standards flavonoïques	114
Fig. 19	Profils du chromatogramme CLHP ( $\lambda = 280$ nm) des acides phénoliques Commercialisés	116
Fig. 20	Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des acides phénoliques ( $\lambda = 280$ nm) extraits des feuilles du mont de Tessala.	118
Fig. 21	Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des acides phénoliques ( $\lambda = 280$ nm) extraits des feuilles de la forêt domaniale de M'sila	120
Fig. 22	Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des acides phénoliques ( $\lambda = 280$ nm) extraits des feuilles de Béni Saf	122
Fig. 23	Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des acides phénoliques ( $\lambda = 280$ nm) extraits des feuilles de Aïn Skhouna	124
Fig. 24	Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des flavonoïdes ( $\lambda = 370$ nm) extraits des feuilles du mont de Tessala.	127
Fig. 25	Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des flavonoïdes ( $\lambda = 370$ nm) extraits des feuilles de la forêt domaniale de M'sila	129
Fig. 26	Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des flavonoïdes ( $\lambda = 370$ nm) extraits des feuilles de Béni Saf	131
Fig. 27	Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des flavonoïdes ( $\lambda = 370$ nm)	133

<b>Fig. 28</b>	extraits des feuilles de Aïn Skhouna Concentrations moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits flavonoïques	165
<b>Fig. 29</b>	Absorbance (à 515 nm) des standards phénoliques et des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage	168
<b>Fig. 30</b>	Activité antioxydante (en %) des standards phénoliques et des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage	169
<b>Fig. 31</b>	Concentrations minimales inhibitrices 50 (CI <sub>50</sub> ) des standards phénoliques et des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage	170

## LISTE DES PLANCHES

N°	Titre	Page
PI. I	Différents parties de <i>Marrubium vulgare</i> L.	10
PI. II	Coupes transversales au niveau d'une feuille de <i>Marrubium vulgare</i> L.	11
PI. III	Coupes transversales au niveau d'une tige de <i>Marrubium vulgare</i> L.	12
PI. IV	Coupes transversales au niveau d'une racine de <i>Marrubium vulgare</i> L.	13
PI. V	Photos des stations d'échantillonnage	75
PI. VI	Photos des tests de sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques commercialisés	138
PI. VII	Photos du test préliminaire de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes des feuilles en provenance du mont de Tessala	140
PI. VIII	Photos de l'activité antimicrobienne des antibiotiques et des antifongiques commercialisés	147
PI. IX	Photos de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits des feuilles provenance du mont de Tessala	150
PI. X	Photos de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits des feuilles en provenance du mont de Aïn Skhouna	155
PI. XI	Photos de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits des feuilles en provenance du mont de la forêt domaniale de M'sila	159

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviation	Signification
<i>M. vulgare</i>	<i>Marrubium vulgare</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>P. digitatum</i>	<i>Penicillium digitatum</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Apr. J.C	après Jésus-Christ
Cm	Centimètre
Fig.	Figure
Tab.	Tableau
Pl.	Planche
APG II	Angiosperm Phylogeny Group II
L.	Linné
m	mètre
pH	potentiel hydrique
%	Pourcent
mg/kg	milligramme par kilogramme
CI <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice 50
µg/ml	microgramme par millilitre
mm	Millimètre
HDL	High Density Lipoprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
mg/ml	milligramme par millilitre
g	gramme
h	heure
CL <sub>100</sub> , CL <sub>90</sub> , CL <sub>50</sub>	Concentration létale (100, 90, 50)
ppm	partie par million
ADN	acide désoxyribonucléique
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
ADV	Aleutian Disease Virus
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
ARNm	acide ribonucléique messager
Sp.	Species
Da	Dalton
km	Kilomètre
ha	Hectare
C.F.W.O.	Conservation des Forêts de la wilaya d'Oran
A.E.F.C.O.	Administration des Eaux et Forêts de la conservation d'Oran
I.N.P.V.	Institut National de la Protection des Végétaux (Messerghine)
A.N.R.H.	l'Agence Nationale des Ressources hydrique
O.N.M.	Organisation National de Météorologie
I.N.P.N.	Inventaire National du Patrimoine Naturel
N	Nord
O	Ouest
E	Est
AP	Ancienne période
NP	Nouvelle période
P	Précipitations
T	Température

---

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>PS</b>	Période sèche
<b>PH</b>	Période humide
<b>S</b>	Station
<b>mn</b>	Minutes
<b>PT</b>	Phénols totaux
<b>FLA</b>	Flavonoïdes
<b>TC</b>	Tanins condensés
<b>U.V.</b>	Ultraviolet
<b>CLHP</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>A.C.P.</b>	analyse en composantes principales
<b>A.F.C.</b>	analyse factorielle des correspondances
<b>ANOVA</b>	analyse de la variance
<b>R</b>	Coefficient de corrélation de Pearson
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficient de régression
<b>UV-VIS</b>	Ultraviolet-visible
<b>λ</b>	longueur d'onde
<b>ml/mn</b>	Millimètre par minute
<b>RP</b>	Reversed-phase
<b>DAD</b>	diode array detector
<b>HPLC</b>	high performance liquid chromatography
<b>°C</b>	degré Celsius
<b>mM</b>	Millimolaire
<b>mg EAG/g</b>	Milligramme équivalent d'acide gallique par gramme
<b>mg EC/g</b>	Milligramme équivalent de catéchine par gramme
<b>mg EAT/g</b>	Milligramme équivalent d'acide tannique par gramme
<b>P/V</b>	Poids par volume
<b>O.M.S.</b>	Organisation Mondiale de Santé
<b>CMB</b>	Concentration minimale bactéricide
<b>CMF</b>	Concentration minimale fongicide
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentration efficace 50
<b>DPPH</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>DDL</b>	Degré de liberté
<b>SC</b>	Somme des carrés
<b>CM</b>	Carrés moyens
<b>F</b>	Fisher
<b>p</b>	Probabilité
<b>ND</b>	Non déterminé
<b>VE</b>	Valeur expérimentale
<b>VT</b>	Valeur théorique
<b>Max.</b>	Maximum
<b>Min.</b>	Minimum
<b>Tr</b>	Temps de rétention
<b>Comp.</b>	composé
<b>EBr</b>	Extrait brut
<b>EHx</b>	Extrait hexanique
<b>ECh</b>	Extrait chloroformique
<b>EAc</b>	Extrait d'acétate d'éthyle
<b>EAq</b>	Extrait aqueux
<b>Gr</b>	Groupe
<b>ORL</b>	Oto-Rhino-Laryngologie
<b>MH</b>	Muller Hinton
<b>OGA</b>	Oxytétracycline Glucose Agar
<b>DMF</b>	Diméthylformamide
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection

---

## RÉSUMÉ

ÉTUDE ÉCO-BIOCHIMIQUE ET ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DE *MARRUBIUM VULGARE* L.

Cette thèse a porté sur l'étude éco-biochimique d'une plante médicinale, le marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) en provenance de quatre localités de l'ouest algérien. Les objectifs visés consistent essentiellement à mettre en exergue l'effet de certains paramètres environnementaux et expérimentaux sur la variation quantitative et qualitative des composés phénoliques de l'espèce étudiée d'une part et, sur son pouvoir antimicrobien et antioxydant d'autre part.

Les résultats obtenus montrent que les conditions expérimentales d'extraction (nature du solvant organique et sa concentration, temps et température d'extraction) influent significativement sur les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés sur les feuilles de *M. vulgare*. Les teneurs moyennes maximales en phénols totaux ( $293 \pm 14,60$  mg équivalent d'acide gallique/g) sont obtenues avec le méthanol 60 % à 25 °C pendant 180 min ; en flavonoïdes ( $79,52 \pm 0,55$  mg équivalent de catéchine/g) avec le méthanol 80 % à 20 °C pendant 450 min et, en tanins condensés ( $28,15 \pm 0,80$  mg équivalent de catéchine/g) avec l'acétone 60 % à 50 °C et pendant 180 min. L'analyse en composantes principales confirme l'effet positif des basses températures sur l'extraction des phénols totaux et des flavonoïdes, et des fortes températures sur les tanins condensés. La méthode de réponse de surface donne des valeurs théoriques sur les conditions d'extraction et des teneurs maximales en polyphénols très proches à celles obtenues expérimentalement.

Les paramètres environnementaux testés (localité de prélèvement, mois et saison d'échantillonnage, altitude et exposition) ont un effet significatif sur les concentrations moyennes en composés phénoliques avec des valeurs plus importantes, notées sur les feuilles et les fleurs par rapport aux tiges et racines et ceci pendant les mois du printemps et de l'été par rapport aux mois de l'automne et de l'hiver. Les stations du littoral situées à de basses et moyennes altitudes ont enregistré des concentrations plus élevées par rapport à celles du mont de Tessala, situées à des altitudes élevées. Généralement, les concentrations maximales en composés phénoliques sont enregistrées dans le versant sud, par contre les concentrations minimales sont notées dans le versant nord. Les différences enregistrées sont dues probablement à des variations climatiques entre les différentes stations d'échantillonnage. L'analyse factorielle des correspondances confirme l'effet de l'organe végétal et de la saison de prélèvement sur les concentrations en polyphénols. Les tests de corrélation de Pearson ont montré des corrélations significatives entre les différents composés phénoliques dosés et l'organe végétatif analysé.

La séparation des extraits phénoliques des feuilles de *M. vulgare* par une chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée montre que les acides phénoliques et les flavonoïdes varient significativement en fonction de la localité d'échantillonnage et de la saison de prélèvement. Généralement, les extraits de Aïn Skhouna et de la forêt domaniale de M'sila renferment un nombre élevé de composés phénoliques par rapport à ceux du mont de Tessala et Béni Saf. Les deux saisons de printemps et d'été sont les mieux représentées en polyphénols contrairement à l'automne et l'hiver. En se référant aux temps de rétention des standards phénoliques testés, il ressort la présence probable de certains acides phénoliques comme les acides chlorogénique, ellagique, hydrocinnamique, tannique, férulique et la vanilline et, de quelques flavonoïdes représentés par la diosmine, la catéchine, la naringinine, la lutéoline, le kaempférol, la nobilétine et la diosmétine.

Le test préliminaire du pouvoir antimicrobien des extraits flavonoïques des feuilles de *M. vulgare* du mont de Tessala vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 1306 et *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) et deux souches fongiques (*Penicillium digitatum* ATCC 201167 et *Aspergillus niger* ATCC 16404), montre un remarquable effet antibactérien sur les bactéries Gram+ et une activité antifongique modérée. D'autre part, le potentiel antimicrobien des extraits flavonoïques obtenus des feuilles prélevées de trois localités d'échantillonnage (mont de Tessala, forêt domaniale de M'sila et Aïn Skhouna) contre trois souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Proteus mirabilis* ATCC 35659) et deux fongiques (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 et *Candida albicans* ATCC 10231) varie d'une manière significative en fonction de l'extrait flavonoïque testé et de sa concentration, du type de la souche microbienne et de la localité d'échantillonnage. Les diamètres d'inhibition enregistrés dépassent souvent ceux induits par les antibiotiques et les antifongiques commercialisés enregistrant même une inhibition totale de la croissance fongique. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues varient entre 6,25 et 100 µg/ml. Le screening phytochimique a révélé l'existence de certaines classes flavonoïques qui pourraient être responsables de ce remarquable pouvoir antimicrobien.

Le test de piégeage du radical libre, 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), montre que les activités antioxydantes des extraits flavonoïques obtenus des feuilles de *M. vulgare* en provenance de trois localités d'échantillonnage varient significativement en fonction du type de l'extrait flavonoïque testé, de sa concentration et de la localité d'échantillonnage. Les extraits méthanoliques, chloroformiques et d'acétate d'éthyle enregistrent les pourcentages d'inhibition les plus élevés contrairement aux deux extraits hexaniques et aqueux. Les concentrations inhibitrices 50 (Cl<sub>50</sub>) varient de 33,7 à 773,65 µg/ml et dépassent souvent celles enregistrées par les standards phénoliques.

**Mots clés :** *Marrubium vulgare*, composés phénoliques, localité d'échantillonnage, saison, chromatographie liquide à haute performance, pouvoir antimicrobien, activité antioxydante.

## المخلص

### دراسة كيموحيوية و الأنشطة البيولوجية للمركبات الفينولية لنبته المريوة *Marrubium vulgare* L.

ركزت هذه الأطروحة على الدراسة الكيموحيوية لنبته طبيئة، المريوة (*Marrubium vulgare* L.) الموجودة في اربع مواقع من الغرب الجزائري. الأهداف المسطرة تتكوّن في المقام الأوّل على تسليط الضوء على تأثير بعض العوامل البيئية و التجريبية على التغيرات الكمية و النوعية في المركبات الفينولية للنبته المدروسة من جهة، و على قدرتها المضادة للميكروبات و للأكسدة من جهة أخرى.

أظهرت النتائج المتحصّل عليها أنّ الظروف التجريبية لإستخراج المركبات الفينولية (طبيعة المحلول العضوي و تركيزه، المدة و درجة الحرارة) تؤثر بصفة معتبرة على تركيز المركبات الفينولية لأوراق نبته المريوة. أقصى تركيز من الفينولات الإجمالية ( $14.60 \pm 293$  ملغ معادل لحمض القاليك/غ) تحصلنا عليها بواسطة الميتانول 80% عند  $25^\circ\text{C}$  لمدة 180 دقيقة، من الفلافونويدات ( $0.55 \pm 79.52$  ملغ معادل للكاتشين/غ) بواسطة الميتانول 80% عند  $20^\circ\text{C}$  لمدة 450 دقيقة و من الطنويات المكثفة ( $0.80 \pm 28.15$  ملغ معادل للكاتشين/غ) بواسطة الأسيتون 60% عند  $50^\circ\text{C}$  لمدة 180 دقيقة تحليل المركبات الرئيسية يؤكد الأثر الإيجابي لدرجات الحرارة المنخفضة على إستخراج الفينولات الإجمالية و الفلافونويدات، و لدرجات الحرارة المرتفعة على إستخراج الطنويات المكثفة أعطت طريقة إستجابة السطوح قيم نظرية لظروف إستخراج المركبات الفينولية و للتركيزات القصوى قريبة جدًا من تلك المتحصّل عليها تجريبيًا.

العوامل البيئية المختبرة (موقع العينات، الشهر و الفصل، الإرتفاع و المنحدر) تؤثر بصفة معتبرة على تركيز المركبات الفينولية مع تسجيل قيم قصوى في الأوراق و في الزهور مقارنة مع السيقان و الجذور و هذا خلال أشهر الربيع و الصيف مقارنة مع أشهر الخريف و الشتاء سجّلت المواقع الساحلية التي تقع على إرتفاعات منخفضة و متوسطة أعلى تركيز للمركبات الفينولية مقارنة بجبل تسالة التي تقع على علو مرتفع عموماً، تمّ تسجيل تركيزات قصوى من المركبات الفينولية في المنحدر الجنوبي عكس المنحدر الشمالي أين تمّ تسجيل تركيزات دنيا من المرجح أنّ الإختلافات المسجّلة في التركيزات سببها التغيرات المناخية بين محطات أخذ العينات أكد تحليل المراسلات تأثير العضو النباتي و موسم أخذ العينات على تركيز المركبات الفينولية. أظهر إختبار "بيرسون" إرتباط ملموس بين المركبات الفينولية المدروسة و العضو النباتي المحلل.

يظهر فصل المستخلصات الفينولية لأوراق المريوة بإستعمال مختصر الاستشراب السائل الرقيق الإلجّاز (HPLC) أنّ الأحماض الفينولية و الفلافونويدات تتفاوت بصفة كبيرة وفقاً لموقع و لموسم أخذ العينات. عموماً، مستخلصات عين السخونة تحتوي على عدد كبير من المركبات الفينولية مقارنة بجبل تسالة و بني صاف. يحتوي موسمي الربيع و الصيف على أكبر عدد من المركبات الفينولية خلافاً لفصلي الشتاء و الصيف. بالاستدلال لأوقات الإبقاء للأحماض الفينولية، من المحتمل وجود أحماض الفينولية كحمض الكلوروجينيك، الإيلاجيك، إيدروسينميك، الثانيك، الفيرليك، الفانيلين و وجود فلافونويدات ممثلة في الديوسمين، الكاتشين، النرانجين، الليتولين، الكامفيرول، النيبيليتين و الديوسمين.

يظهر الإختبار الأوّلي للقدرة المضادة للميكروبات للمستخلصات الفينولية لأوراق نبته المريوة المؤخودة من جبل تسالة ضد أربع سلالات بكتيرية (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 13565) و سلالتان من الفطر (*Penicillium digitatum* ATCC 201167 و *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) و سلالتان من الفطر (*Aspergillus niger* ATCC 16404)، تأثير ملحوظ ضد البكتيريا صنف و نشاط متوسط ضد الفطريات. علاوة على ذلك، القدرة المضادة للميكروبات للمستخلصات الفينولية المستخرجة من أوراق نبته المريوة لثلاث مواقع (جبل تسالة، غابة مسيلة و بني صاف) ضد ثلاث سلالات بكتيرية (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Proteus mirabilis* ATCC 35659) و سلالتان من الفطر (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 et *Candida albicans* ATCC 10231) تخلف إلى حدّ بعيد حسب المستخلص الفلافونودي و تركيزه، نوع السلالة الميكروبية و موقع العينات. أقطار التثبيط المسجّلة تجاوزت غالباً تلك التي سببتها المضادات الحيوية و مضادات الفطريات المسوقة مسجلة مسجلة كامل نمو الفطريات. التركيزات المثبّطة الدنيا التي تمّ الحصول عليها تختلف من 25.6 إلى 100 ملغ/مل. كشف الفحص الكوميونباتي عن وجود بعض الفئات الفلافونويدية التي قد تكون المسؤولة عن هذه الأنشطة المضادة للميكروبات.

بدل إختبار محاصرة الجذر الحر (DPPH, I,I-diphenyl-2-picrylhydrazyle) أنّ الأنشطة المضادة للأكسدة للمستخلصات الفلافونويدية لأوراق نبته المريوة بثلاث مواقع أخذ العينات، تتغير بشكل ملحوظ حسب المستخلص الفلافونودي و تركيزه و حسب موقع أخذ العينات. سجلت مستخلصات الميتانول، الكلوروفورم و الأسيتات الإيثيل أعلى نسب تثبيط 50، تتراوح ما بين 33.7 إلى 773.65 ملغ/مل و غالباً ما تجاوزت القيم المسجلة من طرف الفينوليات المسوقة.

**الكلمات المفتاحية:** *Marrubium vulgare*، المركبات الفينولية، موقع أخذ العينات، الفصل، مختصر الاستشراب السائل الرقيق الإلجّاز، القدرة المضادة للميكروبات، النشاط المضاد للأكسدة.

## ABSTRACT

ECOBIOCHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PHENOLICS COMPOUNDS OF *MARRUBIUM VULGARE* L.

The current thesis focused on the eco-biochemical study of a medicinal plant called white horehound (*Marrubium vulgare* L.) originally from four localities in western Algeria. Our aims consisted on highlighting the effect of some environmental and experimental parameters on the quantitative and qualitative variations in phenolic compounds of white horehound, and on the antimicrobial and antioxidant potency.

The results showed that the experimental extraction conditions (nature of the organic solvent and concentration, extraction time and temperature) affected significantly the average concentrations of phenolic compounds dosed on the leaves of *M. vulgare*. The maximum average contents, of total phenols ( $293 \pm 14.60$  mg gallic acid equivalent/g), were obtained with methanol (60%) at 25°C during 180 min; flavonoids ( $79,52 \pm 0.55$  mg catechin equivalents/g) with methanol (80 %) at 20 °C during 450 min, and condensed tannins ( $28,15 \pm 0.80$  mg equivalent of catechin/g) with acetone (60 %) at 50 °C during 180 min. The Principal Components Analysis confirmed the positive effect of low temperatures on the extraction of total phenols and flavonoids, and the effect of high temperatures on the condensed tannins. The response surface methodology gave the theoretical values of extraction conditions and maximum levels of polyphenols close to those obtained experimentally.

The tested environmental parameters (sampling location, sampling month and season, altitude and exposure) had a significant effect on the average concentrations of phenolic compounds with higher values recorded in leaves and flowers compared to stems and roots. This could happen during spring and summer compared to autumn and winter. Coastal stations situated at low and medium altitudes showed higher concentrations compared to those of the Tessala mount located at high altitudes. Generally, the maximum concentrations of phenolic compounds are recorded in the southern slope. However, minimum concentrations are noted in the northern slope. The differences were probably due to the variations in climate between the different sampling stations. The factorial correspondence analysis established the effect of the vegetable organ and the sampling season on the polyphenols concentrations. Pearson correlation tests showed significant correlations between the various phenolic compounds assayed and the vegetables organs analyzed.

The separation of phenolic extracts of leaves of *M. vulgare* by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) showed that the phenolic acids and flavonoids vary significantly according to the sampling locality and to the harvest season. Generally, extracts obtained from Ain Skhoua and the forest of M'sila contained a high amount of phenolic compounds compared to those of Tessala and Beni Saf mounts. The two seasons of spring and summer were best represented in polyphenols unlike autumn and winter. With reference to the retention times of the standard phenolic tested, it appears the probable presence of some phenolic acids such as chlorogenic acid, ellagic acid, hydrocinnamic acid, tannic acid, ferulic acid, vanillin, and a few flavonoids represented by diosmin, catechin, naringenin, luteolin, kaempferol, nobiletin and diosmetin.

Preliminary test of the antimicrobial activity of flavonoic extracts of *M. vulgare* leaves of Tessala mount on four bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 1306 and *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) and two fungal strains (*Penicillium digitatum* ATCC 201167 and *Aspergillus niger* ATCC 16404), showed a remarkable antibacterial effect on gram+ bacteria and a moderate antifungal activity. Furthermore, the obtained antimicrobial potential of flavonoic extracts of leaves from the three sampling locations (mount of Tessala, forest of M'sila and Ain Skhoua) against three bacterial strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 and *Proteus mirabilis* ATCC 35659) and two fungal strains (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 and *Candida albicans* ATCC 10231), varied significantly. This depended on the tested flavonoic extract and its concentration, on the type of microbial strain and on the sampling locality. The inhibition zone diameters recorded often exceed those induced by antibiotics and antifungal commercialized even showing complete inhibition of fungal growth. The minimum inhibitory concentrations (MICs) obtained, vary between 6.25 and 100 µg/ml. The phytochemical screening revealed the existence of certain classes of flavonoids that might be responsible of this significant antimicrobial power.

Trapping test of free radicals, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), shows that the antioxidant activity of flavonoic extracts, obtained from *M. vulgare* leaves, coming from three sampling localities, varied significantly. This variation depended on the type of the flavonoic extracts tested, on its concentrations and on the sampling locality. The methanolic, chloroformic and ethyl acetate extracts recorded the highest percentages of inhibition unlike to the aqueous and hexanic extracts. The inhibitory concentrations 50 (IC<sub>50</sub>) ranged from 33.7 to 773.65 µg/ml and often exceed those recorded by phenolic standards.

**Keywords:** *Marrubium vulgare*, phenolic compounds, sampling locality, season, high performance liquid chromatography, antimicrobial power, antioxidant activity.

# **Introduction générale**

Pour soigner toutes sortes de maladies, l'homme a longtemps eu recours à des remèdes traditionnels à base de plantes (tisanes, poudres, décoctions), administrés par frictions, inhalations, cataplasmes, massages ou encore par voie orale (Lee, 2004). Actuellement, l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) estime qu'environ 80 % des habitants de la planète ont recours aux médicaments traditionnels à base de plantes en tant que soins de santé primaire (Fleurentin et Pelt, 1990). De nos jours, un grand nombre de composés issus de plantes sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel. De plus, des 25 composés pharmaceutiques les plus vendus au monde, 12 d'entre eux sont issus de produits naturels (Cragg *et al.*, 1999 ; Rollinger *et al.*, 2004). Apparemment, cela signifie que le nombre de médicaments issus de produits naturels est proportionnellement supérieur à ceux issus de la chimie combinatoire où plus de 10 000 molécules doivent être synthétisées puis testées afin de mener au développement d'un seul médicament (Adams et Brantner, 2004). Par conséquent, les quelques 250 000 à 300 000 espèces inventoriées de plantes que l'on trouve sur terre, seulement 5 % à 15 % ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives, représentant un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels (Balandrin, 1993 ; Cutler et Cutler, 2000 ; Larsson *et al.*, 2007). Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (Rollinger *et al.*, 2004).

La région méditerranéenne abrite une diversité biologique de première importance. Ainsi en Afrique du nord, les espèces de la flore spontanée, constituent une part non négligeable des ressources génétiques locales à valeur pastorale, fourragère, alimentaire, aromatique et/ou médicinale (Abdelguerfi et Laouar, 1999 ; Ohba et Amirouche, 2003). Divers travaux ont attiré l'attention des biologistes et des généticiens sur l'intérêt que présentent les forêts méditerranéennes, du point de vue de leur richesse spécifique végétale, autant au niveau des essences forestières qui les constituent, que des espèces herbacées qui participent au cortège des habitats qu'elles individualisent (Gomez-Campo, 1985). Ayant une position géographique privilégiée, l'Algérie possède une flore extrêmement riche et variée représentée par environ 3000 plantes vasculaires inventoriées, réparties en 123 familles botaniques (Tlili-Ait Kaki *et al.*, 2013). À cette richesse spécifique est associée une originalité sur le plan systématique (nombreuses plantes endémiques), sur le plan phytochimique (spécificité des substances biosynthétisées) et sur le plan pharmacologique. Cette richesse et cette originalité font que l'étude de la flore Algérienne présente un intérêt scientifique « fondamental » pour la connaissance et le savoir dans le domaine de l'ethnobotanique, de la pharmacopée traditionnelle mais également un intérêt scientifique « appliqué » dans le domaine de la valorisation des substances naturelles.

Pour mieux connaître le patrimoine des espèces végétales spontanées utilisées en médecine traditionnelle Algérienne, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante

caractéristique de notre région, le marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.), une herbacée vivace qui pousse presque dans toutes les régions méditerranéennes (Quézel et Santa, 1963). Cette plante est traditionnellement utilisée dans de nombreux pays au monde pour le traitement de divers maux : sifflements respiratoires, maladies urinaires, otites et ophtalmies (Schlemper *et al.*, 1996). En Algérie, le marrube blanc est utilisé en médecine folklorique contre la diarrhée, le diabète, le rhumatisme et le rhume. Sur le plan chimique, il est riche en diterpènes, en phenyléthanoïdes glucosidiques, en tannins, en saponins et en flavonoïdes (Weel *et al.*, 1999) ; on lui reconnaît des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, hypoglycémiantes et antidiabétiques, analgésiques et anti-inflammatoires (Roman *et al.*, 1992 ; De Souza *et al.*, 1998 ; Zarai *et al.*, 2011). Par ailleurs, et en raison de sa distribution importante et sa présentation comme étant une espèce assez commune du nord Algérien, cette plante a été négligée par rapport aux autres espèces beaucoup moins fréquentes appartenant à la famille des Lamiaceae comme le thym et la sauge par exemple.

Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme central. Ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace à la tolérance des végétaux aux stress variés (attaques de pathogènes d'insectes, sécheresse et lumière ultraviolette...). Certains de ces composés ont aussi un effet pharmacologique chez l'humain et peuvent donc servir de remèdes, tout dépendant de la dose utilisée (Jones *et al.*, 2000 ; Moerman et Estabrook, 2003). Les composés phénoliques constituent l'une des principales classes des métabolites secondaires qui se localisent généralement au niveau des différentes parties de la plante. Ces composés suscitent un grand intérêt de par leurs nombreux effets bénéfiques pour la santé : prévention et traitement de certains cancers, traitement des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives (Gerber et Berta-Vanrullen, 2006 ; Perez-Vezcaino *et al.*, 2006 ; Kenny *et al.*, 2007 ; Lainé *et al.* 2007 ; Terra *et al.*, 2007). Certains d'autre eux sont également utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaires et cosmétiques (Mazur *et al.*, 1998 ; Rechner *et al.*, 2002). Les polyphénols sont communément subdivisés en tanins, lignines, flavonoïdes et anthocyanes qui dérivent tous de l'assemblage d'unités phénoliques (Macheix *et al.*, 2005). Ces dernières années, nous avons assisté à un grand regain des phytothérapeutes pour les produits riches en polyphénols, et principalement en flavonoïdes. Ces derniers ont d'ailleurs montré qu'ils avaient des propriétés biologiques très importantes et très vastes. Des flavonoïdes tels que la rutine, la disomine, la lutéoline et la quercétine sont aujourd'hui de plus en plus commercialisés pour diverses applications médicamenteuses, alimentaires et cosmétologiques (Galvez *et al.*, 1993 ; Goodarzi *et al.*, 2006 ; Tomofuji *et al.* 2009) .

Dans le domaine bactériologique, la découverte de nouvelles substances antimicrobiennes est le but de l'homme depuis toujours, car la cause principale des décès autrefois était les maladies infectieuses, malgré les excellentes défenses contre l'infection dont est pourvu le corps humain (Stanier *et al.*, 1966). Lorsque la pénicillothérapie fut pratiquée pour la première fois, l'homme a cru avoir gagné la bataille contre les bactéries pathogènes. Cependant avec l'apparition des bactéries pénicillinorésistantes il a eu l'impression de régression, et avec l'extraction et la synthèse de nouveaux antibiotiques assez puissants, la peur se dispersa devant la volonté humaine de vaincre (Hamza, 1993). Mais comme tout médicament, les antibiotiques ne sont pas totalement inoffensifs pour l'organisme et peuvent provoquer, en plus de leur action antibactérienne, un certain nombre d'effets indésirables (Berche *et al.*, 1989). Ces antibiotiques, qui ont sauvé des vies et soulagé des souffrances de millions de personnes durant des années et jusqu'à ce jour, se trouvent menacés par l'apparition et la propagation des germes multirésistants. Pour cela, et face à l'émergence grandissante à l'échelle mondiale du phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques, la découverte de nouveaux composés antibiotiques d'origine végétale est devenue un objectif primordial (Brown et Wright, 2005).

Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (Mario et Andreas, 2008). Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires. Quel que soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les protéines, les glucides et les lipides (Galanis *et al.*, 2008). En effet, l'oxydation des lipides dans les produits alimentaires induit non seulement une diminution de la valeur nutritive de l'aliment, mais aussi des effets reconnus nuisibles pour le consommateur et qui peuvent être associés à des risques de cancer chez l'homme (Ushio-Fukai et Nakamura, 2008). À cet effet, l'utilisation des antioxydants synthétiques comme aditifs alimentaires est devenue essentielle pour la qualité et la sécurité de l'aliment. Paradoxalement, les risques et les effets néfastes de ces antioxydants ont été questionnés au cours des dernière années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est apparente. En s'appuyant sur cette vision, un renouveau de la phytothérapie vers cette vague verte qui produit une foule d'antioxydants afin de contrer et piéger ces oxydants. En effet, les antioxydants naturels font l'objet de nombreuses recherches et une nouvelle haleine vers l'exploitation des métabolites secondaires généralement et les polyphénols particulièrement tant dans la santé et vis-à-vis des maladies pernicieuses que dans l'industrie agro-alimentaire.

Aujourd'hui, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit de nombreux chercheurs au monde à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. À cet effet, les substances naturelles douées surtout d'activité antioxydante et antimicrobienne présentent un intérêt socioéconomique, peut être sans équivoque dans le domaine de la recherche biopharmacologique. Plusieurs laboratoires à travers le monde se sont orientés vers ce type de recherche des substances bioactives et leur valorisation, c'est le cas de notre laboratoire de recherche de biodiversité végétale : conservation et valorisation. Dans ce contexte, s'inscrit l'objectif principal de cette thèse qui consiste à rechercher dans les feuilles de *M. vulgare* qui pousse à l'état spontané en Oranie Algérien, des extraits flavonoïques susceptibles d'une part de bloquer l'action des espèces réactives oxygénées et d'inhiber la croissance des espèces microbiennes pathogènes d'autre part. Comme un second objectif, nous avons tenté d'étudier l'influence de la localité d'échantillonnage sur les composés phénoliques de *M. vulgare*. En effet, cette plante a été étudiée presque dans tous ses aspects tant biochimiques que pharmacologiques ; mais la variation quantitative et qualitative de ces composés phénoliques ainsi que de leurs activités antimicrobiennes et antioxydantes en fonction de la localité d'échantillonnage restent encore peu connues en Algérie. Cette étude présente donc une certaine originalité à caractère éco-biochimique qui fait appel notamment à des variantes écologiques majeures : le bioclimat, l'altitude et la saison de prélèvement. De ce fait, et pour mieux comprendre la variation des composés phénoliques en fonction des paramètres écologiques cités précédemment, nous avons jugé nécessaire sa valorisation éco-biochimique, permettant une meilleure exploitation de cette plante et de créer des stratégies innovantes pour une gestion durable de la flore algérienne.

Cette thèse est subdivisée en deux grandes parties : bibliographique et expérimentale. Dans un premier temps, notre travail englobe une synthèse bibliographique portant sur trois chapitres :

- chapitre I : marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés. Dans ce chapitre sont représentées les plus récentes connaissances botaniques, phytochimiques et pharmacologiques du marrube blanc,
- chapitre II : les composés phénoliques végétaux : flavonoïdes et tanins. Ce chapitre est consacré à l'étude de deux classes de polyphénols (flavonoïdes et tanins) du point de vue classification, structure, propriétés pharmacologiques et facteurs influençant leur synthèse,
- chapitre III : rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante. Dans la présente partie, nous abordons quelques généralités sur les activités antimicrobienne et antioxydante ainsi que leurs différentes techniques d'évaluation.

La partie expérimentale est subdivisée en trois chapitres :

- chapitre I : présentation des sites d'études. Quatre sites d'études appartenant à la région oranaise sont étudiés (mont de Tessala, forêt domaniale de M'sila, Béni Saf et Aïn Skhouna) du point de vue pédologique, climatique et formations végétales,
- chapitre II : matériels biologiques et méthodes d'étude, dans lequel nous développons les matériels et méthodes utilisés pour la réalisation de cette en vue d'atteindre les objectifs fixés, à savoir :
  - une optimisation des conditions expérimentales d'extraction (nature du solvant organique et sa concentration, temps et température d'extraction) de trois types de composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) à partir des feuilles de *Marrubium vulgare* en provenance du mont de Tessala,
  - la variation quantitative des composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) dans les différents organes (feuilles, tiges, racines et fleurs) de *M. vulgare* en fonction de quelques paramètres environnementaux (localité d'échantillonnage, saison et mois de prélèvement, altitude et exposition),
  - la caractérisation qualitative des composés phénoliques (acides phénoliques et flavonoïdes) des feuilles de *M. vulgare* en provenance de quatre localités d'échantillonnage (mont de Tessala, forêt domaniale de M'sila, Béni Saf et Aïn Skhouna), et ceci par une chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée,
  - la variation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits flavonoïques des feuilles de *M. vulgare* en provenance de trois localités d'échantillonnage (mont de Tessala, forêt domaniale de M'sila et Aïn Skhouna).
- chapitre III : consacré aux commentaires et discussion des résultats obtenus.

Signalons enfin que les différentes études expérimentales de cette thèse sont réalisées dans les laboratoires de recherche suivants :

- laboratoire de biodiversité végétale : conservation et valorisation, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbès, Algérie,
- laboratoire de microbiologie, faculté de médecine, université de Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes, Algérie,
- laboratoire de génétique et biophysique des plantes (L.G.B.P.), université Aix-Marseille, France.

# **Synthèse bibliographique**

# **CHAPITRE I : Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés**

## **CHAPITRE I** Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

### **I.1. Introduction**

Les Labiées ou Lamiacées constituent une famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses et comprennent selon les auteurs, de 233 à 263 genres (Heywood *et al.*, 2007) et de 6900 à 7200 espèces (Grayer *et al.*, 2003 ; Heywood *et al.*, 2007), qui se répartissent aussi bien dans les zones tropicales que dans les zones tempérées du monde. La plus grande diversité est rencontrée selon cet ordre: le bassin méditerranéen, l'Asie centrale, le continent Américain, les Iles du pacifique, l'Afrique équatoriale et la Chine. C'est une famille très importante en Algérie, représentée par 28 genres et 146 espèces.

Parmi les plus importants genres de cette famille, le genre *Marrubium* qui comprend environ 75 espèces répandues dans une grande partie du globe : l'Europe, la Méditerranée et l'Asie ; parmi elles, 50 espèces poussent sur le pourtour de la Méditerranée (Greuter *et al.*, 1986). En Algérie, il existe 7 espèces du genre *Marrubium* (Quezel, 1963) : *Marrubium spinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides*, *Marrubium willkommii* et *Marrubium deserti* et *Marrubium vulgare* qui fait l'objet de notre travail.

### **I.2. Aspects historiques**

Le mot « marrube » trouve son origine dans le mot hébreux « marrob », *mar* signifiant amer et *rob* signifiant suc. « Marrob » désigne une des plantes que les juifs utilisaient durant les fêtes de Pâques. Toutefois, selon d'autres auteurs, le nom latin « *Marrubium* » serait dérivé de *Maria urbs*, une ville antique Romaine.

Dans l'Égypte Ancienne, le marrube blanc était déjà reconnu pour ses propriétés apaisantes, contre la toux (propriétés expectorantes et mucolytiques) et dans le traitement des affections chroniques du foie. Les prêtres Egyptiens l'utilisaient également comme insectifuge et comme antidote contre plusieurs poisons, et lui donnaient le nom de « graine d'Horus » (Ducros, 1930).

Les Grecs de l'Antiquité l'utilisaient contre les morsures de chiens enragés, il était connu sous le nom de « prasion ». Le médecin Grec Dioscoride (40-90 apr. J.C.) le préconisait en décoction pour soigner la tuberculose, l'asthme et la toux. Il était déjà considéré comme le remède spécifique des affections de l'appareil respiratoire dans l'Égypte ancienne et la Grèce antique.

Pline l'Ancien (23-79 apr. J.C.) l'indique contre les morsures de serpents et contre la plupart des poisons et conseille son utilisation dans les affections de la poitrine au dernier degré et contre les morsures de chiens.

## **CHAPITRE I** Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

Au I<sup>er</sup> siècle, le médecin romain Aulus Cornelius Celsus indique que les propriétés antiseptiques de cette plante peuvent être utilisées pour traiter les affections respiratoires. Il recommande l'utilisation du « jus de marrube ».

Lucius Junius Moderatus Columella, agronome Romain de milieu du I<sup>er</sup> siècle expliquait comment utiliser cette plante chez les animaux de ferme pour traiter les ulcères, vers et croûtes.

Au II<sup>ème</sup> siècle, Galien recommandait son utilisation pour traiter la toux et les maladies respiratoires.

John Gérard, herboriste élisabéthain anglais du XVI<sup>e</sup> siècle, recommandait dans son ouvrage paru en 1597 sur l'histoire des plantes et de leurs utilisations « Herbal or General History of Plants », son usage sous la forme de sirop pour traiter les sifflements respiratoires et comme antidote de certains poisons.

Nicholas Culpeper, médecin herboriste anglais du XVII<sup>e</sup> siècle, préconisait son utilisation, dans son ouvrage de 1652 intitulé « The English Physitian », pour évacuer la toux muqueuse, traiter le rhume chez les personnes âgées, et plus particulièrement les personnes ayant le souffle court.

Jean-Emmanuel Gilibert (1741-1814), homme politique et botaniste Français, disait du marrube blanc qu'il s'agissait d'une des meilleurs plantes d'Europe.

En médecine ayurvédique (Inde), chez les aborigènes d'Australie et Amérindiens d'Amérique du Nord, *Marrubium vulgare* servait à traiter les infections des voies respiratoires.

Jusqu'en 1900, la pharmacopée des États-Unis reconnaissait l'usage du marrube pour traiter les infections des voies respiratoires.

En Europe, la plante est toujours inscrite dans les pharmacopées nationales. Ainsi, un grand nombre de sirops et de pastilles en renferment.

### **I.3. Description morpho-anatomique et botanique**

*Marrubium vulgare* L. est une plante herbacée vivace de 30 à 80 cm de hauteur (Pl. I, Fig. A), d'aspect blanchâtre ressemblant légèrement à la menthe, à odeur forte, pénétrante, agréable, légèrement musquée, sa saveur est à la fois chaude et amère (Quezel et Santa, 1963 ; Kaabeche, 1990 ; Bellakhdar, 1997).

#### **I.3.1. Les feuilles**

Les feuilles ont toute une longueur de 2 à 5 cm (Pl. I, Fig. C et D), elles sont opposées et sont pétiolées. Leur forme générale est ovale ou arrondie, dite « suborbiculaires ». Elles sont feutrées, cotonneuses et de couleur blanchâtre à leur face inférieure (recouvertes d'un duvet blanc abondant) ; leur face supérieure

## **CHAPITRE I** Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

est de couleur vert clair ; elles sont gaufrées, leur nervation est réticulée et leur bordure est crénelée. L'étude anatomique de la nervure principale (Pl. II, Fig. A et B) de la feuille de *Marrubium vulgare* L. montre qu'elle est constituée de l'extérieur vers l'intérieur d'un épiderme supérieur (Eps) à cuticule épaisse (Cu), des coussinets de collenchyme (Col) sous-épidermique, un parenchyme palissadique (Pp) à une ou à deux assises, un parenchyme lacuneux (Pl) à grosses cellules arrondies, tissus conducteurs (Pl. II, Fig. C): xylème (Xyl) et phloème (Phl) séparés par un cambium (Ca), et un épiderme inférieur (Epi) caractérisé par la présence des stomates (Sto) et portant des trichomes glandulaires (Tr) et des poils sécréteurs (Poi).

Le limbe est fortement ridé en réseau, irrégulièrement crénelé, à contour largement ovale ou arrondi, se rétrécissant en coin à sa base, velu, cotonneux et blanchâtre sur la face inférieure, poilu mais vert (rarement blanchâtre) sur la face supérieure. L'anatomie du limbe (Pl. II, Fig. D et E) montre qu'il est de même structure que la nervure principale mais avec des parenchymes palissadiques (Pp) et lacuneux (Pl) plus abondants et un épiderme inférieur (Epi) contenant un nombre beaucoup plus élevé de trichomes glandulaires (Tr) et poils sécréteurs (Poi).

### **I.3.2. Les tiges**

Les tiges (Pl. I, Fig. E) sont carrées comme beaucoup d'autres lamiacées, elles mesurent 30 à 80 cm de long, elles sont cotonneuses, très feuillées épaisses et rameuses à la base. Du point de vue, anatomique (Pl. III, Fig. A), la tige a une section nettement tétragone formé par : un épiderme (Ep) à cuticule (Cu) mince (Pl. III, Fig. B) portant des trichomes glandulaires (Tr) au nombre nettement plus élevé que les poils sécréteurs (Poi), un collenchyme (Col) abondant sous forme d'îlots localisé aux angles caulinaires (Pl. III, Fig. E), un parenchyme cortical (Pc) localisés sur les faces, un endoderme (En) bien différencié formant deux à trois assises de grosses cellules, un système conducteur, xylème (Xyl) et phloème (Phl) formant un anneau complet séparé par un cambium (Ca) avec présence des fibres phloémiennes (Fp) (Pl. III, Fig. C et D) et un parenchyme médullaire (Pm) très développé occupant le centre de la tige (Pl. III, Fig. B et C).

### **I.3.3. Les racines**

Les racines (Pl. I, Fig. F) sont dures, ligneuses, pivotantes ramifiées ayant de nombreuses racines latérales fibreuses. L'anatomie de la racine (Pl. IV, Fig. A) montre qu'elle est formée d'un épiderme (Ep) à cuticule (Cu) épaisse (Pl. IV, Fig. C), un parenchyme cortical (Pc) formé par de grandes cellules, un endoderme (En) formé par des cellules étroitement liées, un péricycle (Pe); vaisseaux conducteurs : xylème (Xyl) constitué par des cellules de faibles diamètres (protoxylème : Pr) et d'autres de grandes tailles

## **CHAPITRE I** Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

(métaxylème : Me) (Pl. IV, Fig. D), un phloème (Phl), un cambium (Ca) localisé entre les vaisseaux conducteurs, des fibres phloémiennes (Fp) (Pl. IV, Fig. E et F) et une moelle centrale (Mo) occupant le centre (Pl. IV, Fig. B).

### **I.3.4. Fleurs et calices**

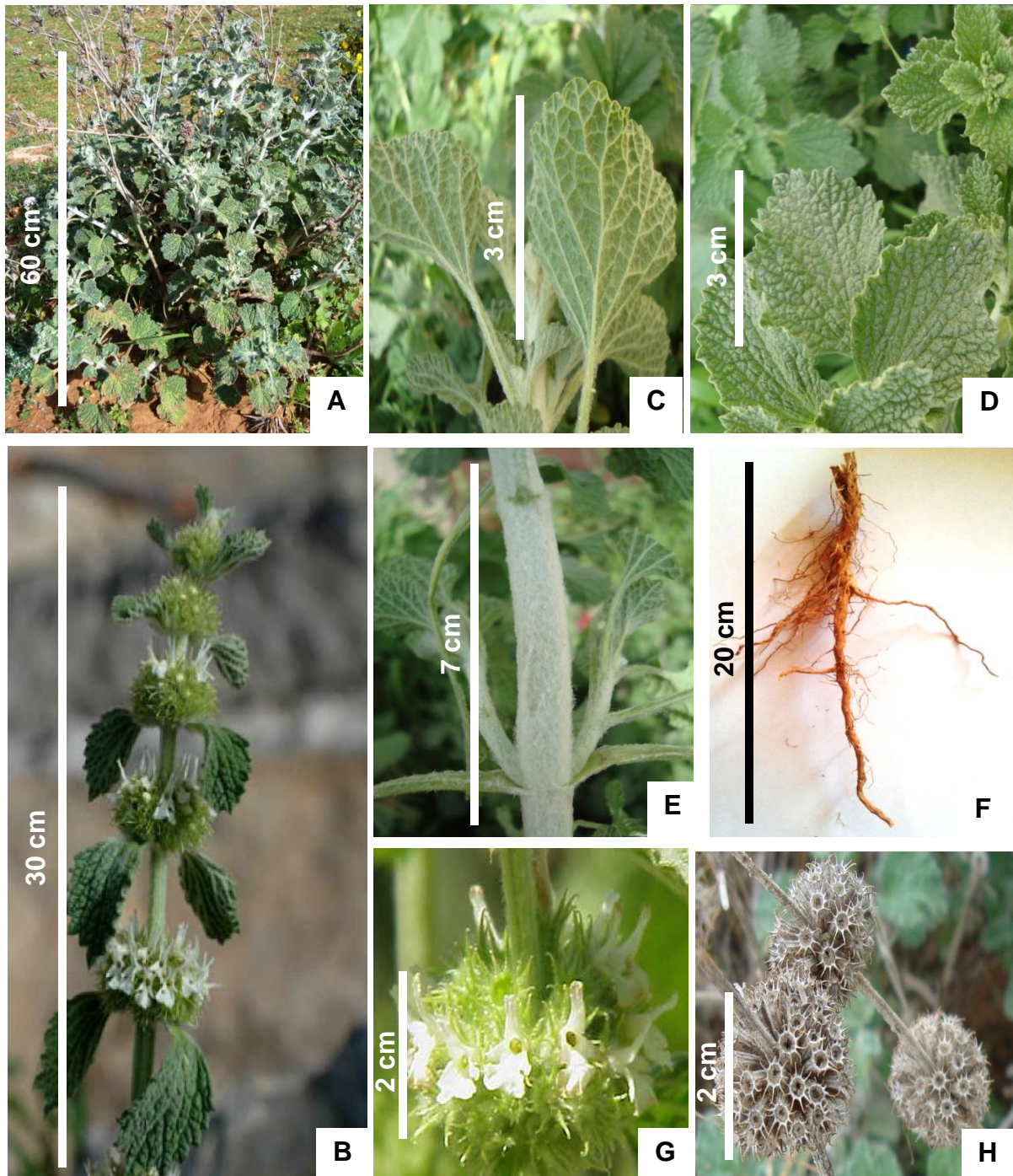
Les fleurs (Pl. I, Fig. G) sont blanches comme beaucoup d'autres lamiacées, relativement petites, apparaissent du mois de mai jusqu'au mois de septembre, et parfois encore en hiver. Les petites bractées qui accompagnent les fleurs sont très étroites et crochues dans leurs parties supérieures. L'inflorescence est faite en glomérules compacts verticillés (disposés en anneau au niveau de la tige).

Le calice (Pl. I, Fig. H) est velu, cotonneux, avec un anneau de poils vers l'intérieur en haut du tube, il est terminé par 6 à 10 dents crochues. La corolle est blanche, bilabée, couverte de petits poils à l'extérieur, présente un tube courbé, resserré vers le milieu et ayant à ce niveau, à l'intérieur, un anneau de poils, qui est disposé transversalement. L'androcée est à quatre étamines, renfermées dans le tube de la corolle.

La récolte des extrémités fleuries (tige, feuille et fleur au sommet de la plante) se fait en juillet ; on vend généralement soit ses sommités fleuries en petits bouquets, soit seulement leurs feuilles mondées.

**CHAPITRE I** Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

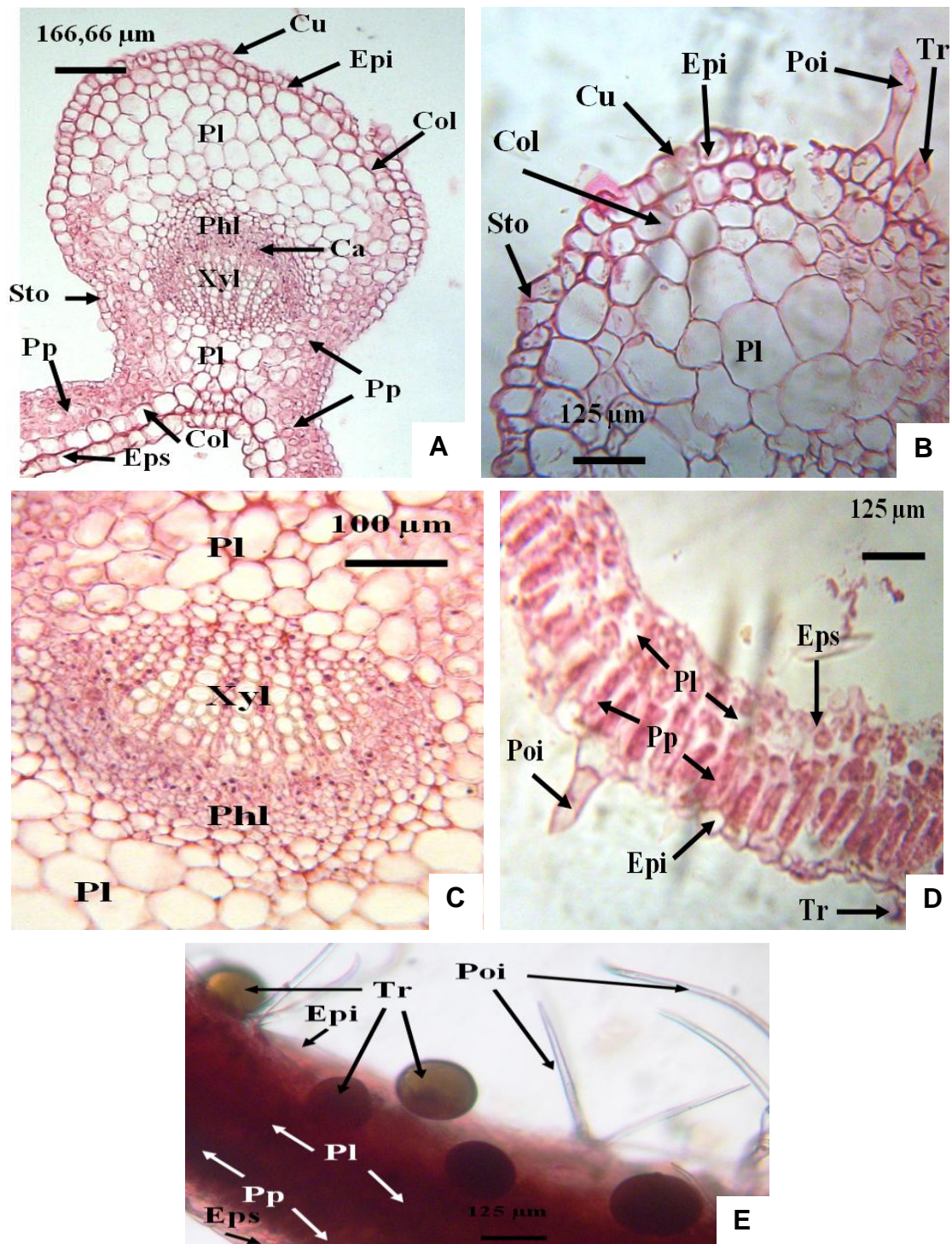
**Planche I** : Différentes parties de *Marrubium vulgare* L. (Bouterfas, 2011)



**A** : Touffe ; **B** : Branche ; **C** : Faces inférieures des feuilles ; **D** : Faces supérieures des feuilles ; **E** : Tige ; **F** : Racine ; **G** : Calices ; **H** : Fleurs.

**CHAPITRE I** Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

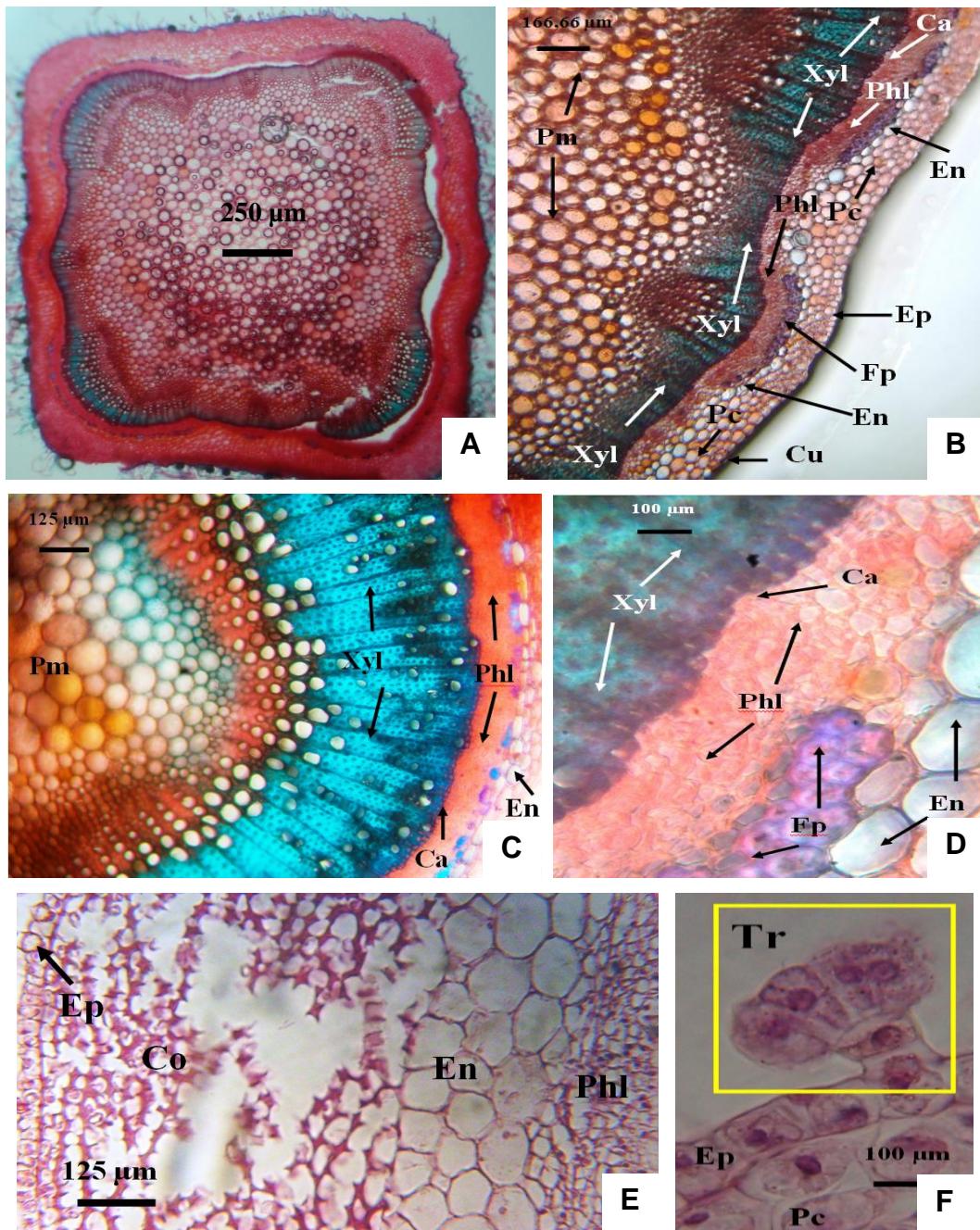
**Planche II** : Coupes transversales au niveau d'une feuille de *Marrubium vulgare* L.  
(Bouterfas, 2011)



**A** : Nervure principale colorée à l'hématoxiline-éosine ; **B** : Partie supérieure de la nervure principale (mise en évidence des stomates) colorée à l'hématoxiline-éosine ; **C** : Système conducteur de la nervure principale coloré à l'hématoxiline-éosine ; **D** : Portion du limbe colorée à l'hématoxiline-éosine ; **E** : Portion du limbe colorée par combinaison vert méthyle-rouge Congo (mise en évidence des poils sécréteurs et des trichomes glandulaires).

**CHAPITRE I** Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

**Planche III** : Coupes transversales au niveau d'une tige de *Marrubium vulgare* L.  
(Bouterfas, 2011)

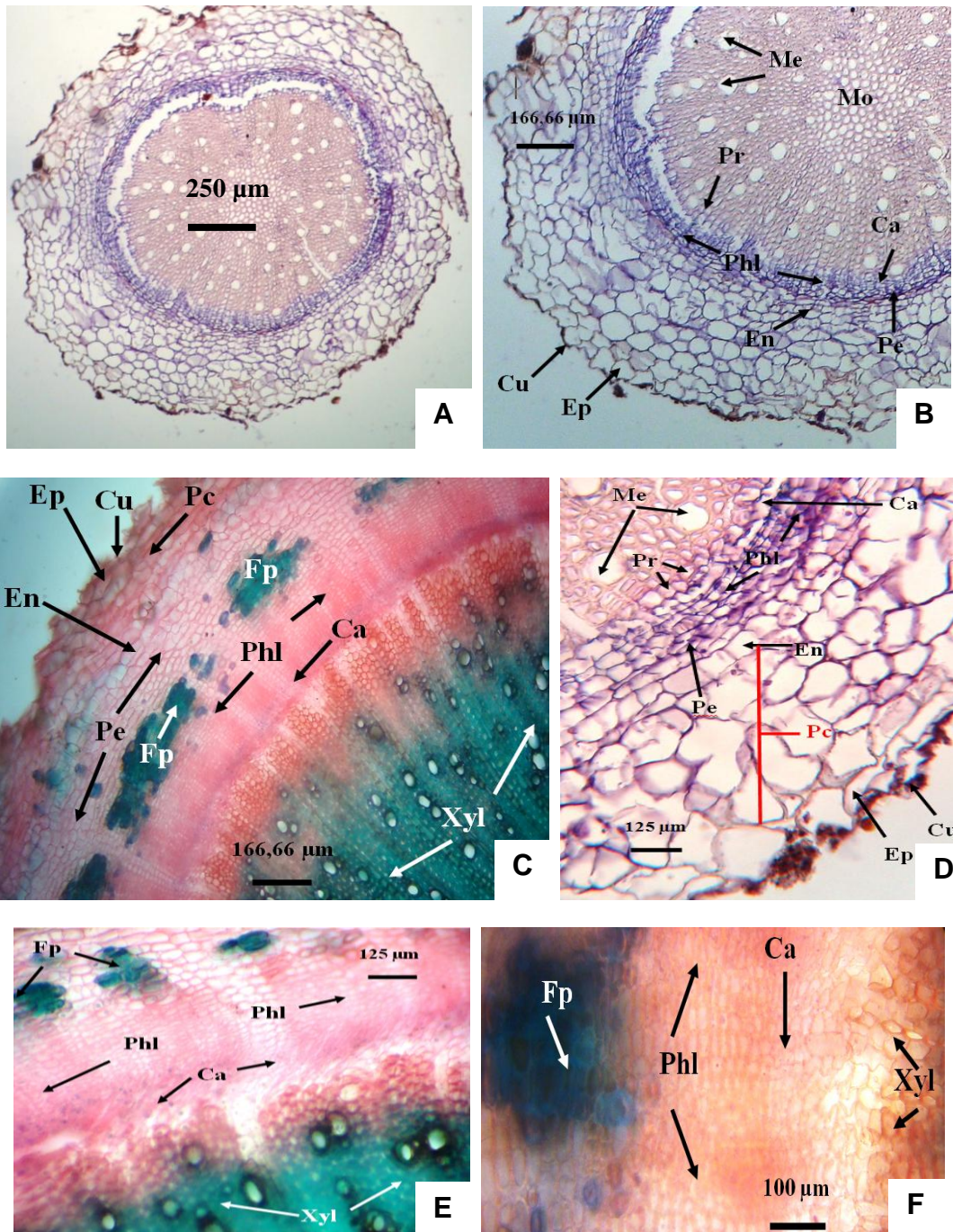


**A** : Vue générale d'une tige colorée par combinaison vert méthyle-rouge Congo ; **B** : Détail d'un angle coloré par combinaison vert méthyle-rouge Congo ; **C** : Mise en évidence du système conducteur coloré par combinaison vert méthyle-rouge Congo ; **D** : Détail du système conducteur coloré par combinaison vert méthyle-rouge Congo, **E** : Mise évidence de l'épiderme et du collenchyme colorés à l'hématoxiline-éosine ; **F** : Mise en évidence d'un trichome glandulaire coloré à l'hématoxiline-éosine.

# CHAPITRE I Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

## Planche IV : Coupes transversales au niveau d'une racine de *Marrubium vulgare* L.

(Bouterfas, 2011)



**A** : Vue générale d'une racine colorée à l'hématoxiline-éosine ; **B** : Détail d'une face colorée à l'hématoxiline-éosine ; **C** : Détail de la partie supérieure colorée par combinaison vert méthyle-rouge Congo ; **D** : Détail de la partie inférieure colorée à l'hématoxiline-éosine, **E** : Mise en évidence du système conducteur coloré par combinaison vert méthyle-rouge Congo ; **F** : Détail du système conducteur coloré par combinaison vert méthyle-rouge Congo.

## CHAPITRE I Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

### I.4. Classifications systématiques

#### I.4.1. Ancienne Classification

Parmi les classifications basées essentiellement sur des critères morphologiques et anatomiques, celle de Cronquist (1988) est la plus utilisée. Cet auteur place *Marrubium vulgare* dans le taxon suivant (Tab. 1) :

**Tableau 1** : Place de *Marrubium vulgare* L. dans la classification classique de Cronquist (1988).

<b>Classification classique (Cronquist, 1988)</b>	
Domaine	Eucaryotes
Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Marrubium</i>
Espèce	<i>Marrubium vulgare</i> Linné

#### I.4.2. Classification récente

Cependant, la classification classique a été révisée en 2003 par l'APG II « *Angiosperm Phylogeny Group II* ». Cela traduit les efforts faits en systématiques pour tenir compte des dernières avancées en matière de biologie moléculaire. Selon cette classification, *Marrubium vulgare* L. est classé dans le taxon suivant (Tab. 2) :

**Tableau 2** : Place de *Marrubium vulgare* L. dans la classification phylogénétique APG II (2003)

<b>Classification phylogénétique (APG II, 2003)</b>	
Domaine	Eucaryotes
Règne	Plantae
Clade	Angiospermes
Clade	Eudicots
Clade	Core eudicots
Clade	Astéridées
Clade	Astéridées II
Super-ordre	Lamianae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Marrubium</i>
Espèce	<i>Marrubium vulgare</i> Linné

## CHAPITRE I Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

### I.5. Noms vernaculaires et synonymes taxonomiques

*Marrubium vulgare* L. a beaucoup de noms vernaculaires et de noms arabes. En Algérie, il est connu par les noms de : *Marriout*, *Marriwa*, *Marriouat el Kelb*, *Achbet el Kelb*, *Frasioum*, *Oum er roubia* (Quezel et Santa, 1963 ; Merad, 1973), en petite Kabylie on la nomme *Berriut* et en grande Kabylie, *Meriut* (Brette, 1985). Au Maroc c'est *Merrîwut* (Bellakhdar, 1997), en Tunisie, *Marroubia* (Boukef, 1986). En France, cette plante est connue sous les noms communs de : Marrube blanc, Marrube commun, Marrube vulgaire, Marrube des champs, Bonhomme, grand Bonhomme. En Angleterre : White Horehound ou Wild Horehound. En Allemagne : Andorn, Weisser Andorn, Gottvergessen, Mauerandorn. En Espagne : Marrubio et en Italie : Marrobio.

À cette plante se réfèrent un grand nombre de synonymes taxonomiques. Nous pouvons citer : *Marrubium vaillantii* Coss. et Germ., *Marrubium lanatum* Benth., *Marrubium kusnetzowii* Popov., *Marrubium germanicum* Schrank., *Marrubium ballotoides* Boiss. et Balansa., *Marrubium apulum* Ten., *Marrubium album* St.-Lag., *Prasium marrubium* E.H.L.Krause (I.N.P.N, 2013).

### I.6. Origine, habitat et écologie

Originnaire d'Eurasie, cette plante est cosmopolite, elle est répartie dans toute l'aire méditerranéenne surtout en Afrique du Nord (Quezel et Santa, 1963 ; Bellakhdar, 1997): en Egypte (Ducros, 1930), en Libye (Kotob Hussein, 1979), en Tunisie (Le Floc'h, 1983) et au Maroc (Bellakhdar, 1997).

Le *Marrubium vulgare* L. pousse presque dans toute l'Europe surtout dans ses régions méditerranéennes et dans l'Europe méridionale et médiane (Quezel et Santa, 1963 ; Bellakhdar, 1997), au Centre et Sud-ouest de l'Asie. En France, cette plante est forte commune, elle est présente dans la plupart des départements et plus particulièrement dans le midi.

Cette plante s'est depuis longtemps répandue un peu partout dans l'hémisphère Nord, notamment aux Etats-Unis et au Canada où elle est naturalisée (Bonnier, 1934).

Comme habitat, *Marrubium vulgare* L. préfère les décombres, les haies, les clôtures et les terrains vagues. Cette plante est forte commune des lieux incultes, les bords des chemins, dans les fossés, les pâturages et les voisinages des habitations (Bellakhdar, 1997).

En Algérie, elle est très commune presque dans tout le pays surtout dans les stations chaudes et ensoleillées (Quezel et Santa, 1963). Elle est présente au niveau des 15 secteurs phytogéographiques de l'Algérie du Nord, tandis qu'elle est quasiment absente au Sud (Leutrech-Belarouci *et al.*, 2009).

La caractérisation de l'habitat de *Marrubium vulgare* dans le mont de Tessala (Algérie Nord Occidentale) a fait ressortir que cette plante est associée à des garrigues à

## **CHAPITRE I** Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

calycotome, à Ampelodesma de Mauritanie (diss), à palmier doum et à asphodèle. Il se développe sur des terrains faiblement pentus, à des altitudes comprises entre 600 et 900 m, avec une importante répartition dans le versant sud par rapport au versant nord, et dans des basses altitudes par rapport aux fortes. En ce qui concerne les paramètres édaphiques, *Marrubium vulgare* est lié à des sols légers, moyennement à fortement riches en matière organique, peu humides, à pH légèrement alcalin, fortement calcaires (Bouterfas *et al.*, 2013a).

### **I.7. Usages traditionnels décrits dans le monde Maghrébin**

#### **I.7.1. En Algérie**

La plante était employée en usage interne comme remède tonique et comme fébrifuge (Bellakhdar, 1997). Aussi, elle était employée comme remède pectorale (calmant la toux et les irritations pharyngées, ou favorisant l'expulsion des sécrétions bronchiques ou pharyngées) (Bellakhdar, 1997).

#### **I.7.2. En Tunisie**

La plante entière est utilisée en usage interne sous forme de décocté dans les maladies gastriques, pour le traitement des hémorroïdes, comme antiseptique pulmonaire, dans le diabète, comme analeptique cardiaque et pour purifier le lait des femmes qui allaitent (Boukef, 1986).

Dans le borj sahélien ou les îles Kerkenna, *Marrubium vulgare* L. frais est utilisé par voie aérosol : son suc utilisé au moyen d'inhalation contre les rhumes de cerveaux (Ben Ali et Louis, 1946).

Les feuilles de *Marrubium vulgare* L. étaient employées au borj sahélien ou les îles Kerkenna, sous forme de décocté comme remède souverain spécifique de certaines maladies urinaires (Ben Ali et Louis, 1946) et en bains de bouche contre les caries dentaires et dans le traitement des brûlures et de la furonculose (Boukef, 1986).

Les fleurs sont employées en usage externe contre les verrues (Boukef, 1986). Les racines sont employées en usage externe, lavées et mélangées avec du « smen » (beurre cuit), recommandées pour traiter le trachome (Boukef, 1986).

#### **I.7.3. Au Maroc**

La plante est utilisée comme remède tonique et stimulant (pour les malades alités), contre la jaunisse, comme antidiarrhéique et antityphoïdique, comme remède expectorant (Bellakhdar, 1997).

Elle était employée à Casablanca par les accoucheuses musulmanes sous forme de décocté, remède réputé pour réveiller le « *raged* » (fœtus endormis dans le ventre de la mère) (Mathieu et Manneville, 1952).

## **CHAPITRE I** Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

Elle est utilisée aussi en usage externe sous forme de gouttes instillées dans les oreilles comme remède contre les otites, dans les yeux comme remède contre les ophtalmies (Gattefossé, 1957).

### **I.8. Composition chimique**

Des investigations chimiques préliminaires réalisées sur l'espèce *Marrubium vulgare* par Kurbatova *et al.* (2003), Warda *et al.* (2009) et Moussaid *et al.* (2012) ont pu déterminer la présence de quelques métabolites primaires (polysaccharides, acides aminés) et secondaires (tanins, flavonoïdes, saponines, coumarines et alcaloïdes).

Les principaux constituants chimiques trouvés dans le genre *marrubium* en générale et l'espèce *Marrubium vulgare* L. en particulier sont : les déterpénoides, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes et les huiles essentielles.

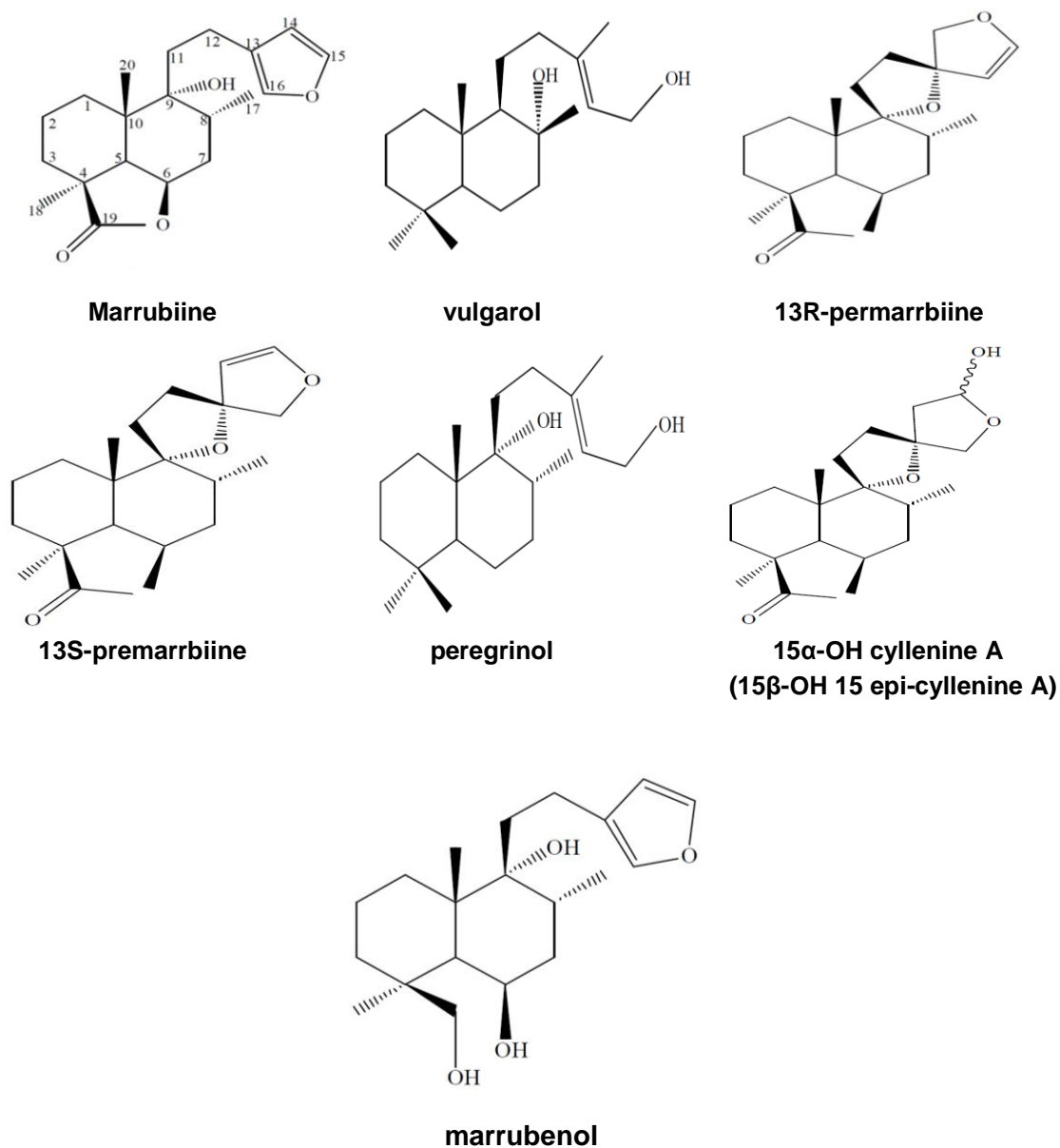
#### **I.8.1. Les diterpènes**

Plusieurs auteurs ont démontré que la marrubiine est le plus actif composé chimique dans l'espèce *Marrubium vulgare*. Ce diterpène labdane a été identifié dans l'extrait aqueux des feuilles (El Bardai *et al.*, 2003), l'extrait hydro-alcoolique des parties aériennes (Stulzer *et al.*, 2003) et l'extrait méthanolique des feuilles (Meyre-Silva *et al.*, 2005).

Plusieurs chercheurs ont confirmé que la plante contient en moyenne 4 milligrammes de marrubiine par gramme de matière végétale fraîche, et que cette substance est à l'origine du goût amer connue chez le marrube blanc (Knöss et Zapp, 1998).

Plusieurs autres diterpènes (Fig. 1) ont été isolés chez *Marrubium vulgare* L. : marrubenol et 15 $\alpha$ -OH cyllenine A (Fulke *et al.*, 1968), vulgarol (Popa *et al.*, 1975), 13R-premarrbiine et 13S-premarrbiine (Laonigro *et al.*, 1979).

## CHAPITRE I Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés



**Figure 1** : Structures chimiques de quelques diterpènes isolés de l'espèce *Marrubium vulgare* L.

### 1.8.2. Les huiles essentielles

Une étude comparative entre deux huiles essentielles extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* a montré que l'Eugénol (50 %) et  $\beta$ -Bisabolène (29 %) sont les composés majoritaires respectivement de l'huile essentielle des deux périodes de floraison et de végétation (Belhattab et Larous, 2006).

Kadri *et al.* (2011) ont mis en évidence 34 composés dans l'huile essentielle dont l'Eudesmol (11,93 %) et le Citronellol (9,90 %) sont les mieux représentés.

Salama *et al.* (2012) ont démontré que l'huile essentielle est nettement dominée par les composés oxygénés avec le Thymol (34,55 %) comme composé dominant.

## CHAPITRE I Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

Zawislak (2012) a mis en évidence 52 composés dans l'huile essentielle où le E-Caryophyllène (44,54 %) et le D-Germacrène (43,36 %) étaient les mieux représentés.

Abadi et Hassani (2013) ont pu identifier 50 composés dans l'huile essentielle avec comme composés majoritaires : le 4,8,12,16-Tetraméthyl heptadécane-4-olide (16,97 %) et le D-Germacrène (9,61 %). Bokaeian *et al.* (2014) ont caractérisé 31 composés avec la dominance de l'Eudesmol (11 %) et du D-Germacrène (10 %).

### I.8.3. Les flavonoïdes

D'après la littérature les flavonoïdes de type flavones, flavonols et leurs dérivés O-glycosylés et/ou O-coumaroyl glycosylés sont les plus isolés dans le genre *Marrubium*.

Nawwar *et al.* (1989) ont pu séparer dix flavonoïdes : chrysoeriol, vitexine, vicénine II, apigénine-7-O-(6''-E-P-coumaroyl)-glucopyranoside, apigénine-7-lactate, apigénine-7-(2-glucuronosyllactate), apigénine-7-(2-glucosyllactate), luteoline-7-lactate, luteoline-7-(2-glucuronosyllactate) et luteoline-7-(2-glucosyllactate).

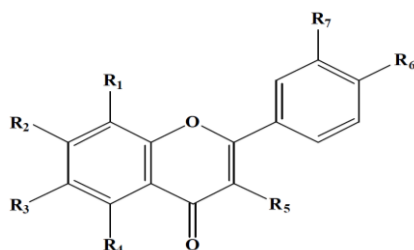
Kowalewski *et al.* (1978) ont isolé six flavonoïdes : apigénine, apigénine 7-O-glucoside, quercétine 3-O-glucoside, quercétine 3-rhamnoglucoside, luteoline et la luteoline-7-O-glucoside

Boudjelal *et al.* (2012) ont pu séparer à partir de l'infusé aqueux 15 métabolites secondaires appartenant aux polyphénols dont cinq flavonoïdes (apigénine 7-O-glucoside, luteonine 7-O-glucoside, ...etc.).

En plus, trois flavonoïdes ont été identifiés par Pukalskas *et al.* (2012) dans l'extrait acétonique des parties aériennes (5,6-dihydroxy-7,40-diméthoxyflavone, 7-O-b-glucopyranosyl luteoline et le 7-O-b-glucuronoyl luteoline).

Quelques structures des flavonoïdes isolées de la plante *Marrubium vulgare* sont représentées dans la figure 2.

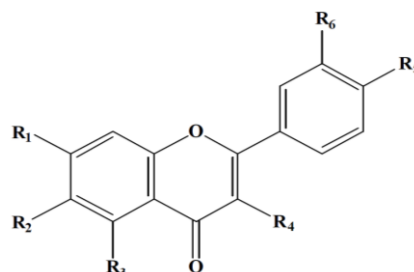
## CHAPITRE I Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés



**apigénine** (R1: H, R2: OH, R3: H, R4: OH, R5: H, R6: OH, R7: H)

**apigénine 7-O-glucoside** (R1: H, R2: OGlu, R3: H, R4: OH, R5: H, R6: OH, R7: H)

**quercétine 3-O-glucoside** (R1: H, R2: H, R3: H, R4: OH, R5: OGlu, R6: OH, R7: OH)



**lutéoline** (R1: OH, R2: H, R3: OH, R4: H, R5: OH, R6: OH)

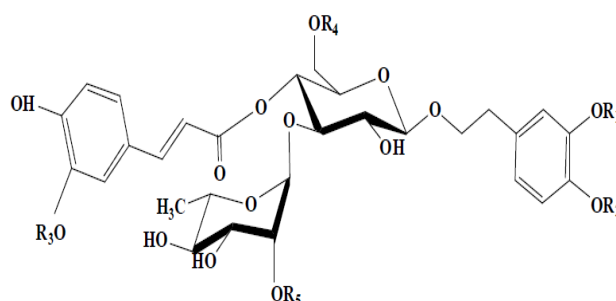
**lutéoline-7-O-glucoside** (R1: OGlu, R2: H, R3: OH, R4: H, R5: OH, R6: OH)

**Figure 2 :** Structures chimiques de quelques flavonoïdes isolés de l'espèce *Marrubium vulgare* L.

### I.8.4. Les phénylpropanoïdes

Parmi les phénylpropanoïdes, l'actéoside et le forsythoside B sont les plus rencontrés dans le genre *Marrubium*.

Sahpaz *et al.* (2002) ont déterminé cinq phénylpropanoïdes esters dans l'extrait méthanolique des parties aériennes : marruboside, actéoside, forsythoside B, arenarioside et ballotetroside (Fig. 3).



**actéoside** (R1: H, R2: H, R3: H, R4: H, R5: H)

**forsythoside B** (R1: H, R2: H, R3: H, R4: Apio, R5: H)

**ballotetroside** (R1: H, R2: H, R3: H, R4: Apio, R5: Ara)

**arenarioside** (R1: H, R2: H, R3: H, R4: Xylo, R5: H)

**marruboside** (R1: H, R2: H, R3: H, R4: Apio, R5: Apio)

**Figure 3 :** Structures chimiques de quelques phénylpropanoïdes isolés de l'espèce *Marrubium vulgare* L.

## CHAPITRE I Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

### I.9. Propriétés pharmacologiques

Les recherches actuelles s'intéressent aux propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, analgésiques, vasorelaxantes et hypoglycémiantes de divers extraits naturels de *Marrubium vulgare* L., lesquels pourraient être utilisés pour réduire le risque de développement de diverses maladies.

#### I.9.1. Potentiel vasodilatateur et antihypertenseur

Vergara-Galicia *et al.* (2013), par une étude *in vivo*, ont démontré que l'extrait éthanolique obtenu à partir des racines de *Marrubium vulgare* L. présente un remarquable potentiel vasodilatateur et antihypertenseur.

Dans le même contexte, El Bardai *et al.* (2003) ont conclu que les diterpènes, et en particulier la marrubine et la marrubenol, qui sont à l'origine de cet effet.

#### I.9.2. Propriétés antidiabétique et cardiovasculaire

Elberry *et al.* (2011) ont trouvé par une étude *in vivo* que l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Marrubium vulgare* réduit de manière significative le taux de glucose dans le sang et d'autre part il augmente le taux d'insuline et de glycogène dans les tissus.

Boudjelal *et al.* (2012) ont mené *in vivo* une série d'expériences antidiabétiques sur des rats Wistar albinos. Le diabète a été induit chez les animaux testés par injection d'alloxane. Ces travaux ont fait ressortir que l'extrait aqueux des parties aériennes de *Marrubium vulgare* après injection deux fois par jours pendant 15 jours, entraîne une diminution de 50 % de la glycémie avec une dose de 100 mg/kg de poids corporel, et de plus de 60 % de la glycémie pour des doses de 200 et 300 mg/kg de poids corporel, aussi une baisse significative des taux des triglycérides et du cholestérol total.

Aussi, Dekhordi *et al.* (2012) ont noté que l'administration orale de l'extrait aqueux des parties aériennes de *Marrubium vulgare* pendant une durée de deux mois pourrait atténuer la réactivité contractile du système vasculaire, ce qui peut empêcher le développement de l'hypertension chez les rats diabétiques.

Vergara-Galicia *et al.* (2012), ont prouvé que l'extrait éthanolique des racines de *Marrubium vulgare* avec une dose de 100 mg/kg induit une diminution de 20 % du glucose sanguin après une durée de 5 heures, un effet plus efficace qu'un médicament thérapeutique utilisé comme témoin (glibenclamide).

#### I.9.3. Propriété antimicrobienne

Ramos-Guerra *et al.* (2007) ont déterminé l'activité *in vitro* de l'extrait acétonique et méthanolique de *Marrubium vulgare* contre *Entamoeba histolytica* et *Giardia lamblia*, les agents responsables de l'amibiase et la giardiase. Les extraits ont été très actifs contre *E. Entamoeba histolytica* (CI<sub>50</sub> = 7 et 12 µg/ml) et légèrement toxique à modérée *Giardia lamblia*.

## **CHAPITRE I** Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

Kanyonga *et al.* (2011) ont confirmé que l'extrait méthanolique de la plante entière exerce une importante activité antimicrobienne sur différentes souches avec des doses de 200, 400 et 600 mg/ml enregistrant des diamètres d'inhibition de 27 mm et 26 mm vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Candida albicans* respectivement.

Aussi, Moussaid *et al.* (2012) ont conclu que l'extrait éthanolique des parties aériennes de *Marrubium vulgare* avec un diamètre d'inhibition de 42 mm exerce un effet remarquable sur *Aspergillus niger* par rapport à un antifongique commercialisé (Nystatin) qui a révélé une zone d'inhibition de 38 mm.

Ainsi, Djahra *et al.* (2013) ont montré que les tanins extraits des feuilles du marrube blanc présentent un effet antibactérien important vis-à-vis de deux souches considérées parmi les plus résistantes aux antibiotiques (*Pseudomonas aeruginosa* 7244 et *Staphylococcus aureus*) enregistrant des diamètres d'inhibitions qui atteignent les 34 mm.

D'autre part, Rigi *et al.* (2013) ont dévoilé que l'extrait hydro-alcoolique des feuilles de *Marrubium vulgare* présente une importante activité sur les bactéries à gram+ et gram- avec des concentrations minimales inhibitrices respectives de 2,5 mg/ml et 5 mg/ml vis-à-vis de *Shigella shinga* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Bokaeian *et al.* (2014) ont montré que les huiles essentielles et l'extrait éthanolique des feuilles de *Marrubium vulgare* exercent un remarquable effet antimicrobien sur *Staphylococcus aureus* avec des concentrations minimales inhibitrices respectives de 2,5 mg/ml et 5 mg/ml.

### **I.9.4. Activité antioxydante**

Berrougui *et al.* (2006) ont mis en évidence la capacité de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* à inhiber l'oxydation du mauvais cholestérol (LDL) et à améliorer le transport du bon cholestérol (HDL), ce qui peut donc empêcher le développement de maladies cardiovasculaires et prévenir l'athérosclérose.

Aussi, Matkowski *et al.* (2008) ont montré que les extraits de *Marrubium vulgare* présentent l'activité antioxydante la plus faible par rapport à d'autres espèces appartenant à la famille des Lamiaceae telles que *Ballota nigra* et *Lamium maculatum* et que l'extrait dichlorométhanique de *Marrubium vulgare* présente une  $CI_{50}$  deux fois plus que l'extrait méthanolique, une activité due probablement à la présence des labdanes ditèrpéniques comme la marrubénol.

En plus, Kadri *et al.* (2011) ont suggéré que les huiles essentielles des parties aériennes de *Marrubium vulgare* peuvent être considérées comme une source efficace d'antioxydant d'origine naturelle avec une  $CI_{50} = 74 \mu\text{g/ml}$  ce qui est environ deux fois plus élevé qu'un antioxydant synthétique (BHT : hydroxytoluène butylé).

## CHAPITRE I Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) : caractéristiques et propriétés

### **I.9.5. Potentiel analgésique**

Meyre-Silva *et al.* (2005) ont confirmé que la marrubine est le principal composé analgésique présent chez *Marrubium vulgare*.

Hosseinzadeh *et al.* (2007) ont montré que les extraits aqueux et méthanolique obtenus des fleurs de *Marrubium vulgare* récoltées en Iran peuvent diminuer les symptômes du syndrome de sevrage de la morphine chez les rats.

L'extrait méthanolique de la plante entière de *Marrubium vulgare* avec une dose de 200 mg/kg a significativement inhibé les contractions abdominales provoquées chez des souris après administration de p-benzoquinone (Kanyonga *et al.*, 2011).

### **I.9.6 Effet anticancéreux**

Yamaguchi *et al.* (2006) ont étudié l'effet anticancéreux de l'extrait des feuilles de *Marrubium vulgare* sur des cellules cancéreuses colorectales humaines. Le matériel végétal (20 g) a été extrait avec 200 ml de méthanol pendant 48 h, concentré et séché. À une concentration de 250 µg/ml, il a provoqué l'apoptose et de la suppression de la croissance cellulaire dans les cellules cancéreuses étudiées.

### **I.9.7. Propriétés molluscicide et anti-moustique**

Salama *et al.* (2012) ont testé les propriétés molluscicide et anti-moustique des huiles essentielles obtenues des feuilles fraîches de *Marrubium vulgare* prélevées en Egypte. Ces huiles présentent une CL<sub>100</sub> de 200 ppm/24 heures chez les œufs de *Biomphalaria alexandrina* ; et des CL<sub>50</sub> et CL<sub>90</sub> de 50 et 100 ppm/3 heures respectivement chez les escargots adultes de *Biomphalaria alexandrina*. En plus, ces huiles ont enregistré des CL<sub>50</sub> et CL<sub>90</sub> respectives de 200 et 400 ppm/12 heures chez le moustique *Culex pipiens*.

**CHAPITRE II : Les composés  
phénoliques végétaux : flavonoïdes et  
tanins**

### II.1. Introduction

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à reproduire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » qui appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...). Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent tels que les parasites, les pathogènes et prédateurs mais aussi les pollinisateurs, et constituent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Hostettmann *et al.*, 1998 ; Macheix *et al.*, 2005).

Les composés phénoliques sont l'un des groupes des métabolites secondaires les plus répandus chez les plantes où ils sont présents presque dans tous les organes (feuille, tige, racine, fleur, graine, fruit). Ils sont impliqués dans la protection contre les prédateurs, les pathogènes et les agressions de l'environnement (température, lumière, radiations UV) (Tsao, 2010). Ils sont considérés comme étant la seule catégorie de produits naturels actifs qui jouent un rôle important dans la prévention contre quelques maladies grâce à leurs diverses propriétés biologiques (Gianmaria *et al.*, 2011), telles que l'activité anticancéreuse (Berghe, 2012), antimicrobienne (Konaté *et al.*, 2012), anti-inflammatoire (Lolayekar et Shanbhag, 2012) et antioxydante (Kazeem *et al.*, 2012). De ce fait, la détermination précise des teneurs en polyphénols des fruits (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2007 ; Ignat *et al.*, 2011), des légumes (D'Archivio *et al.*, 2007) et de quelques plantes aromatiques et médicinales (N'Guessan *et al.*, 2011 ; Okuda et Ito, 2011) suscite un intérêt croissant de la communauté scientifique mais aussi des professionnels de la santé et des partenaires économiques.

### II.2. Les flavonoïdes

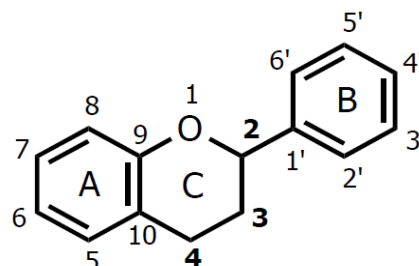
#### II.2.1. Définition et généralités

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Au sens strict, les flavonoïdes ou bioflavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) sont définies comme étant des pigments végétaux quasiment universels (dans la plupart des végétaux), dont plusieurs sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Pietta, 2000 ; Gherida, 2005).

Agrawal et Markham (1989) estiment que 2 % environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 10<sup>9</sup> tonnes par an, est converti en flavonoïdes.

**II.2.2. Structure et classification**

La structure d'un flavonoïde s'organise toujours autour d'un squelette 1,3-diphénylpropane C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> de quinze atomes de carbones (Fig. 4), décrit par une nomenclature spécifique. Les deux cycles benzéniques sont nommés cycle A et cycle B, reliés par un hétérocycle central en C<sub>3</sub>, appelé cycle C (Pietta, 2000 ; Heim *et al.*, 2002).



**Figure 4 :** Structure tricyclique commune aux flavonoïdes.

La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes et à ce jour, plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich, 2006). Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants (groupement hydroxyle, méthoxyles et autres) portés par les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C<sub>3</sub> intermédiaire (Pietta, 2000). Les principaux groupes de flavonoïdes peuvent être définis et différenciés comme suit :

**II.2.2.1. Flavones et flavonols**

Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C<sub>5</sub> et en C<sub>7</sub>. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C<sub>4'</sub> ou di-substitué en C<sub>3'</sub> et C<sub>4'</sub> par des groupements OH ou méthoxyles (OCH<sub>3</sub>). Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C<sub>3</sub> (Morreel *et al.*, 2006)

**II.2.2.2. Flavanones et hydroflavonols**

Se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C<sub>2</sub> et le C<sub>3</sub> et par la présence des centres d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C<sub>3</sub> (Ono *et al.*, 2006).

**II.2.2.3. Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols**

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C<sub>3</sub> et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C<sub>4</sub>. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols). Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement du OH en C<sub>3</sub> dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le palargonidol-3,4-O-glucoside et le cyamidol-3-O-rutinoside ou keracyanine. Les flavan-3-ols et les flavan-

3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés (Bruneton, 1999b).

#### II.2.2.4. Chalcones et aurones

Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone (Bruneton, 1999b ; Ono *et al.*, 2006).

#### II.2.3. Localisation, distribution et biodisponibilité

Les flavonoïdes sont des molécules qui ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce. Ils sont totalement absents des micro-organismes tels que les lichens et les champignons (Lee *et al.*, 1994). Certains flavonoïdes sont spécifiques de certains tissus, les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles, les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs.

Ils sont consommés régulièrement avec l'alimentation humaine (Tab. 3) qui nous apporte environ 75 mg de flavonoïdes par jour (Wang et Mazza, 2002). En effet, le thé, les agrumes, les pommes, l'huile d'olive, les oignons, le cacao et plusieurs autres fruits et légumes sont très riches en flavonoïdes, les flavanols et les flavonols y seraient les plus abondants (Schewe et Sies, 2003).

La majorité des flavonoïdes apportés par l'alimentation sont sous forme glycosylée, ils peuvent occasionnellement y être présents sous forme aglycone (Ishii *et al.*, 2003). Le tableau 3 regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes (Marfak, 2003).

**Tableau 3 : Sources alimentaires de quelques flavonoïdes.**

<b>Flavonoïdes</b>	<b>Aliments</b>
<b>Flavanones</b>	
Naringénine	Fruits du genre Citrus
<b>Flavones</b>	
Chrysin	Peau des fruits
Apigénine	Persil, Thym, Romarin, Céleri
Lutéoline	Pestil, Céleri
<b>Flavonols</b>	
Kaempférol	Radis, Brocoli, Thé noir
Quercétine	Oignon, Pomme, Olive, Tomate
Myricétine	Canneberge
<b>Flavan-3-ols</b>	
Epicatéchine	Thé vert, Thé noir
Catéchine	Thé vert, Thé noir
<b>Anthocyanidols</b>	
Cyanidol	Cassis, Myrtilles
Malvidol	Raisins, Fraises, Cassis
Apigénidol	Framboises, Fraises

## CHAPITRE II Les composés phénoliques végétaux : flavonoïdes et tanins

La composition en flavonoïdes de quelques légumes et fruits est notée dans le tableau 4 (Lugasi *et al.*, 2003).

**Tableau 4** : Contenu en flavonoïdes de quelques aliments végétaux (mg/kg).

<b>Echantillon végétal</b>	<b>Total des flavonoïdes</b>
<b>Légumes</b>	
Brocoli	46,2
Chou blanc	17,7
Oignon rouge	124,1
Oignon pourpre	195,6
Poivre	20,1
Epinards	338,6
Pistil feuilles	80,8
Céleri feuilles	402,8
Céleri racine	25,9
<b>Fruits</b>	
Pastèque	18,4
Cassis	52,8
Fraises	1003
Raisin	58,7
Noix	4565
Kiwi	22,3
Banane	22,8
Pomme	64,3
Poire	24,7
Prune	23,3
Abricot	11,5

### II.2.4. Rôle dans les plantes

Les flavonoïdes sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées), leur fonction principale est la pigmentation des plantes. En effet, les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules de règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleur, susceptibles de donner des teintes allant du jaune orangé au bleu, les flavones et chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beige et blanche.

Les flavonoïdes ont un effet protecteur contre le stress attribué à la sécheresse. Ils pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium. Ils jouent un rôle important dans la protection contre les UV en absorbant les radiations UV et en protégeant ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles (Treutter, 2005).

Les flavonoïdes préformés sont des composés synthétisés durant le développement normal de la plante. Ils sont souvent accumulés à des endroits stratégiques de la plante pour la défense (Treutter, 2005). On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent aussi jouer un rôle dans la protection des plantes (Scalbert et Williamson, 2000). De plus, ils sont impliqués dans les transferts

d'énergie, la photosynthèse, la morphogenèse et la régulation des systèmes de croissance de certains végétaux (Di Carlo *et al.*, 1999).

De nombreuses études mettent en évidence le rôle des isoflavonoïdes comme molécules de signalisation dans les interactions plante-microorganismes. Par exemple, les pterocarpanes, maackiaine et pisatine agissent comme des phytoalexines classiques dans l'interaction entre *Pisum sativum* et le pathogène fongique *Nectria haematococca*. En plus d'agir comme un signal pour la détoxification des phytoalexines, la pisatine et d'autres flavonoïdes, agiraient comme des stimulants de la germination des spores de *Nectria haematococca* (Dixon *et al.*, 1999).

### **II.2.5. Intérêts thérapeutiques**

Comme il a été présenté précédemment, les flavonoïdes sont souvent des molécules de défense contre les organismes pathogènes, il n'est pas surprenant que certains de ses composés possèdent un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, champignons et virus), contre les parasites et les insectes.

#### **II.2.5.1. Activité antibactérienne**

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve : les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (Babayi *et al.*, 2004), *Escherichia coli* (Ulanowska *et al.*, 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* (Didrak, 1999 ; Modak, 2001 ; Okigbo *et al.*, 2005).

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Sur plusieurs bactéries testées l'apigénine n'a montré une faible activité que contre *Staphylococcus aureus*, toutes les autres ont été fort sensibles à ce flavonoïde. Au contraire, la galangine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus* ; les autres microorganismes se sont avérés résistants contre cette molécule (Basile *et al.*, 1999 ; Cushnie *et al.*, 2003 ; Martini *et al.*, 2004). Aussi dans certains travaux, il a été cité que les flavonoïdes extraits avec du méthanol 95 % étaient actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec du méthanol 60 % de la même plante ne l'étaient pas, comme c'était le cas des flavonoïdes de *Linum capitatum* contre *Staphylococcus aureus* (Slavica *et al.*, 2004).

Bien que le mécanisme d'action des flavonoïdes sur les microorganismes demeure encore imprécis, certaines études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne en citant des exemples bien explicites ; comme celui de la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* (Dadi *et al.*, 2009).

### II.2.5.2. Activité antifongique

De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et flavanes (Grayer *et al.*, 1994).

L'une des études les plus importantes sur cette activité était celle d'Ortuno *et al.* (2006), qui ont démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones extraites de *Cirtus parasidi* et de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. En effet, la naringinine, l'hespéridine, la nobilétine, la simensetine et la tangerétine extraites de ces deux espèces du genre *Cirtus* servent à protéger ces dernières contre les attaques de *Penicillium digitatum* (Ortuno *et al.*, 2006).

Batawita *et al.* (2002), dans leur étude sur les flavonoïdes de *Conyza aegyptica* L., ont aussi démontré que ces molécules avaient une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Candida zeylanoïdes*. D'autres flavonoïdes extraits de *Tibouchina grandifolia* ont montré une forte activité antifongique contre différents types de moisissures (Kuster *et al.*, 2009).

Une flavanone prénylée (5,7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2S)-flavanone) ainsi qu'une flavane (7-hydroxy-3',4'-(méthylènedioxy)-flavane) sont actives contre *Candida albicans*. Alors que plusieurs flavones polyméthoxylées sont actives contre *Aspergillus flavus* (Cushnie *et al.*, 2005).

Néanmoins, les études portées sur l'activité antifongique des flavonoïdes restent encore insuffisantes du fait de la grande hétérogénéité des moisissures et des levures.

### II.2.5.3. Potentiel antioxydant

Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules (Van Acker *et al.*, 1995). En effet, les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique, puisqu'ils la préviennent comme l' $\alpha$ -tocophérol. Ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives (Laughton *et al.*, 1989 ; Puppo, 1992).

De plus, les flavonoïdes ont une activité chélatrice des métaux tels que cuivre et fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres (Puppo, 1992 ; Van Acker *et al.*, 1995). Aussi, les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (Laughton *et al.*, 1989 ; De Whalley *et al.*, 1990).

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Halbwirth, 2010). Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule (Halbwirth, 2010).

### II.2.5.4. Activité antivirale

Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur activité antivirale, principalement contre le rétrovirus HIV responsable du symptôme d'immunodéficience acquise (SIDA), le virus d'influenza, le virus de l'herpe (HV), l'adénovirus (ADV) et le virus de la grippe A (AWS/33) (Spedding *et al.*, 1989 ; Choi *et al.*, 2009).

Spedding *et al.* (1989) ont d'abord suggéré que ces polyphénols agissaient comme inhibiteurs de la transcriptase et/ou la transcriptase reverse de l'agent viral et de l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte ; bloquant ainsi tout le processus infectieux.

Des flavones (baicaléine, robustaflavone, hinokiflavone) sont décrites comme inhibant la reverse transcriptase du VIH-1, d'autres (gardénine A, 3,2'-dihydroxyflavone) inhibent la protéinase de VIH-1, l'intégrase de VIH-1 ou la transcription virale (Cushnie et Lamb, 2005). Dans une étude concernant 34 flavonoïdes naturels ou de synthèse, la chrysin apparaît comme la molécule présentant le meilleur index thérapeutique contre VIH-1 (Cushnie et Lamb, 2005).

Choi *et al.* (2009) ont ensuite démontré que les flavonoïdes inhibaient plus exactement la synthèse de l'ARNm viral. Ceci impliquait que les flavonoïdes n'intervenaient pas dans l'absorption des agents viraux, mais plutôt à un stade plus avancé impliqué dans la réplication virale.

### II.2.5.5. Propriété anti-cancérigène

Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans les aliments.

La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La présence de 20 % de quercétine dans l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du colon et y prévient l'apparition des cryptes anormales. Le mécanisme suggéré est que la quercétine joue le rôle d'un antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales.

La catéchine, quant à elle, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OHdG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN. La catéchine a été démontrée comme étant plus active que la vitamine E sur les radicaux libres. Elle est très abondante dans le thé sous forme d'épigallocatechingallate (EGCG) (Pietta, 2000 ; Tomofuji *et al.*, 2009).

### II.2.5.6. Activité antiparasitaire

Plusieurs classes de flavonoïdes (essentiellement les biflavonoïdes) sont également connus comme de bons antiplasmodiaux (Batista *et al.*, 2009). Un certain nombre d'isoflavonoïdes prénylés dont des roténoïdes et la génistéine inhibent la croissance de différentes souches de *Plasmodium falciparum* (Botta *et al.*, 2009). Aussi, Des chalcones

prénylée (lichochalcone A et méthyllindératine) sont actives contre *Plasmodium* sp. *in vitro* et *in vivo* (Wright, 2010).

Dans une étude menée par Tasdemir *et al.* (2006) sur une centaine de flavonoïdes testés pour leur activité contre *Leishmania donovani*, pratiquement toutes les flavones et les flavon-3-ols sous forme aglycone sont actifs. En plus, Des isoflavonoïdes prénylés possèdent une activité antiparasitaire sur *Leishmania* sp. (Botta *et al.*, 2009).

### II.3. Les tanins

#### II.3.1. Définition et généralités

Les tanins (ou tannins) sont des substances polyphénoliques d'origine végétale, ayant la propriété de « tanner » les peaux c'est-à-dire de la rendre dure et imputrescible, en se fixant sur les protéines, d'où leur utilisation la plus importante dans le nettoyage du cuir et le rendre stable (Haslam, 1989). Ils sont caractérisés aussi par leurs effets astringents (sensation de dessèchement en bouche), très utiles quand il y a trop de sécrétions (les bronchites, les diarrhées, les leucorrhées, les plaies saigneuses).

D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par Bate-Smith (1972) : « des composées phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da qui présentent, à coté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autre protéines ». Même si cette définition reste valable, elle a été complétée grâce aux méthodes d'analyse récentes qui ont permis d'éclaircir la structure de ces polyphénols. Ainsi, les tannins sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20000 Da (Haslam, 1989).

La caractéristique fonctionnelle qui décrit les tanins est leur capacité de faire précipiter les protéines (Hagerman et Butler, 1991). Cette interaction varie selon la grandeur et la structure de la protéine. Par exemple les protéines riches en proline ont tendance à être précipitées facilement par les tanins (Asano *et al.*, 1982). Ils sont solubles dans l'eau, avec des poids moléculaires très élevés contenant des groupes hydroxyles (Williams *et al.*, 1983).

#### II.3.2. Structure et classification

Les tanins sont divisés selon Swain (1979) en cinq principaux groupes : tanins hydrolysés, tanins condensés, les oxytanins, les bêta-tanins et les prototanins. Les oxytanins, les bêta-tanins et les prototanins ont des poids moléculaires faibles, et on peut les considérer comme étant les précurseurs de molécules tanniques plus importantes (Bernays *et al.*, 1989).

Habituellement, on distingue chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins par leur structure et par leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés qui sont largement distribués dans différentes familles des plantes vasculaires (Haslam, 1989).

### II.3.2.1. Les tanins hydrolysables (tannoïdes ou pyrogallique)

Les tanins hydrolysables sont des polymères d'acide gallique. Ce sont des esters de glucide ou d'acides phénols, la molécule glucidique est en général un glucose, mais dans certains cas des polysaccharides (Ribereau, 1968).

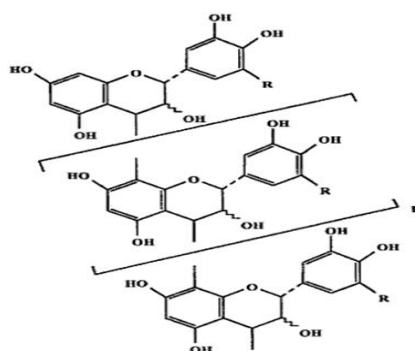
Ces tanins sont constitués d'un noyau central (le glucose) et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol (Guignard, 1996 ; Biaye, 2002). En raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leurs poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales. Par hydrolyse, ils donnent un ose très généralement le glucose et un nombre variable d'acide phénolique, d'acide gallique ou éllagique (Guignard, 1996).

### II.3.2.2. Les tanins condensés (tanins catéchiques ou proanthocyanidols)

Les tanins condensés (tanins vrais non hydrolysables), sont formés par la condensation d'unités flavanes 3-4 diol ( $C_6-C_3-C_6$ ), contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seul les attaques chimiques fortes permettent de les dégrader (Macheix *et al.*, 2005).

Ce sont des oligomères ou polymères issues de la condensation de plusieurs unités d'hydroxylavanol (Harborn, 1982). Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont surtout des flavolanes (Deshpande *et al.*, 1986). Le poids moléculaire des tanins condensés peut se situer entre 6 000 et 12 000 Da (Morris et Robbins, 1997). Plus le poids moléculaire des tannins condensés augmente (> 5 000 Da), plus ces derniers deviennent insolubles dans les solutions physiologiques et perdent leur capacité à précipiter les protéines (Kumar et Vaithyanathan, 1990).

La structure complexe des tanins condensés (Fig. 5) est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation (Hemingway, 1992). Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques  $C_2$  et  $C_3$  et par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Fig. 5). On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées) (Biaye, 2002).



**Figure 5** : Structure des tanins condensés (Macheix *et al.*, 2005).

### II.3.3. Localisation et rôles chez la plante

Toutes les plantes contiennent des tanins à degré plus ou moins élevé. Ces substances d'origine organique sont répandues dans le règne végétal où ils sont présents presque dans tous les organes : racine, rhizome, écorce, feuille, fleur, fruits, graines, bois (Mehanso *et al.*, 1987 ; Biaye, 2002).

Les tanins hydrolysables sont essentiellement localisés dans certaines familles d'Angiospermes dicotylédones, on les rencontre notamment chez les Fagaceae, les Anacardiaceae, les Anacardium, les Dinellidae, les Hamamelidae et les Rosidae et les Geraniaceae (Bruneton, 1999a ; Biaye, 2002). Par contre, ils sont absents des Gymnospermes et des Monocotylédones (Jean-Blain, 1998). Au niveau cellulaire, les tanins hydrolysables sont majoritairement présents dans les parois cellulaires et les espaces intracellulaires (Terrill *et al.*, 1992 ; Frutos *et al.*, 2002).

Les tanins condensés sont en général plus répandus dans le règne végétal et plus abondants dans les plantes que les tanins hydrolysables (Jean-Blain, 1998). Ils se rencontrent chez de nombreuses plantes vasculaires chez les Angiospermes et les Gymnospermes (Bruneton, 1999a). Certaines espèces de Pinaceae (pin), de Fagaceae (chêne et chataîgnier), de Rosidae (acacia) et de Rosaceae (pommier, fraisier) contiennent de fortes quantités de tanins condensés (> 5 % de la MS). Ils sont aussi très abondants dans certains organes végétaux consommés ou utilisés par l'homme, par exemple de nombreux fruits (pomme, prune, fraise...) ou des boissons fermentées ou non (thé, vin, cidre...) (Macheix *et al.*, 2005).

Les tanins condensés sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (Stafford, 1989). Certains auteurs mentionnent que les tanins sont accumulés dans la vacuole (Stafford, 1990 ; Mc Allister *et al.*, 1994) ; tandis que d'autres signalent la présence des tanins sur la paroi de l'endoderme et sur la membrane cellulaire du phloème (Mc Kenzi et Peterson, 1995).

D'une façon générale, les tannins jouent un rôle dans la défense des plantes face aux agressions. La synthèse des tannins est l'un des mécanismes de défense des plantes contre les attaques des phytopathogènes. Par exemple, une accumulation de tannins a été observée dans les zones d'invasion de la plante par des bactéries, des champignons ou par des nématodes, ce qui en inhiberait le développement (Feucht et Treutter, 1999 ; Collingborn *et al.*, 2000). Les tannins sont aussi un moyen de défense contre les agressions des prédateurs tels les insectes et les mammifères herbivores (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992 ; Woodward et Coppock, 1995 ; Feucht *et al.*, 1997). Il a été montré que l'ingestion de tannins affectait l'intégrité du tube digestif des insectes phytophages (Ayres *et al.*, 1997). De plus, la présence des tannins rend les plantes moins appétentes pour les mammifères herbivores à cause de la sensation d'astringence résultant de leur consommation. Cette

astringence conduit alors à un arrêt de la consommation et protège ainsi les végétaux d'une prédation excessive (Jean-Blain, 1998 ; Bennick, 2002).

Les tanins peuvent avoir un effet positif sur la réduction de la nourriture consommée (Reese *et al.*, 1982) et un effet toxique pour certaines espèces soit directement, soit par l'intermédiaire de leurs produits d'hydrolyse (Berambaum, 1983). Si les végétaux riches en tanins peuvent être dangereux, on peut inversement les utiliser comme antidote dans les intoxications par les plantes alcaloïdes, car ils les précipitent et les rendent inoffensifs. Les effets toxiques des tannins apparaissent lors de la consommation de certaines plantes, ils sont principalement causés par les tanins hydrolysables, par contre les tanins condensés sont beaucoup moins toxiques car ils ne traversent pas la barrière intestinale (Biaye, 2002).

### **II.3.4. Activités pharmacologiques**

Les tanins contiennent de nombreux groupements hydroxyle (sur les noyaux phénoliques), ce qui leur permet de former des complexes insolubles avec les hydrates de carbone, des protéines et des ions métalliques, donnant naissance à des polymères insolubles. Cette réaction avec les protéines est à l'origine de nombreux effets biologiques des tanins (Perret, 2001 ; Peronny, 2005).

#### **II.3.4.1. Activité antibactérienne**

Les tannins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales (dont certaines sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Butyvirio fibrisolvens*, *C.proteoclasterium* (Veveris *et al.*, 2004) ; ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis* (Leitao *et al.*, 2005).

L'acide chébulagique ou la corilagine extraits de *terminalia citrina* (plante utilisée dans la médecine traditionnelle Thaïlandaise) présentent de nombreuses activités à l'encontre de souches pathogènes de l'homme, comme *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsielle pneumoniae*, *Candida albicans* ou encore *Enterococcus sp.* (Mazza et Miniati, 1993).

Kolodziej *et al.* (1999) ont montré que les tanins présentent une activité antibactérienne faible à modérée aussi bien, sur les bactéries à Gram (+) que sur les bactéries à Gram (-).

#### **II.3.4.2. Activité antifongique**

Les tannins condensés comme les hydrolysables, ont une action inhibitrice contre les moisissures et les levures. Comme exemple, on a les proanthocyanidines du thé qui ont montré un rôle dans la protection de cette plante contre *Exobasidium vexans* (Punyasiri *et al.*, 2005), et les tannins hydrolysables des différentes plantes qui agissent contre une large gamme de champignons filamenteux (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum cassis*,

## CHAPITRE II Les composés phénoliques végétaux : flavonoïdes et tanins

*Trichophyton rubrum*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*,...) et de levures opportunistes (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus néoformans*...) (Latte, 2000).

Cette action antifongique est couramment utilisée pendant les opérations œnologiques lors de la manufacture des vins car les tannins polaires de ces derniers ont une grande capacité à se fixer sur les champignons néfastes (Punyasiri *et al.*, 2005).

### **II.3.4.3. Potentiels anti-diarrhéique et antiseptique**

Beaucoup de travaux ont montré l'utilisation des tanins comme anti-diarrhéique et généralement sur les diarrhées ne dépassant 3 à 4 jours, cette activité semble être liée à leurs pouvoir astringent et anti-infectieux (Bruneton, 1999a).

Les tanins ont un effet anti-diarrhéique, et par voie externe, ils imperméabilisent les couches superficielles de la peau, sont vasoconstricteurs et limitent la perte en fluides. Ces propriétés, ajoutées par ailleurs à leur effet antiseptique, en font des molécules intéressantes pour la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures, et les rendent utilisables dans le traitement des diarrhées infectieuses (Okuda *et al.*, 1983 ; Bruneton, 1999a).

### **II.3.4.4. Activité antiparasitaire**

L'association de tanins avec les protéines de surface des virus ou des cellules hôtes serait à l'origine de la diminution de la charge virale. De telles activités ont été trouvées à l'encontre de l'herpès (Takechi *et al.*, 1985) et en particulier contre le HIV ou SIDA (Vlietinck *et al.*, 1997).

L'acide chébulagique extrait de *terminalia chebula*, par exemple, utilise ce mode d'action contre le HIV. Egalement, il apparaît que les tanins agissent en inhibant des enzymes essentielles à la réplication du virus, comme l'acide ellagique inhibiteur de la 'VHI transcriptase reverse' ou l'acide chébulagique et la corilagine, extraits de deux espèces de phyllantus, inhibiteurs de la ADN polymérase du virus Epstein-Barr (Chen Lui *et al.*, 1999) .

### **II.3.4.5. Activité anti-tumorale**

Les études menées par Yoshida *et al.* (1995), révèlent que les tanins suppriment la tumeur excroissante chez trois à six rats sur cent, à une dose de 10 mg/Kg. Ainsi une étude menée dans l'université d'Illinois à Chicago a montré que le fractionnement de quatre plantes : *Rubus odoratus*, *Comis canadensis*, *Calycogonium squamulosum* et *Lespedeza capitata* présente une activité anti-tumorale liée aux tanins.

### **II.3.4.6. Autres activités**

L'acide chébulagique est réputé comme inhibiteur de la topoisomérase I et surtout II de l'ADN humain. Ce dernier possède également la propriété, qu'ont de nombreux autres tanins ellagiques, d'être cytotoxique à l'encontre de lignées cellulaires cancéreuses. Plus récemment, des propriétés antiplasmodiales ont pu être trouvées. L'extrait méthanolique

d'écorces de *tristianopsis calobuxus* de Nouvelle Calédonie, contenant de nombreux tanins, a donné des résultats prometteurs (Quideau *et al.*, 1996).

L'absorption du fer est inhibée par les tanins qui agissent comme des chélateurs naturels dans le tube digestif. La consommation de ces molécules réduit très fortement l'absorption du fer chez les rats, ce qui permet grâce à cette propriété de protéger les animaux sujets à l'hémorragie. Grâce à leur affinité les tanins sont utilisés comme antidotes des alcaloïdes, des glycosides et des ions de métaux lourds (Peronny, 2005).

En limitant la perte en fluides et en empêchant les agressions extérieures, les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique clairement démontré de ces molécules est intéressant (Veroffa *et al.*, 2001).

### **II.4. Facteurs influençant la synthèse des composés phénoliques**

Chez les végétaux, la distribution des composés phénoliques est influencée par plusieurs paramètres environnementaux (Cosmulescu et Trandafir, 2011 ; Ghasemi *et al.*, 2011 ; Generalic *et al.*, 2012 ; Raal *et al.*, 2012). Aussi, de nombreux chercheurs ont prouvé que les conditions expérimentales d'extraction jouent à leur tour un rôle déterminant dans la variation des teneurs en polyphénols (Trabelsi *et al.*, 2010 ; Gironi et Piemonte, 2011 ; Tan *et al.*, 2011 ; Falleh *et al.*, 2012 ; Khoddami *et al.*, 2013). De ce fait, il n'existe pas un protocole universel standardisé destiné pour l'extraction des polyphénols à partir des végétaux (Chirinos *et al.*, 2007). Ces polyphénols peuvent avoir des structures très diversifiées dues à leurs groupements hydroxyles qui peuvent être conjugués à des sucres, à des protéines, à des acides et à des groupements alcalins ce qui peut conduire à la formation d'un complexe tout à fait insoluble, rendant difficile leur extraction (Garcia-Salas *et al.*, 2010).

#### **II.4.1. Influence de l'environnement sur la synthèse des composés phénoliques**

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent en effet agir dans l'espace et dans le temps sur la production des composés phénoliques rendant ainsi le métabolisme phénolique très sensible aux changements environnementaux (Chiapusio *et al.*, 1997 ; Souto *et al.*, 2000 ; Souto *et al.*, 2001). Ces composés interviennent dans de nombreux phénomènes physiologiques et biochimiques afin de permettre à la plante de s'adapter à son milieu (Macheix *et al.*, 2005). De ce fait, la distribution des composés phénoliques chez les végétaux est influencée par de nombreux facteurs environnementaux tels que : la lumière, la nature du sol, les précipitations et la température, la période de prélèvement, l'origine géographique, la nutrition azotée et l'enrichissement en CO<sub>2</sub>.

##### **II.1.4.1. La lumière**

La lumière agit de façon quantitative et qualitative et est corrélée à l'augmentation des teneurs en composés phénoliques et plus particulièrement des flavonoïdes dans les tissus

(Macheix *et al.*, 2005). L'activité de certaines enzymes de la voie de biosynthèse des polyphénols est stimulée par la lumière, c'est le cas, entre autres de la chalcone synthase : CHS (Feinbaum et Ausubel, 1988), de la Cinnamate-4-Hydroxylase : C4H (Bell-Lelong *et al.*, 1997) et de la Phénylalanine ammonia lyase : PAL (Flores *et al.*, 2005). En cultivant des tomates sous une forte intensité lumineuse, Wilkens *et al.* (1996) ont quantifié environ deux fois plus de rutine et d'acide chlorogénique que dans les plantes cultivées sous une faible intensité lumineuse. Ainsi sous un rayonnement UV, les activités de la PAL et de la CHS, par exemple, sont stimulées, et les teneurs en polyphénols sont accrues (Desjardin, 2008). Aussi, la lumière rouge pourrait également avoir un rôle particulier dans la formation des flavonoïdes et notamment favoriser la formation de naringénine-chalcone (Hunt et Baker, 1980).

### **II.1.4.2. La température de l'environnement**

La température peut modifier les teneurs en polyphénols chez les fruits pendant la phase de croissance des fruits sur la plante, mais également après la récolte. Pour les plants de tomate, un stress thermique semblerait apparaître à partir de 35°C, causant l'accumulation de composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les acides hydroxycinnamiques. En effet, un stress thermique provoqué par des températures froides (4°C) ou élevées entraîne une augmentation des activités PAL et CHS qui a pour conséquence d'augmenter les teneurs en composés phénoliques (Leyva *et al.*, 1995). En outre, l'oxydation des composés phénoliques par les polyphénols oxydases (PPO) et peroxydases (POD) est inhibée, ce qui maximise l'accumulation des polyphénols (Rivero *et al.*, 2001).

Lors du stockage des aliments, les activités enzymatiques sont déterminantes sur la qualité finale du fruit et sur sa durée de conservation. Il a été démontré que l'augmentation de la température de conservation entraînait une augmentation des activités de certaines enzymes (lipoxygénases, peroxydases, réductases et catalases). Par conséquent placer des tomates à une température élevée (35°C) entraîne des dégâts oxydatifs (Mondal *et al.*, 2004). De la même façon, Soto-Zamora *et al.* (2004) ont démontré que la conservation des fruits (récoltés au stade vert mature) à 4°C, température inférieure à la température optimale de stockage, inhibait la maturation et accélérât les pertes en antioxydants (particulièrement en caroténoïdes) (Soto-Zamora *et al.*, 2004).

### **II.1.4.3. La période de l'année**

Cosmulescu et Trandafir (2011) ont étudié la variation de la teneur en phénols totaux chez le noyer (*Juglans regia* L.) pendant 4 mois (de juin à septembre 2011). Ils ont remarqué une augmentation des teneurs en phénols totaux au cours des mois de juin (9,94 mg EAG/100 g) et juillet (26,81 mg EAG/100 g), puis diminuer au cours du mois d'août (21,23 mg EAG/100 g), puis une nouvelle augmentation est enregistrée au début de septembre (28,85 mg EAG/100 g).

Ghorbanli *et al.* (2012) ont conclu que les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans *Flavoparmelia caperata* ont atteints des valeurs maximales en hiver plus que les autres saisons ; par contre chez *Physcia dubia*, ces composés ont connu une hausse pendant l'été plus que les autres saisons. Aussi, Slimestad et Verheuil (2005) ont observé chez la tomate et sur une saison de culture que les teneurs en acide chlorogénique, en rutine ou en naringénine chalcone, pouvaient être multipliées par trois en fonction de la date de récolte.

La majorité des études menées dans ce contexte ont expliqué que les différences enregistrées entre les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés peuvent être attribuées aux paramètres climatiques (température et précipitations), à l'intensité de la lumière du soleil et à la durée de la journée qui varient considérablement entre les différentes saisons (Haribal *et al.* 2001 ; Erturk *et al.*, 2010).

### **II.1.4.4. La nutrition minérale**

Peu de travaux existent sur l'influence de la fertilisation minérale sur les teneurs en composés phénoliques. Cependant la nutrition minérale peut avoir tellement d'effets aussi bien sur la croissance que sur le développement des plantes, qu'il est logique de s'attendre également à des répercussions sur la composition des tissus végétaux (Grusak et DellaPenna, 1999 ; Crosby, 2008).

Les micros comme les macroéléments peuvent modifier la composition en polyphénols. Il a été clairement démontré qu'une carence en bore induisait une augmentation des teneurs en flavonoïdes d'environ 40 % à 50 %, dans les feuilles et les fruits de tomate (Carpena *et al.*, 1982 ; Lopez-Andreu *et al.*, 1988 ; Ruiz *et al.*, 1998). Les effets du phosphore et du manganèse sont par contre plus variables (Zornoza et Esteban, 1984). Penalosa *et al.* (1989) ont observé qu'une déficience (0,2 et 0,5 mmol/L) ou un excès (4 mmol/L) en phosphore dans la solution nutritive entraînait une diminution des teneurs en flavonoïdes dans les feuilles. Par contre, Stewart *et al.* (2001) ont mis en évidence que de faibles apports en phosphore augmentaient les teneurs en flavonols dans les fruits mais ce, uniquement pendant les premiers stades de maturation, les bénéfiques de ce stress diminuant avec la maturation (Stewart *et al.*, 2001).

La nutrition azotée modifie également les teneurs en composés phénoliques (Wilkens *et al.*, 1996 ; Dumas *et al.*, 2003). Stout *et al.* (1998) ont obtenu des concentrations deux fois plus importantes dans les feuilles de tomates ayant poussé avec de faibles apports en azote (2 mM) en comparaison des teneurs obtenues dans les feuilles du fort traitement en azote (8 mM). Fritz *et al.* (2006) ont mis en évidence que les apports d'azote inhibaient fortement le métabolisme des phénylpropanoïdes dans les feuilles de tabac. Des études relatent également une augmentation des teneurs en polyphénols lors de faibles apports en azote, dans les tubercules de pomme de terre, ou dans les fruits comme le raisin ou les pommes (Awad et De Jager, 2002 ; Delgado *et al.*, 2004 ; Mittelstra *et al.*, 2006).

### II.1.4.5. L'enrichissement en CO<sub>2</sub>

Les cultures sous enrichissement en CO<sub>2</sub> vont modifier le statut carboné de la plante et augmenter la disponibilité en carbone (Haukioja *et al.*, 1998). Une augmentation de 30 % des teneurs en composés phénoliques dans les feuilles peut être observée (Penuelas et Estiarte, 1998) mais ce comportement est très dépendant des plantes et des molécules étudiées. En outre, la synthèse des tannins, des terpènes et de la lignine ne semblent pas modifiée par un enrichissement en CO<sub>2</sub> (Koricheva *et al.*, 1998 ; Penuelas et Estiarte, 1998). Wang *et al.* (2003) ont obtenu des teneurs en phenylpropanoïdes et en flavonoïdes significativement plus importantes chez des framboisiers cultivés sous enrichissement en CO<sub>2</sub>. Par contre, Fajer *et al.* (1992) n'ont pas mis en évidence d'augmentation des teneurs en métabolites secondaires chez *Plantago*.

### II.1.4.6. La région géographique

Steffensen *et al.* (2011) ont cultivé dans les mêmes conditions climatiques et environnementales, des espèces du genre *Amaranthus*, et ceci dans quatre différents pays : Argentine, Mexique, Espagne et République tchèque. 11 différents composés phénoliques ont été dosés chez les graines mûres. Ils ont conclu que la teneur en ces composés phénoliques est en général, très influencée par la région géographique avec des différences très hautement significatives entre les quatre stations étudiées.

Amaral *et al.* (2008) ont analysé neuf composés phénoliques chez les feuilles de noyer récoltées de deux différentes régions géographiques au Portugal (Coimbra et Bragança). Les profils qualitatifs en utilisant la méthode HPLC-DAD étaient identiques pour tous les échantillons, mais des différences très hautement significatives ont été observées en termes de contenu en polyphénols analysés.

La majorité des chercheurs expliquent les variations polyphénoliques entre les régions géographiques par : les conditions climatiques (précipitations et température) caractérisant chaque région, les paramètres édaphiques (perméabilité et teneur en éléments minéraux) (Radix *et al.*, 1998 ; Nikolopoulou *et al.*, 2007), les coordonnées géographiques (altitude, latitude et longitude) (Hussey *et al.*, 2011 ; Ismael *et al.*, 2012).

### II.4.2. Influence des conditions d'extraction sur la synthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent avoir des structures très diversifiées dues à leurs groupements hydroxyles qui peuvent être conjugués à des sucres, à des protéines, à des acides et à des groupements alcalins ce qui peut conduire à la formation d'un complexe tout à fait insoluble, rendant difficile leur extraction (Garcia-Salas *et al.*, 2010). De nombreux chercheurs ont prouvé que le choix des conditions expérimentales d'extraction jouent un rôle déterminant dans la variation des teneurs en polyphénols (Trabelsi *et al.*, 2010 ; Gironi et Piemonte, 2011 ; Tan *et al.*, 2011 ; Falleh *et al.*, 2012 ; Khoddami *et al.*, 2013). En effet, des

paramètres tels que la méthode d'extraction, la nature du solvant organique et sa concentration, le rapport solvant-soluté, la température d'extraction, le temps d'extraction ou encore le nombre des extractions et des répétitions effectuées, peuvent avoir un effet significatif sur les concentrations en polyphénols.

### II.4.2.1. Préparation de la matière végétale

Le stockage de la matière végétale a une incidence directe sur la teneur en polyphénols. Le stockage de jus de pomme pendant 11 mois a donné lieu à une diminution des concentrations des acides phénoliques de 5 % à 21 % (Gliszczynska-Swiglo *et al.*, 2003). Aussi, une diminution de la teneur en acide p-coumarique a été observée dans les framboises rouges congelées (Mullen *et al.*, 2002). Aussi, après un stockage au froid, le brocoli a perdu environ 75 % de sa teneur en acide caffeoylquinique et 40 % à 50 % de sa concentration en acide sinapique (Vallejo *et al.*, 2003). Pendant un stockage plus de sept mois des vins rouges dans l'obscurité, il a été observé que la concentration en anthocyanes a diminué de 88 % (Zafrilla *et al.*, 2003). D'autre part, les pommes ont montré une augmentation de la concentration de l'acide chlorogénique après quatre mois de stockage: de 101 à 144 mg/kg de poids frais (Napolitano *et al.*, 2004). Trente-quatre bouteilles de différentes qualités d'huile d'olive ont été stockées pendant six mois dans des conditions similaires à celles des points de vente des consommateurs: les teneurs en polyphénols totaux ont fortement diminué au cours du stockage (Gutierrez *et al.*, 2002).

Le traitement thermique de la matière végétale avant extraction affecte le contenu et, par conséquent, la quantité des composés phénoliques. La chaleur cause une réduction significative dans les concentrations moyennes en phénols totaux chez les haricots et les légumineuses (Xu *et al.*, 2009). Cependant, Rocha-Guzman *et al.* (2007) ont enregistré une augmentation significative dans les teneurs en polyphénols chez les haricots (*Phaseolus vulgaris* L.) cuit à 121 °C. De même, Khatun *et al.* (2006) ont observé que la teneur en composés phénoliques totaux chez plusieurs épices a connu une augmentation après traitement thermique. Au contraire, chez l'huile d'olive, la concentration de certains polyphénols a diminué rapidement après un traitement thermique (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2007).

### II.4.2.2. Technique d'extraction

Les études menées par Sultana *et al.* (2009) ont montré que quel que soit le solvant d'extraction utilisé (éthanol et méthanol) et quelle que soit la partie végétale étudiée (feuilles, fruits, racines et écorces), les concentrations moyennes ainsi que les rendements en composés phénoliques obtenus après extraction en utilisant une agitation magnétique étaient nettement supérieures à ceux enregistrés suite à une extraction sous reflux, et ceci chez la majorité des sept plantes médicinales étudiées (*Moringa oleifera*, *Eugenia jambolana*, *Acacia nilotica*, *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Ficus religiosa*, *Aloe barbadensis*). Ils

ont expliqué ces résultats par le fait que la température élevée utilisée lors de l'extraction sous reflux cause une détérioration des polyphénols contenus dans la matière végétale.

Mujica *et al.* (2009) ont testé six différentes méthodes d'extraction (agitation sur plaque chauffante, agitation par secouage, sonication, homogénéisation et centrifugation) des phénols totaux et des tanins à partir des graines de *Phaseolus vulgaris*. Ils ont enregistré des concentrations moyennes en phénols totaux et en tanins variant respectivement entre 428 à 501 mg EAG/100 g et de 470 à 555 mg EAT/100g. Ils ont conclu que la méthode d'agitation sur plaque chauffante a enregistré des concentrations moyennes les plus élevées avec des différences hautement significatives entre les différentes méthodes d'extraction analysées.

Aslam *et al.* (2012) ont comparé l'efficacité de trois techniques d'extraction des phénols totaux chez différentes parties d'*Ocimum basilicum*. Les résultats enregistrés montrent que la technique d'extraction assistée par micro-ondes a été le plus efficace suivie par la méthode d'extraction sous reflux et enfin par la technique d'extraction en utilisant un soxhlet avec des différences significatives entre les trois techniques. D'autres chercheurs également ont signalé que la technique d'extraction par micro-ondes était la plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques à partir de plantes (Gallo *et al.*, 2010 ; Kanimozhi *et al.*, 2010 ; Luo *et al.*, 2010 ; Xueling *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2011).

### **II.4.2.3. La température d'extraction**

La température d'extraction est l'un des paramètres qui influence d'une manière significative le rendement en composés phénoliques. En effet, l'extraction de composés phytochimiques comme les polyphénols est un processus de transfert de masse de soluté à partir des cellules végétales jusqu'au solvant (Gertenbach, 2001). Cette combinaison liquide-solide dépend des phénomènes de diffusion régulée soit par la diminution ou par l'augmentation de la température d'extraction (Moahamad *et al.*, 2010).

Sharifi et Hassani (2012) ont montré chez les pépins de *Berberis vulgaris* que la température d'extraction de 50 °C a permis d'extraire le maximum d'anthocyanes par rapport à 60 °C et 70 °C. Samuagam *et al.* (2013) ont vérifié chez les fruits de *Nephelium lappaceum*, *Garcinia mangostana* et *Lansium domesticum* que les concentrations maximales en composés phénoliques sont obtenues à de fortes températures (50 et 60 °C) par rapport aux basses températures (25, 30 et 40 °C). 40 °C est la température qui a enregistré les concentrations les plus élevées en composés phénoliques chez les fruits de *Rhus coriaria* et *Rhus typhina* (Kossah *et al.*, 2010).

### **II.4.2.4. Le temps d'extraction**

Plusieurs auteurs ont confirmé que le rendement en composés phénoliques dépend essentiellement du temps d'extraction utilisé (Kelebek *et al.*, 2006 ; Durling *et al.*, 2007 ; Budic-Leto *et al.*, 2008 ; Franco *et al.*, 2008).

Kossah *et al.* (2010) ont montré que 5 heures d'extraction a donné des concentrations maximales en composés phénoliques chez les fruits de *Rhus coriaria* et *Rhus typhina* par rapport à 1, 3, 7 et 9 heures. 2 heures d'extraction a enregistré les concentrations les plus élevées en composés phénoliques chez *Opuntia ficus* par rapport à 4, 6 et 7 heures (Jorge *et al.*, 2013). Sampath (2013) a enregistré chez *Polyalthia longifolia* des concentrations maximales en composés phénoliques à 30 min par rapport à 10, 20 et 40 min. Samuagam *et al.* (2013) ont remarqué que le temps idéale d'extraction des composés phénoliques varie selon l'espèce végétale étudiée, ils ont enregistré un temps optimale de 1 heure chez *Nephelium lappaceum*, 5 heures chez *Garcinia mangostana* et 2 heures chez *Lansium domesticum*

### II.4.2.5. La nature et la concentration du solvant d'extraction

L'extraction des composés phénoliques à partir de différents échantillons végétaux est fortement influencée d'une part par la nature et la concentration des solvants d'extraction, et d'autre part par la capacité de l'échantillon végétal à se solubiliser dans les solvants (Alothman *et al.*, 2009a ; Sulaiman *et al.*, 2011). A cet effet, il est très difficile de choisir un solvant approprié pour l'extraction des polyphénols à partir de tous les échantillons végétaux.

Stankovic *et al.* (2011) ont vérifié que le méthanol et l'eau enregistrent des concentrations maximales en composés phénoliques chez différents organes (feuilles, tiges et fleurs) de *Teucrium montanum* par rapport aux autres solvants testés (acétone, éther de pétrole et acétate d'éthyle). Aslam *et al.* (2012) ont testé l'influence de trois solvants à différentes polarités (méthanol, eau et acétate d'éthyle) sur les teneurs en composés phénoliques chez différents organes (tiges, fleurs et graines) de *Ocimum basilicum*. Ils ont remarqué que les concentrations maximales sont enregistrées avec le méthanol quel que soit l'organe végétal analysé. Khan *et al.* (2012) ont enregistré des concentrations maximales en phénols totaux et en flavonoïdes chez les parties aériennes de *Sonchus asper* en utilisant le méthanol et le chloroforme par rapport à l'acétate d'éthyle et l'héxane. Sharifi et Hassani (2012) ont montré chez les pépins de *Berberis vulgaris* qu'un mélange éthanol-méthanol permet d'obtenir des concentrations élevées en anthocyanes par rapport au méthanol, éthanol, eau, acide citrique et acide hydrochlorique.

Samuagam *et al.* (2013) ont constaté que 80 % d'éthanol enregistre des concentrations maximales en composés phénoliques chez les fruits de *Nephelium lappaceum*, *Garcinia mangostana* et *Lansium domesticum* par rapport à d'autres concentrations du même solvant (0, 20, 40, 60 et 100 %). Butariu et Coradini (2012) ont montré chez les fleurs de *Calendula officinalis* que le méthanol 80 % permet d'extraire le maximum de flavonoïdes par rapport à l'éthanol 60 %, l'éthanol 96 % et l'isopropanol 99 %. Kchaou *et al.* (2013) ont remarqué chez différentes variétés Tunisiennes de dattes (*Phoenix dactylifera*) que le méthanol 50 % a enregistré des concentrations plus élevées en composés phénoliques par rapport au méthanol 88 %, l'acétone 70 % et l'éthanol pur.

**II.4.2.6. Le rapport solvant-soluté**

Contrairement aux paramètres d'extraction cités précédemment, l'impact du rapport solvant-soluté est fréquemment négligé dans les études d'extraction des différents composés phytochimiques à partir des matrices végétales (Antolovich *et al.*, 2000; Luthria, 2006; Mukhopadhyay *et al.*, 2006).

Chez les fruits de *Rhus coriaria* et *Rhus typhina*, le rapport 1/15 solvant-soluté a donné les concentrations maximales en composés phénoliques par rapport à 1/5, 1/10, 1/20 et 1/25 (Kossah *et al.*, 2010). Telli *et al.* (2010) ont remarqué chez les dattes lyophilisées que le rapport 1/6 (P/V) solvant/soluté marque les concentrations maximales en composés phénoliques par rapport aux autres rapports (1/3, 1/4, 1/5, 1/6 et 1/7 ; P/V). Sampath (2013) a enregistré chez *Polyalthia longifolia* des concentrations élevées en composés phénoliques avec le rapport 1/10 solvant-soluté par rapport aux autres rapports testés (1/5, 1/15 et 1/20 ; P/V)

Plusieurs auteurs ont confirmé que l'augmentation du rapport solvant/soluté a un effet positif sur l'extraction des composés phénoliques. Ces résultats sont compatibles avec le principe du transfert de la matière, où la force de transmission durant ce transfert est le gradient de la concentration de soluté entre le solide et le liquide. Cette force devient importante lorsque le rapport solide/liquide utilisé est plus élevé (Al-Farsi et Lee, 2007).

**CHAPITRE III** : Rappels sur les activités  
biologiques : antimicrobienne et  
antioxydante

## **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

### **III.1. Introduction**

Depuis toujours, les hommes, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes qu'ils avaient à leur disposition pour se soigner contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Ainsi, les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire. Nous pouvons citer comme exemple les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes et les huiles essentielles (Iserin, 2001). On estime que les deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle. De l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité de ces métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites (Newmann et Cragg, 2007). Cependant, sur les 300 000 espèces végétales recensées, seules 15 % d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6 % pour leurs activités biologiques (Verpoorte, 2002), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré. Néanmoins, il faut noter que, d'une part, le nombre d'espèces végétales diminue et que d'autre part, le savoir des médecines traditionnelles tend lui aussi à disparaître progressivement. De ce fait, la recherche de molécules bioactives d'origine naturelle et la mise en évidence de leurs activités biologiques constituent de nos jours, un intérêt scientifique de première importance.

### **III.2. Aperçu sur les propriétés thérapeutiques des plantes médicinales**

Depuis 1970, l'organisation mondiale de la santé (O.M.S) a fait un inventaire des plantes médicinales connues dans 90 pays, en a dénombré environ 20000. Par définition les plantes médicinales sont des végétaux connus pour leurs pouvoirs bienfaiteurs. En d'autres termes, les plantes médicinales sont utilisées pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Cette connaissance ancestrale fut à l'arrivée de la médecine traditionnelle mise de côté au profit de la prise de médicaments d'ordonnance souvent plus puissants et agissant plus rapidement que la médecine traditionnelle utilisée auparavant (Vigneau, 1985). Par contre, aujourd'hui nous assistons au retour de l'utilisation des plantes médicinales pour favoriser la santé, chaque plante médicinale a une réputation pharmaceutique qui lui est propre et une utilisation spécifique (Mamatas, 1984).

Les plantes médicinales ont fourni à la pharmacie des médicaments très efficaces. Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie, nous montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part seraient quasiment dépourvues de toxicité (Gurib-Fakim, 2006).

La phytothérapie souvent associée aux traitements classiques, est le traitement par les plantes ; c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation par voie externe de produits

### **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

préparés à partir de plantes sans passer par une étape de sélection des molécules, on ne consomme donc pas que le principe actif, mais tout ce que contient la plante (Bruneton, 1999). Par ailleurs, la phytothérapie requiert une connaissance parfaite des composants chimiques contenus dans un organe végétal et une bonne connaissance des modes d'emploi et ceci afin de bien cibler et corriger soit les carences soit le déséquilibre qui est lui-même dû à plusieurs facteurs (Flet, 1984).

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse des médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (Decaux, 2002). La tubocurarine, le relaxant musculaire le plus puissant, est dérivé du curare, molécule extraite à partir d'une liane d'Amazonie (*Chondrodendron tomentosum*), la morphine, l'analgésique le plus puissant, est tiré du pavot à opium (*Papaver somniferum*) et la cocaïne utilisée comme anesthésiant, est extraite du coca (*Erythroxylum coca*) (Fouché *et al.*, 2000).

D'après l'étude de Cragg *et al.* (1997), sur 520 nouveaux médicaments approuvés entre 1983 et 1994, 241 étaient d'origine naturelle. Parmi ceux-ci, les médicaments d'origine naturelle sont prédominants dans le domaine des antibactériens (78 %) et des anticancéreux (61 %).

L'exploitation des ressources naturelles, et notamment du monde végétal, est encore capitale à l'heure actuelle. Elle est caractérisée par : une étude chimiotaxonomique qui consiste à rechercher des catégories de molécules actives dans les plantes en fonction de leur appartenance botanique, une étude ethnopharmacologique qui consiste à recueillir des informations sur l'utilisation des plantes auprès des populations et étude pharmacologique caractérisée par l'observation du comportement des plantes dans leur environnement naturel (Boldi, 2004 ; Clardy et Walsh, 2004).

Cependant, il existe des cas pour lesquels une utilisation traditionnelle peut révéler un potentiel intéressant à exploiter en médecine occidentale. Il s'agit des usages des plantes comme antibiotiques, antifongiques, antioxydants, antiseptiques, laxatifs, anticancéreux, analgésiques, psychotropes, vésicants, etc., pour lesquels une preuve scientifique peut être apportée au travers de tests sur une cible appropriée (microorganisme, animal, organe, système enzymatique) (Newman *et al.*, 2003 ; Koehn et Carter, 2005) .

#### **III.3. Activité antimicrobienne**

La colonisation bactérienne chez l'homme débute dès sa naissance pour la mise en place d'une interaction durable entre la flore microbienne formée et l'organisme de l'homme. Cette interaction reste essentielle pour son bien-être et pour son équilibre métabolique (Doré et Corthier, 2010). Le corps d'un Homme adulte comporte environ 10<sup>14</sup> bactéries commensales (soit 10 fois le nombre de ses cellules) qui participent à la mise en place du

## **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

système immunitaire de l'homme et son apport s'étend jusqu'au niveau sensoriel de son organisme (Souza *et al.*, 2004 ; Oliveira *et al.*, 2005). Par ailleurs, la présence de bactéries non bénéfiques altère le fonctionnement de l'organisme. Elles sont responsables de plusieurs maladies infectieuses (Kaper *et al.*, 2004).

Bien que le corps humain dispose d'un système de défense sophistiqué, il peut être submergé par ces micro-organismes dont la fréquence de multiplication est élevée. Pour faire face à ces infections bactériennes, l'homme a recours à des substances d'origine surtout végétale, qui sont capables d'empêcher le développement et la progression de ces bactéries pathogènes sans toutefois présenter une toxicité pour son organisme, d'où l'intérêt de la recherche et le développement de la phytothérapie (Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons *et al.*, 2008).

### **III.3.1. Généralités sur les antibiotiques et les antifongiques**

#### **III.3.1.1. Les antibiotiques**

Les antibiotiques ou antibactériens, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).

Pour classer un antibiotique actuellement, il est fait appel à quatre notions essentielles qui concernent non pas tant son origine que sa nature chimique, son mécanisme d'action, son spectre et ses modalités d'action (Lemozi *et al.*, 1985 ; Le Minor *et al.*, 1989 ; Sirot, 1989) :

Selon la nature chimique : les antibiotiques de nature osidique (holosidiques : aminosides ; hétérosidiques : macrolides, rifamycine, novobiocine, lincomycine, clindamycine), les antibiotiques de nature protidique (chloramphénicol, les bêtalactamines, polymyxine), les antibiotiques de nature lipidique (acide fusidique) et les antibiotiques à cycles condensés (tétracyclines).

Selon le mécanisme d'action : action sur la paroi (bacitracine, vancomycine, ristocétine et bêtalactamines), action sur la membrane cytoplasmique (polymyxines, gramicidine), action sur la réplication de l'ADN (acide nalidixique), action sur la transcription de l'ADN (novobiocine, rifamycine), action sur la traduction de l'ARNm (streptomycine, aminosides, tétracyclines, chloramphénicol, macrolides) et action sur le métabolisme intermédiaire (bêtalactamines, sulfamides, triméthoprim, isoniazide).

Selon le spectre d'action : l'idéal serait d'obtenir un antibiotique capable de détruire toutes les espèces microbiennes pathogènes. Mais l'action varie suivant une répartition limitant ainsi le spectre d'activité qui peut être plus ou moins large. Cette notion de spectre

## **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

rend compte de la sensibilité ou de la résistance naturelle des différentes espèces microbiennes.

Selon la modalité d'action : interviennent alors les notions de bactériostase et de bactéricide. Comme exemples de bactériostatiques nous avons les macrolides, tétracyclines, chloramphénicol, sulfamides, oxyquinoléines et comme bactéricides, les bêtalactamines, aminosides, acide nalidixique, nitrofurannes.

### **III.3.1.2. Les antifongiques**

Les antifongiques constituent un groupe de médicaments destinés à traiter les mycoses provoquées par certaines espèces de champignons responsables de mycoses superficielles (*Candida sp*, les dermatophytes et *Pityriasis versicolor*) ; ou qui sont à l'origine des mycoses profondes (*Aspergillus sp.*, *Candida sp.* et *Cryptococcus sp.*). L'activité antimycosique « *in vivo* » est étroitement liée à la perméabilité du champignon et de la cellule hôte à l'égard des agents antifongiques (Ybert, 2001).

Les médicaments antifongiques se repartissent en deux groupes (Pieri et Kirkiacharan, 1992) :

Les antifongiques systémiques qui sont destinés aux traitements des mycoses profondes : l'amphotéricine B ou Fungizone indiquée dans les mycoses viscérales profondes, les mycoses sous cutanées et cutanées et dans le muguet buccal ; la griséofulvine (Griséofulvine, fulcine forte) et le fluconazol (Triflucan).

Les antifongiques locaux qui constituent les médicaments dont la structure est voisine de celle des précédents, sont employés dans le traitement des mycoses digestives, buccales, vaginales, et cutanées. Comme exemples, nous pouvons citer : la nystatine (Mycostatine) qui a une action remarquable sur les infections généralisées ou localisées à *Candida albicans* et le miconazole (Daktarin), un antifongique systémique et local indiqué dans les candidoses digestives, urinaires, pulmonaires.

### **III.3.1.3. Résistances aux antibiotiques et aux antifongiques**

La résistance aux antibiotiques et aux antifongiques peut être naturelle ou acquise ; la résistance naturelle est présente chez tous les membres d'une même espèce ou d'un même genre bactérien ou fongique, elle est liée à son patrimoine génétique. La résistance acquise résulte d'une modification du patrimoine génétique. Il peut s'agir d'une mutation qui peut entraîner, par exemple, une modification de la cible de l'antibiotique ou de l'antifongique, ou bien diminuer sa pénétration. Le plus souvent, il s'agit de l'acquisition de l'ADN étranger pouvant provenir de la même espèce ou d'espèces bactériennes et de champignons différents. L'acquisition d'ADN se fait le plus souvent par conjugaison. Elle se fait alors par l'intermédiaire de plasmides ou de transposons conjugatifs qui peuvent porter un ou plusieurs gènes de résistance (Gutaman, 1986 ; Nikaido, 1988).

## **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

L'acquisition de mécanismes de résistance aux antibiotiques et aux antifongiques a une expression phénotypique variable. Dans la majorité des cas, elle est détectable par les méthodes habituelles de détermination de la sensibilité des bactéries et des champignons aux antibiotiques et aux antifongiques. On peut classer les mécanismes de résistance en quatre groupes (Courvalin, 1982 ; Carbon *et al.*, 1993) : l'inactivation de l'antibiotique ou de l'antifongique, la modification de la cible de l'antibiotique ou de l'antifongique, la diminution de la perméabilité membranaire et l'excrétion de l'antibiotique ou de l'antifongique.

### **III.3.2. Techniques d'évaluations de l'activité antimicrobienne**

#### **III.3.2.1. La méthode de diffusion sur disque**

La méthode des disques est l'une des plus vieilles approches d'évaluation de la sensibilité des souches microbiennes aux antibiotiques et aux antifongiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en microbiologie (antibiogrammes et antifongigrammes). La technique est basée sur le principe que les agents antimicrobiens, de concentration spécifique de chaque disque, diffuseront dans le milieu et inhiberont la croissance des microorganismes sensibles, résultant en une zone d'inhibition autour du disque. Cette technique utilise des disques de papier buvard imprégnés d'une concentration donnée d'antibiotique déposé à la surface d'une gélose spécifique coulée en boîte de pétri uniformémentensemencée d'une suspension de la bactérie étudiée (Harley *et al.*, 2010).

Le principe de la technique est relativement simple. Lorsqu'un disque imprégné d'antibiotique est placé sur une gélose préalablement inoculée avec la bactérie testée, il s'humidifie et l'antibiotique diffuse relativement dans la gélose, en formant ainsi un gradient de concentration. L'antibiotique est présent en fortes concentrations à proximité du disque et affecte des micro-organismes même faiblement sensibles. Par contre, les organismes résistants se développent jusqu'au disque. Les diamètres des zones d'inhibition permettent d'apprécier la sensibilité des germes. La lecture des résultats est rapportée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions en mm. Les zones doivent être uniformément circulaires (Richard *et al.*, 2007). Dans la technique de diffusion, il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Broadasky *et al.*, 1976).

#### **III.3.2.2. La méthode de dilution**

Le principe de la méthode de dilution en bouillon consiste à diluer directement le produit à tester dans le milieu de culture gélosé solide ou liquide et à inoculer ce milieu avec les microorganismes par la suite. Dans un premier temps, nous distribuons une série de tubes à hémolyse (ou dans les cupules d'une microplaque), sous un même volume, des concentrations décroissantes d'antibiotique (en progression géométrique de 2). Puis nous ajoutons, dans un second temps, dans chacun des tubes (cupules), sous un même volume, des bactéries en phase exponentielle de croissance. Après incubation durant 18 heures, les valeurs des CMI sont mesurées. Cette CMI est la plus petite quantité d'antibiotiques ou d'antifongiques capable d'inhiber une croissance visible à l'œil nu (Alcama, 1984).

## **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

A partir de cette méthode, il est possible de déterminer en plus de la CMI, la concentration minimale bactéricide (CMB) et la concentration minimale fongicide (CMF). Ces deux concentrations sont définies comme étant les plus faibles concentrations d'antibiotique ou d'antifongique qui laisse 0,01 % de survivants au maximum. Ceux-ci sont habituellement appréciés après un temps de contact avec l'antibiotique de 6 à 18 heures (Harley *et al.*, 2010).

### **III.4. Activité antioxydante**

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de produits naturels (Sanchez-moreno, 2002 ; Marc *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2005).

L'utilisation des antioxydants synthétiques dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique est suspectée à long terme d'effets tératogènes, mutagènes et cancérogènes (Chavéron, 1999). Plusieurs limites et restrictions ont été mises en place concernant leur utilisation, leur substitution par des antioxydants naturels s'avère primordial. Les plantes sont une source d'antioxydants naturels. Ces derniers sont apparus comme alternative aux antioxydants synthétiques, et ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs (El Kalamouni, 2010).

#### **III.4.1. Radicaux libres et stress oxydant**

##### **III.4.1.1. Définition, origine et types**

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques (Gauche et Hauswirth, 2006).

Un radical libre est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié sur la couche électronique la plus externe, caractérisé par une instabilité et/ou un pouvoir oxydant fort. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité (Favier, 2003).

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose (Van Antwerpen, 2006). Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Aurousseau, 2002).

### **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome (Li *et al.*, 2002 ; Valko *et al.*, 2006).

Aussi, Les rayonnements UV sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres. D'autre part, l'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, également des antibiotiques, des anticancéreux L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme (Milane, 2004).

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle (OH), le monoxyde d'azote (NO), le radical peroxyde (ROO) et le radical alkoxyde (RO). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires telles que l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le nitroperoxyde (ONOOH), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Favier, 2003 ; Haton, 2005).

#### **III.4.1.2. Dommages oxydatifs**

La production de radicaux chez les organismes vivants est un phénomène normal, régulé par le biais de divers processus chimiques ou enzymatiques de détoxification. En effet l'organisme possède ses propres moyens de défense lui permettant de lutter contre les radicaux libres. Quand ce système de protection perd son efficacité (mutation, inactivation d'enzymes, carence en vitamines...) ou quand le nombre de radicaux libres (pollution, alimentation...) augmente de manière importante, il survient une agression appelée « stress oxydatif » (Rahman, 2002).

Le stress oxydatif peut déclencher une suite d'évènements moléculaires et cellulaires dont les conséquences sont multiples : réponse inflammatoire, modulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire et même la mort cellulaire. Ainsi, Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (Aurousseau, 2002 ; Valko *et al.*, 2006).

Aussi, il est à présent reconnu que le stress oxydant est un facteur d'inflammation, de mutagenèse et qui peut jouer un rôle dans le développement de nombreux cancers. Il est également impliqué dans beaucoup d'autres maladies (Aruoma, 1998). Parmi lesquelles, nous citons, les maladie d'Alzheimer (Smith *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 2004), de Parkinson (Bolton *et al.*, 2000), de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites (Ali *et al.*, 2008), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (Jha *et al.*, 1995), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Georgetti *et al.*, 2003) et le cancer (Ali *et al.*, 2008)

## **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

### **III.4.2. Antioxydants**

#### **III.4.2.1. Définition et mécanisme d'action**

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Shimizu, 2004).

Les antioxydants agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Haton, 2005).

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit. En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable (Haton, 2005).

#### **III.4.2.2. Classification**

Les antioxydants sont classés dans trois différentes catégories :

##### **III.4.2.2.A. Antioxydants synthétiques**

Parmi les antioxydants phénoliques de synthèse qui sont autorisés dans certains aliments : le BHT 321 (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), BHA 320 (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), sont l'un et l'autre soluble dans les lipides et résistent bien à la chaleur. Ils ont une action synergique, ils présentent l'inconvénient d'avoir une odeur désagréable et s'évapore rapidement. L'utilisation du BHT et du BHA est actuellement remise en question en raison des risques toxicologiques de ces deux composés (Just *et al.*, 2005).

Le TBHQ (tertiobutyl-hydroxyquinone) est moins soluble dans les graisses et le PG (gallate de propyle) à l'avantage d'être relativement soluble dans l'eau, mais l'inconvénient d'être peu soluble dans les lipides, peu résistant à la chaleur et de donner avec le fer des sels de couleur foncée (Osawa *et al.*, 1995). Le nitrite présente des propriétés anti oxydantes, il peut aussi former des nitrosamines cancérigènes (Sugiyama *et al.*, 1996). Les chélateurs de métaux utilisés et plus efficaces sont les polyphosphates et les dérivés d'acide citrique (Nakamura *et al.*, 1998).

## **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

### **III.4.2.2.B. Antioxydants synergiques**

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants. Ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection, parmi eux se trouvent : les acides lactique, tartrique et ortho phosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants.

### **III.4.2.2.C. Antioxydants naturels**

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : l'acide ascorbique, les tocophérols, les composés phénoliques, les caroténoïdes...etc. Ils peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et ont également une capacité de lier les acides gras libres (Maydani, 2000a).

La vitamine E est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement et la diminution de l'athérosclérose (Maydani, 2000b). La vitamine E joue un rôle important dans l'agrégation de la  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ), d'ailleurs, les données cliniques ont prouvé que les patients d'Alzheimer obtiennent des avantages remarquables au traitement par la vitamine E (Pieroni *et al.*, 2002). Il a été déterminé que la vitamine E naturelle, semble être deux fois plus biodisponible que la vitamine E synthétique (Burton *et al.*, 1998). La vitamine E est rencontrée surtout dans les huiles végétales, les noix et les germes de diverses graines.

Les caroténoïdes sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits, empêchent les dommages génétiques, protègent contre les dommages oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication, empêchent l'expression des oncogènes, augmentent l'activité de communication des gap junctions (Mortensen *et al.*, 2001). Les exemples de caroténoïdes, incluent l'alpha carotène, bêta carotène, lycopène, phytofluène, phytoène, lutéine, neoxanthine, viloxanthine, anthéroxanthine, alpha cryptoxanthine et bêta cryptoxanthine. Leur structure polyène leur permet d'absorber la lumière et de neutraliser l'oxygène singulet. Cette chaîne polyène, par mécanisme d'addition, permet l'incorporation des espèces réactives ou radicaux libres et de ce fait ralentir leur propagation (El-Agamey *et al.*, 2004). Les caroténoïdes sont impliqués dans la prévention de nombreux types de cancer ; cancer de la prostate ; cancer du poumon (Hale, 2003).

La vitamine C est largement répandue dans les fruits, son influence sur les dégâts protéiques a été examinée dans des études d'apports de suppléments, principalement sur des modèles de rats et il y a eu quelques essais chez l'homme. De façon intéressante, de supplémenter des volontaires sains pendant 5 semaines avec de la vitamine C n'a aucun

### **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

effet (Valko *et al.*, 2006, Van Antwerpen, 2006). Cependant, après 10 et 15 semaines de traitement, les taux de carbonyles ont été significativement abaissés (Carty *et al.*, 2000). Ceci suggère que les autres études, qui n'ont pas réussi à trouver une influence de l'apport de suppléments antioxydants, devraient être prolongées sur une plus longue durée. L'apport de suppléments de vitamine C prévient également des dégâts oxydatifs sur les protéines induits par la fumée de cigarettes (Panda *et al.*, 1999). Des études animales avec du  $\beta$ -carotène (Sarkar *et al.*, 1995) et de l'acide  $\alpha$ -lipoïque (Cakatay *et al.*, 2000) ont aussi démontré qu'ils empêchaient les dégâts protéiques.

L'acide alpha-lipoïque, lorsqu'il fut isolé il y a cinquante ans, l'acide alphas-lipoïque fut identifié comme vitamine. Il a depuis été reclassé comme antioxydant et peut piéger les radicaux libres aux niveaux intracellulaire et extracellulaire (Smith *et al.*, 2004 ; Valko *et al.*, 2006). Du fait qu'il est aussi bien liposoluble qu'hydrosoluble, il peut accéder à toutes les parties de nos cellules (Packer, 1995). L'acide lipoïque réduit la glycation et favorise le transfert du glucose sanguin aux cellules en stimulant l'activité insulinaire (Kahler *et al.*, 1993).

#### **III.4.2.3. Techniques d'évaluation de l'activité antioxydante**

Cette dernière décennie a connu une véritable explosion d'articles scientifiques sur les antioxydants naturels. De très nombreuses études à travers le monde ont démontré l'implication des antioxydants dans la lutte contre diverses pathologies chroniques, telles que le diabète, l'obésité, les maladies neurodégénératives, cancers, etc. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante (Prior *et al.*, 2005). Ces méthodes diffèrent entre elles selon la nature des radicaux libres, ainsi que selon les techniques analytiques impliquées dans le fonctionnement des processus d'oxydations (Magalhaes *et al.*, 2008). Nous décrivons ci-dessous quelques méthodes d'analyse les plus utilisées *in vitro* pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

##### **III.4.2.3.A. Test de réduction du radical stable, DPPH**

La capacité antioxydante peut être aussi mesurée en utilisant des radicaux libres plus stables. Le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette (Brand-Williams *et al.*, 1995). Le maximum de son absorption se situe vers 515 nm dans le méthanol et l'éthanol (Dangles *et al.*, 1999). Par cette méthode, nous considérons que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeur des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale.

Plus un composé a la facilité de céder son atome d'hydrogène, plus celui-ci est jugé efficace comme antioxydant. Le pourcentage du DPPH restant est proportionnel à la concentration de l'antioxydant. La concentration du composé antioxydant nécessaire pour atteindre une disparition de 50 % du DPPH à l'équilibre est connue comme la  $CE_{50}$ .

## **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

Sanchez-Moreno *et al.* (1998) ont proposé un autre paramètre pour mesurer l'efficacité antiradicalaire (EA) où le  $TC_{50}$  est le temps nécessaire pour arriver à l'état d'équilibre en utilisant la  $CE_{50}$ . La méthode du DPPH a été utilisée par de nombreux auteurs pour étudier les extraits végétaux et alimentaires et mesurer leur capacité antioxydante totale. Cette méthode est rapide et peu coûteuse, c'est un simple procédé de spectrophotométrie.

### **III.4.2.3.B. Test de blanchiment : $\beta$ -carotène/acide linoléique**

Le  $\beta$ -carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation ; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation. L'absorbance du  $\beta$ -carotène est mesurée à 470 nm avec et sans antioxydant (Goupy *et al.*, 1999).

Le  $\beta$ -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits (Bougatef *et al.*, 2009). Cependant, dans le test du blanchiment du  $\beta$ -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le  $\beta$ -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueuse en résultant le blanchiment du  $\beta$ -carotène (Unten *et al.*, 1997). La présence des antioxydants comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du  $\beta$ -carotène en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système.

### **III.4.2.3.C. Test de réduction du fer (FRAP)**

La méthode de FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), a été initialement développée pour mesurer la capacité antioxydante du plasma sanguin, ensuite le test a été généralisé aux études des pouvoirs antioxydants des extraits de plantes (Iris *et al.*, 1999; Nilsson *et al.*, 2005). Le dosage consiste à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)] de couleur jaune en complexe ferreux [(Fe(II)-TPTZ)] de couleur bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron. La variation de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 593 nm, toutes les 15 secondes durant une durée n'excédant pas les 10 minutes (Benzie *et al.*, 1999). Le pouvoir réducteur d'un composé est associé à son pouvoir antioxydant, une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur. Ce test est rapide et donne des résultats répétables pour des solutions biologiques ou pour des solutions pures d'antioxydants (Hubert, 2006).

### **III.4.2.3.D. Test de capture des radicaux peroxydes: ORAC et TRAP**

L'AAPH, 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure, est un générateur hydrophile de radicaux libres. Deux tests utilisent l'AAPH : TRAP et ORAC.

Dans le test TRAP (total radical trapping antioxidant potential), l'AAPH est solubilisé en milieu aqueux avec l'antioxydant et un indicateur qui devient luminescent lorsqu'il est oxydé à 37°C, comme le luminol. La capacité des antioxydants à bloquer l'oxydation de l'indicateur

### **CHAPITRE III Rappels sur les activités biologiques : antimicrobienne et antioxydante**

est comparée à celle du Trolox donnant une valeur TRAP. Ce test est utilisé pour déterminer la capacité antioxydante du plasma et du sérum sanguin (Schlesier *et al.*, 2002).

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), s'impose comme une méthode de référence pour tester la capacité antioxydante *in vitro* (Crichton *et al.*, 2002). Il est applicable aux solutions biologiques comme le plasma sanguin et des extraits de fruits et légumes (Prior *et al.*, 2003). Il permet de mesurer séparément, à partir d'une même solution biologique, la capacité antioxydante des composés hydrophiles et lipophiles qui la composent, après séparation par une extraction à l'hexane. Plus l'indice d'ORAC est élevé plus la capacité antioxydante du produit est forte (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

## **Partie expérimentale**

# **CHAPITRE I : Présentation des sites d'études**

### I.1. Introduction

En 1948, Boudy note que l'Oranie présente certaines particularités en disant : " nous entrons en Oranie, qui est un monde à part, avec un paysage un peu steppique attesté par la présence d'alfa et de lacs salés (sebkha). Le drainage de la plaine est insuffisant. L'érosion y est en lutte avec le soulèvement orogénique car le pays n'a pas encore acquis son relief définitif, d'où de graves inondations par défectuosité du modèle". Thinthoin (1948) divise l'Oranie en cinq parties : *les reliefs littoraux ou sahels* ; *les plateaux néogènes* qui forment avec les basses plaines un seul ensemble communiquant avec le littoral ; *l'atlas plissé* constitué d'est en ouest des monts de Béni Chougrane, des Ouled Ali et des monts du Tessala, qui forme une barrière difficilement franchissable à l'exception de quelques brèches qu'empruntent les oueds El Hammam, Mektoub, Mékerra et Isser ; *les hautes plaines telliennes* représentées par celle de Sidi Bel Abbès et Sidi Ali Benyoub s'étendant au sud de l'atlas plissé et communiquent avec les basses plaines littorales ; *l'atlas tabulaire* comprenant trois groupes de monts d'est en ouest : les monts de Saïda, les monts de Dhaya, les monts de Tlemcen ; il constitue une barrière entre les hautes plaines steppiques et les hautes plaines telliennes.

### I.2. Contexte géographique

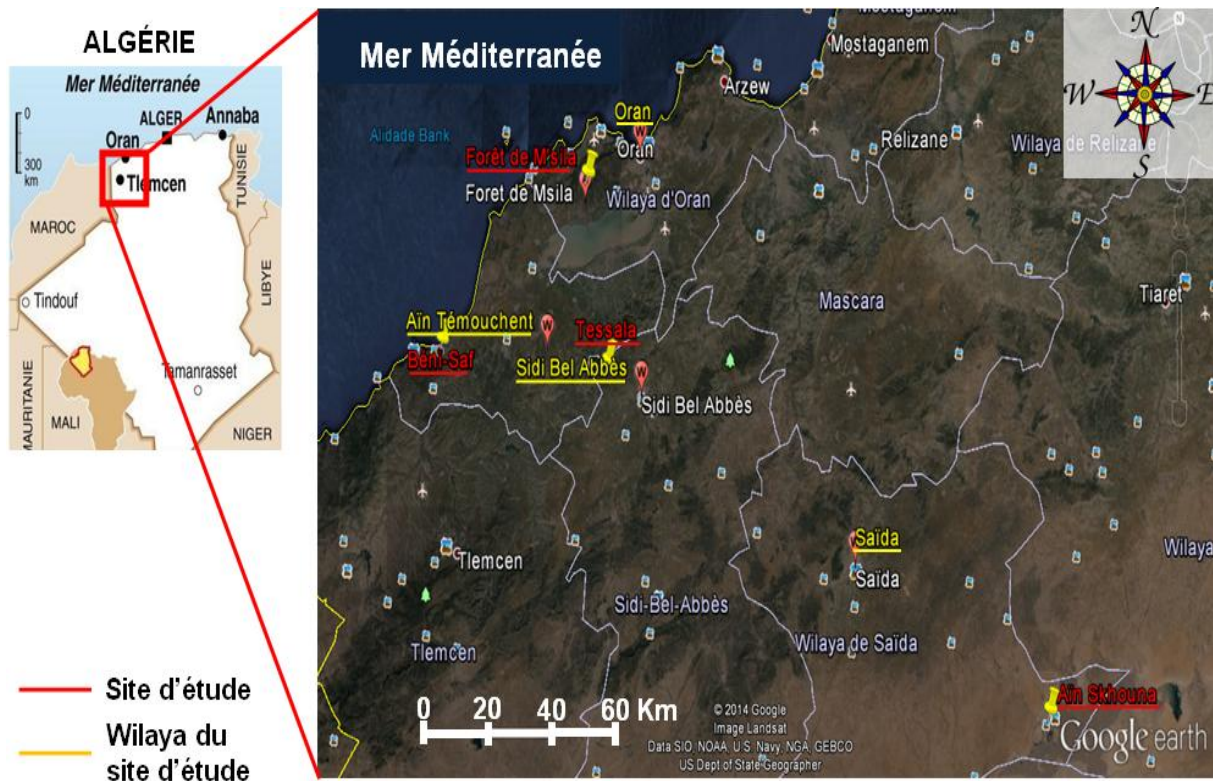
Les monts de Tessala sont situés à 15 km au nord-ouest de la ville de Sidi Bel Abbés, limités au nord par la plaine de la Mleta et la Sebkha d'Oran, à l'est par les monts de Beni chougrane, à l'ouest par les monts de Sebaa Chioukh et au sud par la plaine de Sidi Bel Abbés. Ces monts se prolongent entre trois communes : Tessala, Ain Trid et Sehala (Ferka-Zazou, 2006).

La forêt de M'Sila se situe à 30 km à l'ouest de la ville d'Oran, couvrant une superficie de 1570 ha. Elle est limitée par les communes d'Aïn Kerma à l'ouest et de Messereghine à l'est, au nord par les commune d'El Ançor et les Andalouses, au sud par le peuplement de Terziza. Elle fait partie de la Circonscription Forestière d'Oran et du District de Boutlélis (C.F.W.O, 1996).

La commune de Béni Saf appartient au littoral ouest à environ 30 km de la ville d'Aïn Témouchent et 120 km au sud-ouest d'Oran, elle couvre une superficie de 61,62 Km<sup>2</sup> soit 6 162 Ha. Elle est partagée entre la frontière avec la commune de Sidi Safi à l'Est, la commune d'Emir Abdel Kader au Sud, la commune d'Oulhaça et Oued Tafna à l'ouest, et la mer Méditerranéenne au Nord (Hassani, 2013 ; Merioua, 2014).

La commue de Aïn Skhouna est située à 85 Km au sud-est de la ville de Saïda, localisée administrativement dans la daïra d'El Hssasna, elle est limitrophe au nord et à l'est par la wilaya de Tiaret, au sud par la wilaya d'El Bayadh et à l'ouest par la commune d'El Maamoura (Morsli *et al.*, 1989).

La localisation géographique des différents sites d'étude est représentée dans la figure 6.



**Figure 6** : Carte de situation géographique des sites d'étude (établie par Google earth, 2014)

### I.3. Orographie et hydrographie

Dans les monts de Tessala, les pentes de 12% à  $\geq 25\%$  sont les prédominantes. Ces deux classes de pente occupent à elles seules presque 80% de la totalité des monts et donnent des formes ondulées du relief. En effet sur les terrains à forte déclivité (pente supérieure à 25%), la morphosyntaxe est très marquée essentiellement par l'érosion linéaire (ravinement) et là où les terrains ne sont pas boisés (forêt ou maquis) (Benabdeli, 1996). Ces monts se rapportent au domaine Tellien, ils s'étendent dans la direction du sud-ouest et nord-est en passant à l'est, ils s'associent à Beni Chougrane. Les cotes varient largement, elles ont des valeurs maximales dans les parties sud-ouest (avec 1061m), la chaîne s'arrête abruptement à côté de la plaine de Mléta. Au sud et au sud-est s'étend la plaine de Sidi Bel Abbès dont les altitudes varient de 400 à 500m, elle est caractérisée par un relief très peu accidenté (Benyahia *et al.*, 2001). Dans les monts de Tessala, la pente au sud se caractérise par un relief doux avec les oueds saisonniers, les ravins plus profonds et les lignes de crêtes. Par contre, vers le nord elle se caractérise par des vallées profondes, étroites et des oueds permanents ainsi que des entailles nettement visibles dans les ravins (Pouquet, 1952).

La forêt de M'Sila est caractérisée par un relief moins accidenté avec un terrain plat sans pentes abruptes (pentes inférieures à 3 %). Dans certains endroits (au sud surtout), les ruptures de pente (supérieures à 25 %) entraînent souvent des phénomènes d'érosion. La presque totalité de la forêt dispose d'un plateau sans orientation particulière où dominent les peuplements denses et clairs de chêne liège d'autres peuplements de moindre superficie existent également sur le versant nord. La forêt qui se trouve entre 260m d'altitude au nord-est et 568m au sud-ouest se caractérise par un important dénivelé d'environ 308m (A.E.F.C.O., 1961). Le massif est drainé donc par un réseau hydrographique à orientation NE-NO comprenant 6 oueds (oued Guedara, oued N'Saris, oued Dith, oued Djorf Halia, oued Bensabia, oued Hassan et oued Seggai) et un seul ravin très profond qui coule dans la plaine de Bousfer.

Le massif de Béni Saf à substratum volcanique et schisteux où se dressent des replats formés de sols iso-humiques peu profonds. La topographie est marquée par une pente qui varie entre 3 % et 25 %. La basse Tafna dans l'ouest de la commune est formée de sols alluvionnaires. La topographie est généralement de faible pente (3 %). L'est de la commune est marqué par de légères ondulations, formé de sols calcaires moyens profonds avec une pente de 3 % à 12 %. La situation géographique spécifique de la commune de Béni Saf (littoral), nous amène à remarquer plusieurs classes d'altitudes, de zéro mètre au bord de la mer, jusqu'à 409 m (Djebel Skhouna) au sud, qui représente le point le plus élevé de la région. L'exposition joue un rôle important dans la répartition des végétaux. Les versants tournés vers le nord (en face de la mer) sont en général plus humides et moyennement ensoleillés, tandis que les versants dirigés vers le sud sont plus ou moins secs. La commune de Béni Saf constitue un exutoire d'un ensemble géographique à relief très accidenté où le réseau orographique est fortement densifié. Parmi ces cours d'eau nous notons : la confluence de Oued Boudali et Oued Ansar drainant la partie est vers Sidi Safi, les Oueds de Saf Saf, Benhassini et Segla drainant la partie sud de Béni Saf et les Oueds de Midah et Chelel drainant la partie ouest de la ville.

Dans la commune de Aïn Skhouna, le Chott Chergui est la plus importante ressource en eau. C'est un bassin fermé, formé de reliefs peu accusés. La hauteur moyenne des eaux est de 250 mm environ, dont une partie s'infiltré dans le sol et, par des circulations souterraines, tend à gagner la partie basse de la cuvette. Les terrains argileux sableux qui surmontent les calcaires créent, d'autres part, un obstacle à la sortie des eaux. On distingue des sources d'eau qui coulent toute l'année et forment des mares à biotopes spécifiques. Les eaux sont en général thermales, la minéralisation est supérieure à 1 g/l, sans toutefois dépasser les 2 g/l ou 3 g/l (Nourredine, 2001).

#### I.4. Pédologie

Le sol est l'élément principal de l'environnement, il règle la répartition de la végétation et se développe en fonction de la nature de la roche mère, la topographie et les caractéristiques du climat (Ozenda, 1954).

Les sols dans le mont de Tessala sont généralement pauvres, à affleurement rocheux, de profondeur faible, leur texture est fine. Par ailleurs, les lithosols et les régosols se localisent sur les versants pointus. Selon Pouquet (1952), quatre différents types de sol caractérisent la commune de Tessala :

- des sols à sesquioxydes de fer (sols rouges ou bruns rouges) caractérisés par une texture équilibrée et une structure grumeleuse et qui sont peu affectés par l'érosion et essentiellement touchés par le décapage. Ces sols sont occupés par des cultures céréalières et fourragères, représentant une grande valeur agricole,
- des sols bruns calcaires avec une profondeur inférieure à 50cm et de texture lourde et structure polyédrique fine, les pierres de surface y sont nombreuses. Ces sols portent des céréales et des jachères,
- les vertisols (couleur noirâtre ou brun foncé) caractérisés par profondeur qui varie entre 30 et 50cm, une texture limono-argileuse et une structure grumeleuse, localisés aux bas versants et sont colonisés par les céréales, des fourrages et de la jachère,
- les lithosols et les régosols qui se localisent sur les versants à forte pente avec une profondeur ne dépassant qu'exceptionnellement les 30 cm (Ferka-Zazou, 2006).

La forêt de M'Sila s'élève sur un sol très profond (supérieur à 2m). Généralement, c'est un sol pauvre, d'une texture argilo-siliceuse, provenant de la décomposition des schistes et quartzites néocomiens et de désagréments des grès sableux pliocènes (Thintoin, 1948). Quatre types de sol sont définis par Aime (1991) : les sols rouges sur formation quartzique, les sols rouges décarbonatés sur grès calcaire, les sols rouges tirsifiés et les sols polycycliques.

Dans la commune de Béni Saf, deux types de sols s'individualisent : des sols peu évolués d'apport (très répandus dans la commune de Béni Saf) formés essentiellement par des sols colluviaux brunifiés sur roche mère généralement marne schisteuse ou calcaire, de couleur foncée, riches en matières organiques, en éléments grossiers (cailloux et graviers), bien aérés, dotés d'une texture limoneuse et structure instable ; des sols bruns calcaires sur roche mère marne schisteuse ou grès calcaire avec un horizon superficiel généralement de couleur brune qui devient clair jusqu'à l'horizon inférieur, très bien aéré en surface, fortement calcaire (taux de  $\text{CaCO}_3 > 40\%$ ), pauvre en matière organique avec dominance de la texture limoneuse en surface et argileuse en profondeur, et une structure polyédrique (Merioua, 2014).

Dans la commune d'Aïn Skhouna, les terres appartiennent aux sols désertiques, squelettiques et steppiques à texture légère et légèrement saline ; ils sont couverts d'une végétation dégradée, représentée par d'immenses plages de salsolacées au niveau du chott Chergui (Nourredine, 2001).

### **I.5. Cadre climatique**

En région méditerranéenne, le climat est un facteur déterminant en raison de son importance dans l'établissement, l'organisation et le maintien des communautés animales et végétales. Le climat méditerranéen est également défini comme un climat extra-tropical à photopériodismes saisonnier et quotidien, à pluviosité concentrée durant les saisons froides ; l'été, saison plus chaude, étant plus sec (Emberger, 1955).

Selon Benabdeli (1996), l'Oranie est caractérisée par un climat relativement sec sur l'ensemble de la région, la pluviométrie est généralement inférieure à 500 mm (à l'exception des hauteurs et des monts de Tlemcen où elle atteint 800 mm. Une tranche pluviométrique insuffisante est le plus souvent mal répartie. Le régime pluviométrique le plus fréquent présente un maximum hivernal et automnal. La période de sécheresse atteint le plus souvent sept mois surtout au sud des chaînes de l'Atlas tellien et varie de cinq à sept mois plus au nord, notamment sur les plaines intérieures et chaînes telliennes.

La connaissance du climat est l'élément fondamental de l'approche du milieu, il est basé essentiellement sur les températures et les précipitations du fait qu'elles constituent les facteurs limitant, mais cela n'exclut pas l'influence d'autres composants comme la neige, le vent et les gelées.

#### **I.5.1. Choix des stations météorologiques**

Pour caractériser au mieux le climat de nos sites d'étude, deux paramètres climatiques sont pris en considération : les précipitations et les températures. Nous avons recueilli des données anciennes qui proviennent principalement de Seltzer (1946) s'étalant de 17 à 25 ans : 1919-1936 (forêt domaniale de M'sila), 1913-1934 (commune de Béni Saf), de 1913-1938 (mont de Tessala). Concernant la commune de Aïn Skhouna, nous n'avons pas trouvé de données anciennes.

Les données récentes s'étendant sur une période de 33 ans (1980-2013) nous ont été fournies par les stations météorologiques les proches de nos sites d'étude et par certains établissements comme l'Institut National de la Protection des Végétaux de Messerghine (I.N.P.V), l'Agence Nationale des Ressources hydrique (A.N.R.H) et l'Office Nationale de Météorologie (O.N.M, 2013). Les caractéristiques de ses stations de référence ainsi que les périodes d'observation sont mentionnées dans le tableau 5.

**Tableau 5** : Caractéristiques des différentes stations météorologiques

Sites	Stations météorologiques	Longitude	Latitude	Altitude (m)	Wilayas	Période d'observation
M'sila	El Ançor	0°52' W	35°41' N	90	Oran	AP (1919-1936)
						NP (1980-2013)
Béni Saf	Béni-Saf	1°21'W	36°18' N	65	Aïn Témouchent	AP (1913-1934)
						NP (1980-2013)
Tessala	Sidi Bel Abbès	00°38'W	35°11'N	486	Sidi Bel Abbès	AP (1913-1938)
						NP (1980-2013)
Aïn Skhouna	Rebahia	00°09'E	34°52'N	750	Saida	NP (1980-2013)

AP : ancienne période ; NP : nouvelle période.

Notre étude climatique repose sur deux niveaux d'analyses, le premier est un examen des paramètres analytiques (températures, précipitations) ; le deuxième est synthétique où des indices bioclimatiques et des représentations graphiques sont utilisés.

### I.5.2. Précipitations (P mm)

Les précipitations représentent la source principale d'eau nécessaire pour une production de la biomasse, caractérisées par trois principaux paramètres : leur volume, leur intensité et leur fréquence qui varient selon le jour, les mois et aussi selon les années (Guyot, 1997).

Djebaïli (1978) définit la pluviosité comme étant le facteur primordial qui permet de déterminer le type de climat. En effet, celle-ci conditionne le maintien et la répartition du tapis végétal d'une part, et la dégradation du milieu naturel par le phénomène d'érosion d'autre part ; notamment, au début du printemps.

**Tableau 6** : Répartition mensuelle et annuelle des précipitations moyennes (exprimées en mm) des différents sites d'étude

Sites	Périodes	Jan.	Févr.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept	Oct.	Nov.	Déc.	PMA
Tessala	NP	47,6	35	44,8	34,1	24	3,1	1,3	1,4	20,9	43,3	49,6	47,2	352,6
	AP	83	82	63	51	42	12	1	3	16	46	88	94	581
M'sila	NP	54,5	47,8	40,7	32,4	25,1	4,6	0,4	1,3	11,8	38,8	66,1	63,1	387,1
	AP	71,3	59,4	48,6	40	31,3	10,8	1,1	3,2	20,1	44,3	82,1	86,6	498,8
Béni Saf	NP	51,2	52,7	36,8	33,1	21,5	5,7	2,7	3,1	17,2	33,9	62,3	36,7	357,2
	AP	49	40	37	30	24	9	1	2	15	39	57	68	371
Aïn Skhouna	NP	34,4	24,1	28,2	29,6	31,2	7,4	7,2	6,1	24,9	48,9	33,2	36,4	311,6

PMA : précipitations moyennes annuelles.

La répartition des précipitations (Tab. 6) dans les différents sites d'étude montrent que :

- pendant l'ancienne période, des pluviosités maximales respectives de 94 mm, 86,6 mm et 36,4 mm sont notées durant le mois décembre dans le mont de Tessala, la forêt domaniale de M'sila et la commune Béni Saf. Des précipitations moyennes annuelles de 581 mm, 498,8 mm et 371 mm sont enregistrées respectivement dans le mont de Tessala, la forêt domaniale de M'sila et la commune de Béni Saf,

- pendant la période récente, des pluviosités maximales de 49,6 mm, 66,1 mm et 62,3 mm sont enregistrées durant le mois de novembre dans le mont de Tessala, la forêt domaniale de M'sila, les deux communes de Béni Saf et d'Aïn Skhouna respectivement. Des précipitations moyennes annuelles de 352,6 mm, 387,1 mm, 357,2 mm et 311,6 mm dans le mont de Tessala, la forêt domaniale de M'sila, les deux commune de Béni-Saf et d'Aïn Skhouna respectivement.

### I.5.3. Températures (T °C)

La température est le second facteur constructif du climat, elle est considérée comme un facteur écologique fondamental et un élément vital pour les formations végétales. C'est un facteur exerçant une action écologique importante sur les être vivants (Peguy, 1970).

La caractérisation de la température en un lieu donné se fait généralement à partir de la connaissance des variables suivantes : les températures maximales (M), les températures minimales (m) et les températures moyennes mensuelles.

**Tableau 7** : Répartition mensuelle et annuelle des températures moyennes (exprimées en °C) des différents sites d'étude

Sites	Périodes	Jan.	Févr.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	TMA
Tessala	NP	8,7	10,6	11,8	13,4	17,6	22,4	26	26,3	22,4	18,1	12,6	9,6	16,6
	AP	7,5	9,5	10,5	13	16	20	23,5	22,5	20,5	15,5	11,5	8,5	14,8
M'sila	NP	11,2	12,4	13,8	15,8	17,9	21,4	23,6	24,8	22,7	20,2	15,1	12,3	17,6
	AP	11,1	11,6	12,8	14,9	16,7	19,6	22,7	23,5	21,3	18,1	14,3	12	16,5
Béni Saf	NP	13,2	13,7	15,1	16,8	19	21,6	18,8	24,2	22,4	20,5	17,1	13,2	17,9
	AP	12,9	13	14,4	15,5	18,3	22,1	24,3	25	22,9	19,7	16,3	13,9	18,1
Aïn Skhouna	NP	7	8,6	10,2	13,1	19,5	23,4	25,9	26,5	21,7	16,2	10,5	7,9	15,8

**TMA** : température moyenne annuelle.

La répartition des températures (Tab. 7) dans les différents sites d'étude montrent que :

- pendant l'ancienne période, des températures mensuelles maximales de 23,5 °C, sont enregistrées respectivement pendant le mois d'août dans le mont de Tessala et la forêt domaniale de M'sila et, de 25°C pendant le même mois dans la commune de Béni-Saf. Des températures mensuelles minimales de 7,5 °C, 11,1 °C et 12,9 °C sont notées pendant le mois de décembre dans le mont de Tessala, la forêt domaniale de M'sila et la commune de Béni Saf respectivement. Les températures moyennes annuelles de 14,8 °C, 16,5 °C et 18,1 °C sont enregistrées respectivement dans le mont de Tessala, la forêt domaniale de M'sila et la commune de Béni Saf ;
- pendant la nouvelle période, des températures mensuelles moyennes maximales de 26,3 °C, 24,8 °C, 24,2 °C et 26,5 °C, sont enregistrées durant le mois d'août dans le mont Tessala, la forêt domaniale de M'sila, la commune de Béni Saf et Aïn Skhouna respectivement. Des températures mensuelles minimales respectives de 8,7 °C, 11,2 °C, 13,2 °C et 7 °C relevées au mois de janvier respectivement pour le mont de

Tessala, la forêt domaniale de M'sila, la commune de Béni-Saf et Aïn Skhouna. Les températures moyennes annuelles sont de 16,6 °C, 17,6 °C, 17,9 °C et 15,8 °C enregistrées dans mont Tessala, la forêt domaniale de M'sila et les deux communes de Béni Saf et d'Aïn Skhouna respectivement.

#### **I.5.4. Synthèse climatique**

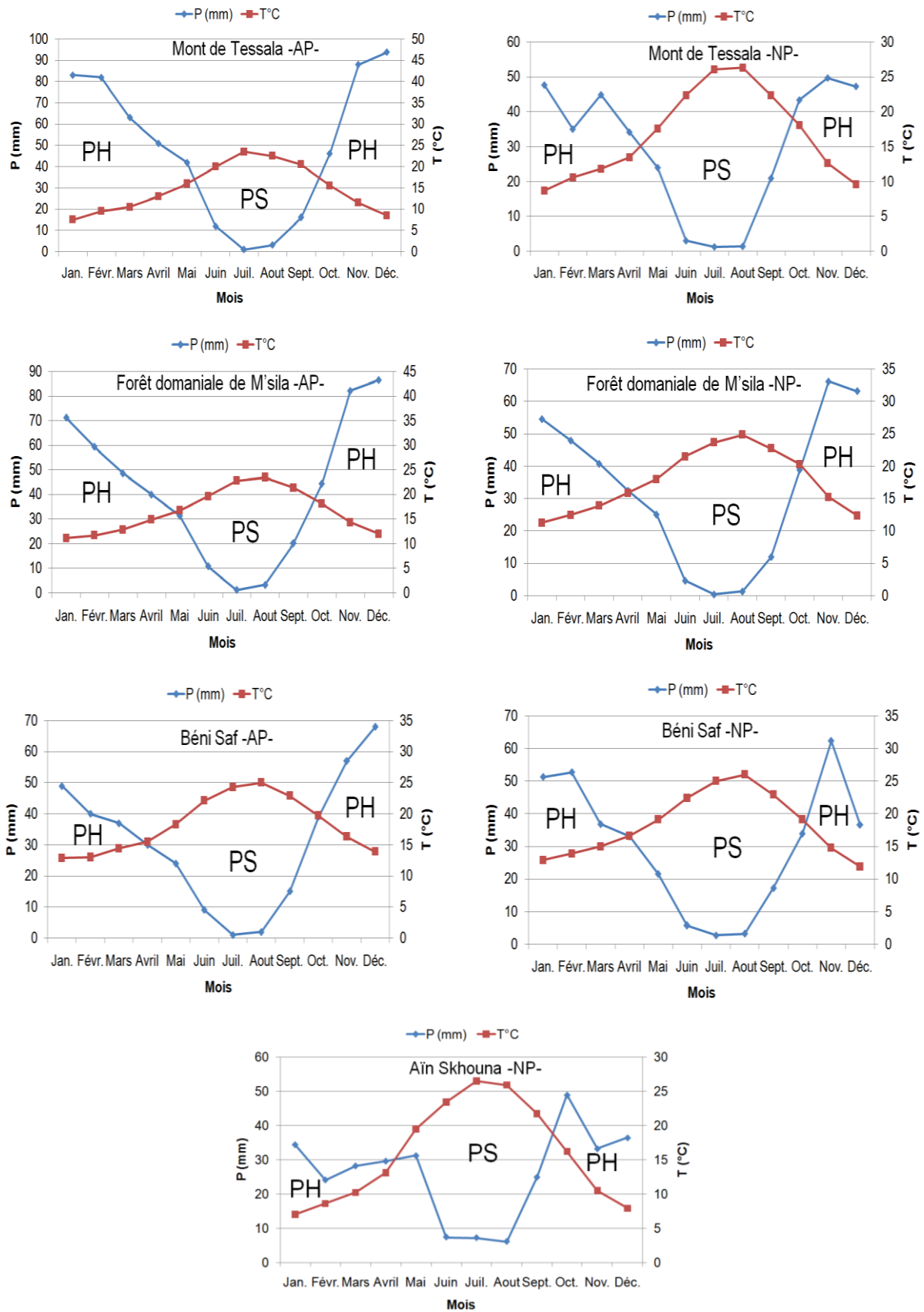
Les facteurs climatiques n'ont une véritable indépendance ni en météorologie, ni en écologie d'où l'intérêt des formules climatiques proposées par les auteurs pour une étude synthétique du climat recherchant une classification des types de climat qui puisse rendre compte au mieux du comportement de la végétation (Sauvage, 1960). En effet, la synthèse bioclimatique est une étape indispensable à tout projet relatif à l'environnement, elle conditionne par le biais de ses composantes, le type de climat et de la couverture végétale. Sur le plan théorique, la synthèse bioclimatique se justifie par l'importance primordiale de ces deux facteurs (précipitation et température) pour les plantes et sur le plan pratique par la qualité des résultats obtenus.

Dans la présente synthèse, nous retenons particulièrement : le diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen, le régime saisonnier des précipitations, le coefficient relatif de Musset, l'amplitude thermique ou indice de continentalité, l'indice de sécheresse estivale, le quotient pluviométrique d'Emberger et l'indice d'aridité de De Martonne.

##### **I.5.4.1. Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen**

Pour visualiser le diagramme ombrothermique, Bagnouls et Gaussen (1953) proposent une méthode simple et efficace qui consiste à porter sur un même graphe la température et la pluviométrie moyenne mensuelle de sorte que l'échelle des précipitations soit double des températures ( $P = 2T$ ). Selon Bagnouls et Gaussen (1953), un mois est dit sec si le total mensuel des précipitations exprimées en millimètres est égal ou inférieur au double de la température moyenne exprimée en degrés centigrades.

Une combinaison des données pluviométriques et des températures est très intéressante pour caractériser l'influence du climat sur la région dans la mesure où le diagramme ombrothermique est conçu de façon que les courbes se croisent au début et à la fin de la saison sèche. La surface comprise entre les deux courbes indique la sévérité de la sécheresse, la partie de la courbe située au dessous de cette limite correspond à la saison humide.



PH : période humide ; PS : période sèche

Figure 7 : Diagrammes ombrothermiques (P = 2T) des différents sites d'étude

L'établissement des diagrammes ombrothermiques (Fig. 7) des différents sites d'étude fait ressortir les caractéristiques suivantes :

- durant l'ancienne période (AP), la période humide s'étend sur environ sept mois dans le mont de Tessala, six mois et demi dans la forêt domaniale de M'sila et six mois dans la commune Béni Saf,
- durant la nouvelle période (NP) apparaît une nette période de sécheresse qui s'étend sur tout l'été, partiellement sur le printanière et l'automne, soit de la fin d'avril à la mi-octobre dans le mont de Tessala ; de la mi-avril à la mi-octobre dans la forêt domaniale de M'sila, de la mi-avril à la fin d'octobre dans la commune de Béni Saf et du fin avril au début octobre dans la commune d'Aïn Skhouna.

#### **1.5.4.2. Régime saisonnier des précipitations (RS) et coefficient relatif de Musset (Crs)**

Le régime saisonnier consiste à un aménagement des saisons par ordre décroissant des précipitations, ce qui permet de définir un indicatif saisonnier, en désignant chaque saison par les initiales P, H, E et A respectivement pour le printemps, l'hiver, l'été et l'automne Chaâbane (1993). Cette répartition saisonnière est particulièrement importante dans la physiologie de la végétation (Corre, 1961).

Le coefficient relatif de Musset est calculé par la formule :

$$Crs = [Ps \times 4] / Pa$$

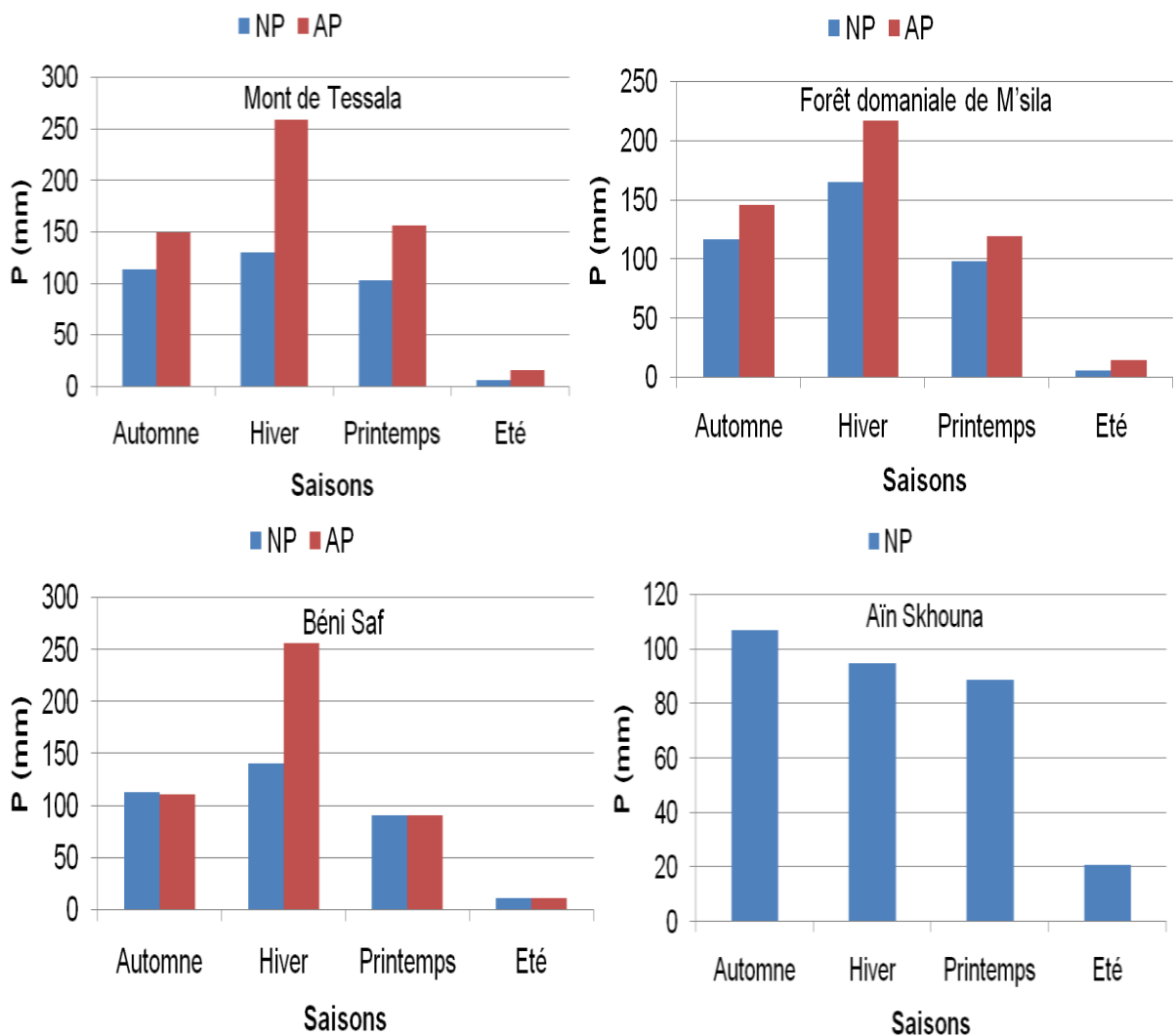
Avec :

- **Crs** : coefficient relatif de Musset,
- **Ps** : précipitations moyennes saisonnières,
- **Pa** : précipitations moyennes annuelles.

**Tableau 8** : Répartition saisonnière des précipitations, régime saisonnier (RS) et coefficient relatif de Musset (Crs) des différents sites d'étude

Sites	Périodes	Automne	Crs	Hiver	Crs	Printemps	Crs	Eté	Crs	RS
Tessala	NP	113,95	1,29	129,9	1,47	103	1,16	5,8	0,06	HAPE
	AP	150	0,78	259	0,89	156	0,71	16	0,03	HPAE
M'sila	NP	116,83	1,2	165,61	1,71	98,35	1,01	6,36	0,06	HAPE
	AP	146,5	1,17	217,3	1,74	119,9	0,96	15,1	0,12	AHPE
Béni Saf	NP	113,55	1,17	140,63	1,45	91,45	0,94	11,58	0,11	HAPE
	AP	111	0,89	257	2,06	91	0,72	12	0,09	HAPE
Aïn Skhouna	NP	107	1,1	94,9	0,98	89	0,91	20,7	0,21	HAPE

**H** : hiver (décembre, janvier, février) ; **A** : automne (septembre, octobre, novembre) ; **P** : printemps (mars, avril, mai) ; **E** : été (juin, juillet, août).



**Figure 8** : Régimes pluviométriques saisonniers (mm) des différents sites d'étude.

La distribution saisonnière des pluies (Fig. 8) ainsi que les résultats relatifs aux régimes saisonniers et aux coefficients relatifs de Musset des différents sites d'étude (Tab. 8) montrent que :

- le maximum des pluies est concentré en hiver et en automne, avec un degré moindre en printemps,
- pour l'ancienne période, le régime saisonnier est de type HPAE, AHPE et HAPE respectivement dans le mont de Tessala, la forêt domaniale de M'sila et la commune de Béni Saf ; pour la nouvelle période, il est du type HAPE dans tous les sites d'étude.

### I.5.4.3. Amplitude thermique ou indice de continentalité (IC)

L'amplitude thermique extrême (M - m) est un paramètre climatique très important car il permet de définir à partir d'un indice appelé « indice de continentalité » si la zone est sous influence maritime ou continentale. En se référant à la classification de Debrach (1959) qui est fondée sur l'amplitude M - m :

- **climat insulaire** :  $M - m < 15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ;
- **climat littoral** :  $15 \text{ }^{\circ}\text{C} < M - m < 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ;
- **climat semi-continentale** :  $25 \text{ }^{\circ}\text{C} < M - m < 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ;
- **climat continental** :  $35 \text{ }^{\circ}\text{C} < M - m$ .

**Tableau 9** : Indice de continentalité (IC) des différents sites d'étude

Sites	Périodes	IC (°C)	Types du climat
Tessala	NP	32,05	semi continental
	AP	30	semi continental
M'sila	NP	23,26	Littoral
	AP	18,7	Littoral
Béni Saf	NP	24,4	Littoral
	AP	19,62	Littoral

Les résultats relatifs aux indices de continentalité des différents sites d'étude (Tab. 9) montrent que le climat est de type :

- semi continental dans le mont de Tessala avec des indices de continentalité de 30 et 32,05 pour l'ancienne et la nouvelle période respectivement,
- littoral dans la forêt domaniale de M'sila et la commune de Béni Saf, avec des indices de continentalité respectifs pour l'ancienne et la nouvelle période de : 18,7 et 23,26 dans la forêt domaniale de M'sila ; 19,62 et 24,4 dans la commune de Béni Saf.

### I.5.4.4. Indice de sécheresse estivale (ISE)

L'indice de sécheresse estivale (ISE) permet, en complément du régime pluviométrique, de mieux caractériser le climat méditerranéen. Il est exprimé par la formule suivante (Emberger, 1942) :

$$ISE (mm/^{\circ}\text{C}) = PE (mm) / M (^{\circ}\text{C})$$

Avec :

- **ISE** : indice de sécheresse estivale ;
- **PE** : pluviosité estivale (en mm) définie par les mois de juin, juillet et août ;
- **M** : la moyenne des maxima du mois le plus chaud (en °C).

**Tableau 10** : Indice de sécheresse estivale (ISE) des différents sites d'étude.

Sites	Périodes	ISE (mm/°C)	Type du climat
Tessala	NP	0,17	Méditerranéen
	AP	0,5	Méditerranéen
M'sila	NP	0,21	Méditerranéen
	AP	0,55	Méditerranéen
Béni Saf	NP	0,37	Méditerranéen
	AP	0,41	Méditerranéen

Il ressort du tableau 10 que pour les deux périodes, les indices de sécheresse estivale de tous les sites d'étude varient entre 0,17 et 0,55 (mm/°C). Ceci indique l'appartenance de nos sites d'étude (ISE < 5) au climat méditerranéen selon la grille de Daget (1977).

#### I.5.4.5. Quotient pluviométrique d'Emberger (Q<sub>2</sub>)

Emberger (1930, 1971) a proposé une formule simple, valable uniquement pour la région méditerranéenne où l'évaporation a une importance particulière. Il admet que cette évaporation croît avec l'amplitude climatique annuelle qu'il exprime par la différence entre la moyenne «M» du mois le plus chaud et la moyenne «m» du mois le plus froid (Ozenda, 1977). Il propose d'utiliser pour la région méditerranéenne le quotient pluviométrique défini par l'expression suivante :

$$Q_2 = [1000P] / [1/2(M+m) (M-m)]$$

Avec :

- Q<sub>2</sub> : quotient pluviométrique ;
- P : précipitation moyenne annuelle (en mm) ;
- M : moyenne des maxima du mois le plus chaud (en ° kelvin = °C + 273,2) ;
- m : moyenne des minima du mois le plus froid (en ° kelvin = °C + 273,2).

**Tableau 11** : Quotient pluviométrique (Q<sub>2</sub>) d'Emberger des différents sites d'étude.

Sites	Périodes	Q <sub>2</sub>	Etages bioclimatiques	Sous-étage	Variante thermique
Tessala	NP	37,72	semi-aride	Inférieur	Fraiche
	AP	66,73	Humide	Inférieur	Fraiche
M'sila	NP	57,16	semi-aride	Inférieur	Douce
	AP	91,7	Humide	Inférieur	Chaude
Béni Saf	NP	48,29	semi-aride	Inférieur	Douce
	AP	63	semi-aride	Supérieur	Douce
Aïn Skhouna	NP	59,04	semi-aride	Supérieur	Douce

Les résultats des quotients pluviométriques (Tab. 11) et le climagramme d'Emberger (Fig. 9) des différents sites d'études montrent que:

- le mont de tessala a basculé d'un étage bioclimatique humide inférieur à hiver frais avec un quotient pluviométrique de 66,73 pendant l'ancienne période à un étage bioclimatique semi-aride inférieur à hiver frais pendant la nouvelle période,
- la forêt domaniale de M'sila a basculé d'un étage bioclimatique humide inférieur à hiver chaud pendant l'ancienne période ( $Q_2 = 91,7$ ) à un étage bioclimatique semi-aride inférieur à hiver doux pendant la nouvelle période ( $Q_2 = 57,16$ ),
- la commune de Béni-Saf a basculé d'un étage bioclimatique semi-aride supérieur doux pendant l'ancienne période ( $Q_2 = 63$ ) à un étage bioclimatique semi-aride inférieur à hiver doux pendant la nouvelle période ( $Q_2 = 48,29$ ),
- la combe d'Aïn Skhouna est caractérisée par un étage bioclimatique semi-aride supérieur à hiver doux ( $Q_2 = 59,04$ ), selon les données récentes.

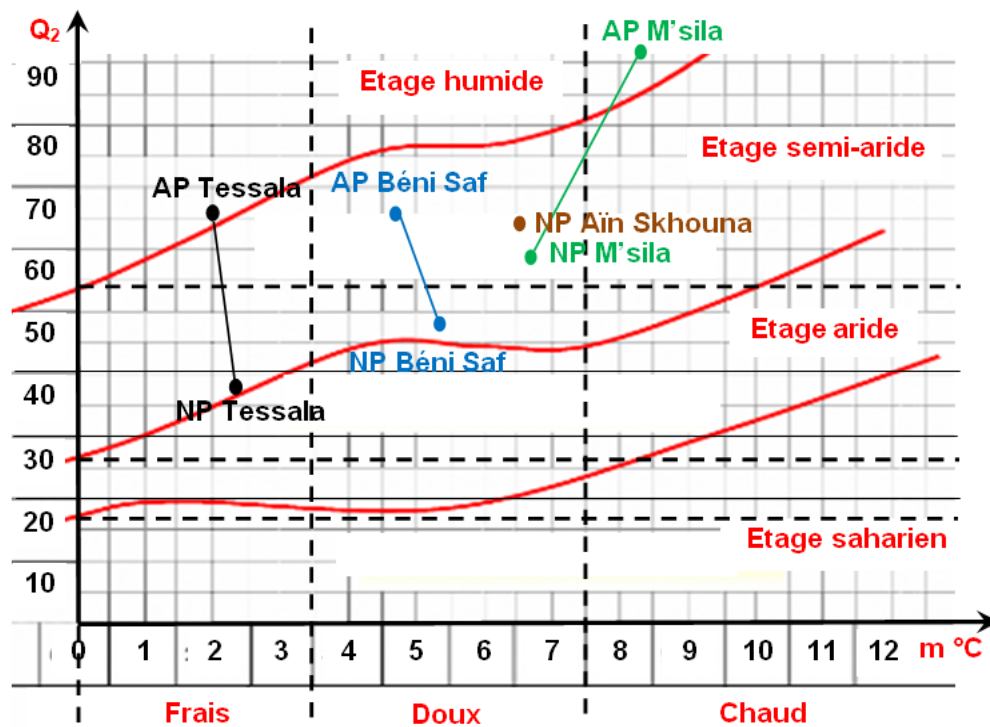


Figure 9 : Climagramme d'Emberger des différents sites d'étude.

#### I.5.4.6. Indice d'aridité de De Martonne (IDM)

De Martonne (1926) a essayé de définir l'aridité du climat par un indice qui associe les précipitations moyennes annuelles (mm) aux températures moyennes annuelles (°C). Cet indice d'aridité (I) est d'autant plus grand lorsque le climat est plus humide, il permet de caractériser l'aridité du climat d'une région donnée. Cet indice est d'autant plus faible que le climat est plus aride. Il est calculé par la formule suivante :

$$IDM (mm/^{\circ}C) = P (mm) / [T (^{\circ}C) + 10]$$

Avec:

- **IDM** : indice d'aridité (mm/°C) ;
- **P** : les précipitations annuelles (mm) ;
- **T** : les températures moyennes annuelles (°C).

Suivant les valeurs de cet indice, De Martonne a établie la classification suivante:

- **20 < IDM < 30**: climat tempéré,
- **10 < IDM < 20**: climat semi aride,
- **7, 5 < IDM < 10**: climat steppique,
- **5 < IDM < 7, 5**: climat désertique,
- **IDM < 5**: climat hyperaride.

**Tableau 12** : Indice d'aridité de De Martonne (IDM) des différents sites d'étude.

Sites	Périodes	IDM (mm/°C)	Types de climat
Tessala	NP	13,23	climat semi-aride
	AP	23,36	climat tempéré
M'sila	NP	13,99	climat semi-aride
	AP	18,77	climat semi-aride
Béni Saf	NP	12,62	climat semi-aride
	AP	13,16	climat semi-aride
Aïn Skhouna	NP	12,04	climat semi-aride

Les résultats des indices d'aridité de De Martonne (Tab. 12) montrent que le climat semi-aride caractérise la majorité des périodes d'observation des sites d'étude, à l'exception de l'ancienne période des monts de Tessala la où le climat tempéré régnait avec un indice d'aridité de 23,36.

En ce qui concerne l'écoulement des précipitations (Fig. 10), tous les sites d'étude ont passé de la zone tempérée à drainage extérieur pendant l'ancienne période à un régime semi-aride à écoulement temporaire pendant la nouvelle période.

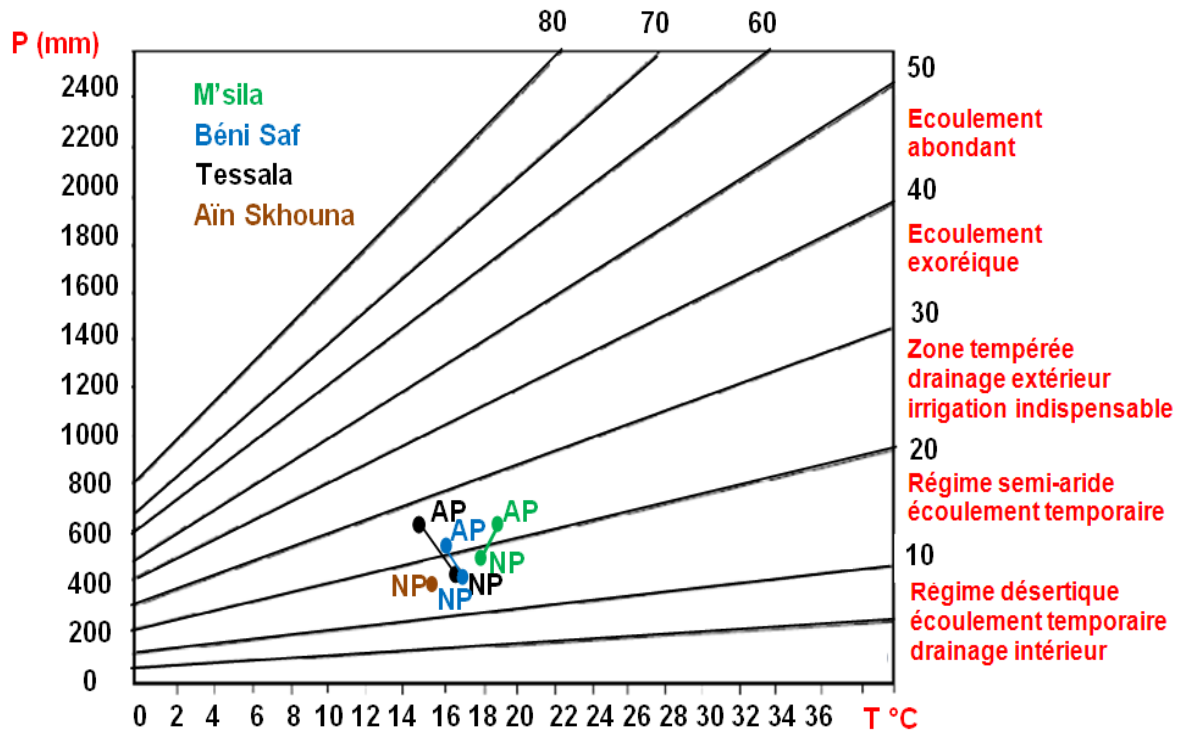


Figure 10 : Abaque de l'indice d'aridité de De Martonne des différents sites d'étude.

### I.6. Formations végétales

La végétation joue un rôle important dans la caractérisation des milieux, de plus elle influe sur l'humidité des sols, la réserve hydrique et le régime de l'eau. Cependant, son action dépend de l'influence de certains facteurs tels que la pente et la géologie.

Le diagnostic phytocéologique et le dépouillement des relevés floristiques par Ferka-Zazou (2006) dans le mont de Tessala a permis de dégager quatre formations principales :

- un taillis dense situé dans le versant nord, couvrant une superficie 99 ha soit 9 % seulement de la superficie totale de la forêt, avec le chêne vert (*Quercus ilex* L.) comme l'essentiel végétal de cette formation,
- un matorral dense qui occupe une place importante dans la forêt, il s'étend sur 310 ha soit 27 % de la superficie totale des terres forestières, constitué essentiellement de taillis bas de chêne vert et de chêne kermès,
- une garrigue avec une superficie de 382 ha soit 33 % de la superficie totale de la forêt, c'est la formation végétale la plus représentée, avec présence des espèces telles que le calycotome (*Calycotome spinosa* Link.), le doum (*Chaemerops humilis* L.), le diss (*Ampelodesma mauritanica* Bir.) et l'asphodèle (*Asphodelus microcarpus* Sal & Viv.),

- une forêt claire qui s'étend sur 208 ha soit 18 % de la superficie totale, localisée sur le versant sud, c'est une forêt trouée constituée essentiellement par le pin d'Alep, l'Eucalyptus, le chêne vert, le caroubier et l'acacia,

Dans la forêt domaniale de M'sila, le chêne-liège est l'essence dominante, actuellement localisé essentiellement dans les cantons de M'Sila, Cheikh Ben Khalifa et avec un degré moindre à Guedara, Belhadi (Djorf Halia), Messabiah et Oued Hassan, couvrant une superficie totale de 4,620 km<sup>2</sup> (C.F.W.O., 1996). La densité du peuplement est variable, elle varie en générale de 100 à 200 sujets à l'hectare et parfois beaucoup moins (< 80 tiges/ha) par endroits à la suite des incendies. Les parcelles de forte densité (400 tiges/ha) sont issues de différents reboisements (Bouhraoua, 2003). Parmi le sous-bois accompagnant le chêne, nous trouvons essentiellement : *Phillyrea angustifolia*, *Calycotome intermedia*, *Olea europea*, *Ampelodesma mauritanica*, *Pistacia lentiscus*, *Arbutus unedo*, *Erica arborea*, *Cistus ladaniferus*, *Cytisus triflorus*, *Cistus salvifolius*, *lavandula stoechas*, *Daphne gnidium*, *Chamaerops humilis*, *Asparagus acutifolius*, *Smilax aspera* et *Asphodelus microcarpus*. Nous y trouvons également d'autres essences secondaires telles le cyprès, le pin maritime et l'eucalyptus, provenant toutes des travaux de reboisement. Quelques pieds de caroubier et de cèdre existent également à l'état naturel.

Dans la commune de Béni-Saf, les formations forestières occupent une superficie de 2843,8 ha, formées de forêts de Pin d'Alep sur le massif montagneux de Béni-Saf (versant nord de Djebel Skhouna), la zone de Ghar El Baroud et le pourtour de l'agglomération de Béni Saf. Les peuplements d'Eucalyptus occupent les bas fonds et les Oueds, notamment l'Oued Saf Saf et Oued El Middah. Les forêts de la commune de Béni Saf s'étendent sur une superficie de 990,5 ha, ce sont essentiellement des plantations artificielles, installées sur un réseau de banquettes pour prévenir d'une part l'ensablement du port et protéger la ville de Beni saf contre les inondations et l'érosion. Actuellement, ces plantations constituent une armature forestière qui contribue à stabiliser les talus du relief accidenté et instable de la ville de Béni Saf. Le matorral et la broussaille représentent 1853,3 ha, ils occupent généralement, toute la côte de la région de Béni Saf et Gaadet El Ghouzlane. Une grande partie de ces formations végétales sont dégradées et sont réparties à travers toute la commune, dans l'ouest, l'est et le sud, elles sont formées essentiellement d'une végétation basse à base de Doum et de Lentisque. Ces dernières occupent le reste de la superficie des terres forestières (Merioua, 2014).

Dans la commune d'Aïn Skhouna, trois groupements végétaux sont rencontrés, ceci en plus de la végétation caractéristique de la région du Chott Ech-Chergui (typha, roselière, scirpes et autres potamots, ceratophyllum et myriophyllum). Cette végétation forme le groupement des hautes plaines, celui des daiïas et du littoral du Chott (Morsli *et al.*, 1998) :

- le premier groupement renferme deux associations : l'association à *Stipa tenacissima* et l'association à *Artiplex mauritanica* et *Armetisia herba alba* ; la deuxième association comprend deux sous-associations : la sous-association à *Armetisia herba alba* et à *Artiplex mauritanica* et *Suaeda fruticosa*,
- le deuxième groupement des daïas contient deux groupes de végétation : celles des sols salés et non salés,
- le troisième groupement est formé de trois sous-groupements : à *Juncus maritimus* dans les zones constamment humides, à *Halocnemum strobilacum* et groupement pur à *Halocnemum strobilacum*. La flore remarquable de la région est représentée par les espèces endémiques suivantes : *Euphorbia guyoniana* (endémique au Sahara), *Holenackeria polyodon* (endémique à l'Afrique du nord), *Carum foetidum* (endémique), *Frankenia thymifolia* (endémique à l'Afrique du nord), *Tymus ciliatus* (endémique à l'Afrique du nord), *Anacyclus cyrtolepidioides* (endémique), *Helianthemum apertum* (endémique). De plus, il est a signalé la présence de quatre espèces indigènes qui sont : *Tamarix boveana*, *Tamarix gallica*, *Pyrus garbiana* et *Ziziphus lotus*.

## **CHAPITRE II : Matériels biologiques et méthodes d'étude**

### II.1. Choix des stations d'échantillonnage

Après plusieurs prospections préliminaires sur quelques localités appartenant à la région Oranaise qui nous ont permis une bonne connaissance préalable de la région, nous avons choisi sept stations (Pl. V). Sur chacune d'elle, des paramètres stationnels relatifs à l'emplacement (altitude, longitude, latitude et exposition) sont enregistrés (Tab. 13). Ce choix est orienté par la présence de l'espèce *M. vulgare* qui a fait l'objet de notre étude. Aussi, ce choix a pour but d'étudier les variations quantitatives et qualitatives des composés phénoliques ainsi que des activités antimicrobiennes et antioxydantes de *M. vulgare* en fonction de l'hétérogénéité des écosystèmes où règnent notre espèce, une diversité résultant de la pondération de divers facteurs écologiques tels que les facteurs climatiques et édaphiques.

La grande hétérogénéité dans les écosystèmes constituant l'Oranie, nous a ramené à étudier sept stations appartenant à quatre sites d'études :

- quatre sur le mont de Tessala (wilaya de Sidi Bel Abbès) dont deux sont à exposition nord et deux autres à exposition sud. Les stations de chaque exposition sont situées à des altitudes différentes,
- une station appartenant au littoral de Béni Saf (wilaya de Ain Témouchent),
- une station appartenant à la forêt domaniale de M'sila (wilaya d'Oran),
- une station appartenant à la commune de Aïn Skhoua (wilaya de Saïda).

**Tableau 13** : Paramètres stationnels des différentes stations d'échantillonnage

Localités d'échantillonnage	Stations	Latitude (N)	Longitude (O-E)	Altitude (m)	Exposition
Tessala	S1	35°16'18"N	0°45'59"O	592	Sud
	S2	35°16'31"N	0°46'29"O	596	Nord
	S3	35°17'14"N	0°47'51"O	879	Sud
	S4	35°16'15"N	0°46'55"O	883	Nord
Béni-Saf	S5	35°19'44"N	01°28'76"O	68	Sud
Forêt de M'sila	S6	35°37'12"N	0°53'25"O	357	Nord
Aïn Skhoua	S7	34°30'N	0°49'E	996	Sud

**S** : station ; **O** : ouest ; **E** : est ; **N** : nord.

Planche V : Photos des stations d'échantillonnage.



## II.2. Étude quantitative et qualitative des composés phénoliques

### II.2.1. Étude quantitative des composés phénoliques

#### II.2.1.1. Matériel végétal et préparation des extraits

##### II.2.1.1.A. Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'influence de quelques paramètres expérimentaux (la nature du solvant organique et sa concentration, le temps et la température d'extraction) sur la teneur en quelques polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) contenus dans les feuilles de *M. vulgare* peuplant le mont de Tessala.

Les feuilles de *M. vulgare* sont récoltées en avril 2012 du mont de Tessala (Station 1). Elles sont lavées à l'eau distillée, séchées à l'air libre et à l'ombre pendant dix jours puis broyées et réduites en poudre par un broyeur à couteau muni d'un filtre à mailles et conservées dans de petits sacs en plastiques étiquetés.

L'extraction des composés phénoliques été faite selon le protocole décrit par Chew *et al.* (2011a). Deux grammes de poudre de feuilles de *M. vulgare* L. sont introduits dans un flacon conique de 100 ml et mélangés avec 20 ml de solvant organique à différentes concentrations. Pour éviter l'exposition à la lumière et l'évaporation du solvant, le flacon est scellé avec du parafilm et enveloppé avec du papier aluminium. Ensuite, le mélange est agité à une température contrôlée pendant une durée déterminée. Après extraction, l'extrait est filtré en utilisant du papier Whatman n°1. Toutes les extractions sont réalisées trois fois et au même endroit.

Pour déterminer les conditions d'extraction optimales des polyphénols à doser, les paramètres d'extraction testés et leurs variations sont fixés en fonction de la conception expérimentale :

- type de solvant organique : trois solvants organiques sont utilisés (le méthanol, l'éthanol, l'acétone). En parallèle et comme témoin, nous avons testé l'eau distillée,
- concentration du solvant organique : pour chaque type de solvant organique, quatre concentrations sont préparées dans de l'eau distillée (20 %, 40 %, 60 % et 80 %),
- température d'extraction : six températures sont utilisées (20, 25, 30, 40, 50 et 60 °C),
- temps d'extraction : six différents temps sont choisis (30, 90, 180, 270, 360 et 450 mn).

### **II.2.1.1.B. Effet des paramètres environnementaux sur les concentrations en polyphénols chez différents organes**

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à évaluer l'influence de certains paramètres écologiques tels que la saison d'échantillonnage, le mois de prélèvement, l'altitude, l'exposition et la localité d'échantillonnage sur la teneur en quelques composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) sur différents organes (feuilles, tiges, racines et fleurs) de *M. vulgare*.

Les différents organes (feuilles, tiges, racines) de *M. vulgare* ont été récoltés pendant la première semaine de chaque mois de l'année (de octobre 2012 à septembre 2013). Pour les fleurs, elles ont été prélevées en période de floraison de la plante, de juin à septembre 2013 (printemps et été). Pour élucider l'effet des paramètres écologiques sur la teneur en composés phénoliques, nous avons choisis six stations (Stations 1, 2, 3, 4, 5 et 6) dans trois habitats différents appartenant au nord-ouest Algérien.

Les différents organes prélevés ont été lavés à l'eau distillée, séchés à l'air libre et à l'ombre pendant une dizaine de jours puis broyés et réduits en poudre à l'aide d'un broyeur à couteau muni d'un filtre à mailles de 0,25 µm de taille et conservés dans de petits sacs en plastiques étiquetés.

L'extraction des composés phénoliques est effectuée selon le protocole décrit par Park *et al.* (2012). Deux grammes de chaque organe végétal ont été ajoutés à 10 ml de méthanol 70 %. Après 5 mn d'agitation au vortex à température ambiante, le mélange est filtré sur papier filtre (Wattman N°1), centrifugé à 4000 tours/mn pendant 15 mn. Le premier surnageant est récupéré délicatement par une micropipette. Cette opération est répétée deux fois afin d'épuiser le contenu en composés phénoliques solubles dans l'échantillon. Les trois surnageants sont ainsi regroupés et conservés à -20 °C avant analyses. Toutes les extractions sont réalisées trois fois et au même endroit.

### **II.2.1.2. Dosage des composés phénoliques**

#### **II.2.1.2.A. Dosage des phénols totaux (PT)**

La quantification des phénols totaux est faite en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode colorimétrique décrite par Li *et al.* (2008) modifiée par Chew *et al.* (2011a). Les extraits bruts obtenus à partir de l'extraction sont dilués 50 fois dans de l'eau déminéralisée avant utilisation. 1 ml d'échantillon dilué est introduit dans des tubes à essai suivi par 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10 %, v/v). Après 4 mn d'incubation à la température ambiante, 0,8 ml de carbonate de sodium (7,5 %, p/v) sont ajoutés. Les tubes à essai sont couverts avec du parafilm, agités au vortex pendant 10 sec et laissés au repos à l'obscurité et à la température ambiante pendant 2 h. L'absorbance a été mesurée à 765 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS. Chaque extrait est analysé trois fois. Une courbe d'étalonnage est établie dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0-

100-200-300-400 et 500 mg/l). Ainsi, les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique (mg EAG) par gramme de feuilles sèches.

#### **II.2.1.2.B. Dosage des flavonoïdes (FLA)**

Les flavonoïdes totaux sont déterminés en utilisant la méthode décrite par Tan *et al.* (2011). 1,25 ml d'eau déminéralisée et 75 µl de nitrite de sodium 5 % (p/v) sont ajoutés à 0,25 ml d'extrait brut dilué 10 fois. Le mélange est laissé au repos pendant 6 mn avant d'ajouter 150 µl de chlorure d'aluminium à 10 % (p/v). Après 5 mn de repos, 0,5 ml de soude 1M et 275 µl d'eau déminéralisée sont ajoutés. Les tubes à essai sont couverts avec du parafilm puis agités au vortex pendant 10 sec. L'absorbance du mélange est lue au spectrophotomètre UV-VIS à une longueur d'onde de 510 nm. Toutes les analyses sont répétées trois fois. Une courbe d'étalonnage est établie dans les mêmes conditions expérimentales avec un standard, la (+)-catéchine, présentant différentes concentrations (0-100-200-300-400 et 500 mg/l). La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en mg équivalent de (+)-catéchine (mg EC) par gramme de feuilles sèches.

#### **II.2.1.2.C. Dosage des tanins condensés (TC)**

La teneur en tanins condensés est obtenue en adoptant la méthode de Chew *et al.* (2011a). 50 µl d'extrait végétal brut est mélangé avec 3 ml d'une solution de vanilline à 4 % (p/v) préparée dans du méthanol absolu, 1,5 ml de HCl concentré (37 %) sont ensuite ajoutés. Par la suite, le mélange est mis à l'obscurité et à la température ambiante pendant 15 mn. L'absorbance du mélange est lue au spectrophotomètre UV-VIS à 500 nm. Chaque analyse est répétée trois fois. La catéchine (0-100-200-300-400 et 500 mg/ml) est utilisée pour la réalisation de la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine (mg EC) par gramme de feuilles sèches.

### **II.2.2. Étude qualitative des composés phénoliques**

Pour mettre en évidence d'éventuelles différences qualitatives en termes de composés phénoliques, nous avons jugé intéressant de séparer les extraits phénoliques obtenus des feuilles de *M. vulgare* prélevées pendant toutes les saisons de l'année de quatre différentes localités et ceci en utilisant une chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée. Ces tests ont été réalisés au Laboratoire de Génétique et Biophysique des Plantes (L.G.B.P) à l'université Aix-Marseille (France).

#### **II.2.2.1. Matériel végétal**

Les feuilles de *M. vulgare* ont été prélevées chaque saison de l'année 2013 (automne, hiver, printemps et été) de quatre localités : mont de Tessala (Station 1), forêt domaniale de M'sila (Station 6), Béni-Saf (Station 5) et Aïn Skhouna (Station 7). Elles ont été lavées à l'eau distillée, séchées à l'air libre et à l'ombre pendant une dizaine de jours puis broyées et réduites en poudre avec un broyeur à couteau muni d'un filtre à mailles de 0,25 µm de taille et conservées dans de petits sacs en plastiques étiquetés.

### II.2.2.2. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques a été faite selon le protocole décrit par Toffali *et al.* (2011). Dans des tubes Ependorf, 0,1 g de poudre végétale est ajouté à 1,5 ml d'une solution contenant 80 % de méthanol et 0,1 % d'acide acétique. Les tubes ont subi une courte agitation, sonication à 40 kHz dans un bain ultrasons pendant 1H à température ambiante et une centrifugation à 15000 tours/mn pendant 10 mn à 4°C. Le premier surnageant est récupéré délicatement à l'aide d'une micropipette et 500 µl de la solution contenant 80 % méthanol et 0,1 % acide acétique sont ajoutés. Le mélange a subi une agitation, une sonication à 40 kHz dans un bain ultrasons pendant 1H à température ambiante et une centrifugation à 15000 tours/mn pendant 10 mn à 4°C. Le deuxième surnageant est récupéré. Le total des deux surnageants (~ 2 ml) constitue les composés phénoliques à analyser.

### II.2.2.3. Standards phénoliques testés

Dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons végétaux, 20 standards phénoliques ont été analysés : 10 acides phénoliques (acide chlorogénique, acide férulique, acide ellagique, acide tannique, acide caféique, acide vanillique, acide hydrocinnamique, acide syringique, acide gallique et vanilline) et dix 10 flavonoïdes (diosmétine, nobiletine, lutéoline, kaempférol, diosmine, catéchine, silibinine, tangéritine, naringine et naringinine). Des solutions mères (1 mg/ml) sont préparées dans une solution contenant 80 % méthanol et 0,1 % acide acétique.

### II.2.2.4. Séparation des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée

Même s'il existe d'autres techniques qui permettent de faire l'identification de polyphénols tels que la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie sur couche mince (Bloor, 2001), la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée, combinée à la détection électronique ou à la spectroscopie ultraviolette et visible (UV-VIS) est, sans doute, la méthode la plus communément utilisée pour l'identification et la quantification des différents composés phénoliques (Merken et Beecher 2000 ; Mattila et Kumpulainen, 2002). Plusieurs travaux ont été effectués sur l'identification des composés phénoliques en utilisant la CLHP combinée avec d'autres techniques de détection plus ou moins complexes (Daigle et Conkerton 1983 ; Daigle et Conkerton 1988 ; Wen *et al.*, 2005). En particulier la détermination de polyphénols en utilisant la CHLP couplée à un détecteur par absorption à barrette de diodes, a été très employée ; et c'est pour cette raison qu'elle sera l'objet de la présente étude.

Le système CLHP Gilson utilisé se compose de :

#### II.2.2.4.A. Phase mobile

Les solvants utilisés comme phase mobile en chromatographie de partage sur phase stationnaire apolaire doivent répondre à certaines exigences. Ils doivent être de pureté analytique et filtrés pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne. Aussi, il faut utiliser des solvants qui n'absorbent pas à la même

longueur d'onde que les composés phénoliques, qui sont complètement miscibles. En plus, si la phase mobile est constituée d'un mélange de solvants, ceux-ci doivent être complètement miscibles. En plus, le soluté à séparer doit y être soluble. Notre phase mobile est constituée par deux solutions : solution A (5 % acide acétique / 5 % acétonitrile / 90 % eau distillée) et solution B (100 % acétonitrile).

#### II.2.2.4.B. Pompe

Elle permet de déplacer la phase mobile avec deux pistons qui fonctionnent en alternance. Elle est alimentée à partir de plusieurs flacons contenant des solvants de polarités différentes. Elle permet aussi d'effectuer une programmation des solvants pour assurer un système de gradient. Cette pompe peut livrer un débit constant de 0,001 à 9,999 ml/mn, avec des pressions allant de 10 à 392 bars. La gamme de température de fonctionnement est de 4 à 35°C. Dans notre étude, le protocole utilisé est comme suit (les temps indiquent le moment où les conditions indiquées entre parenthèses sont atteintes à partir de la situation précédente) : 0 mn (100 % solution A, 0 ml/mn), à 1 mn (100 % solution A, 0,7 ml/mn), à 4 mn (90 % solution A, 10 % solution B), à 17 mn (80 % solution A, 20 % solution B), à 20 mn (75 % solution A, 25 % solution B), à 30 mn (20 % solution A, 80 % solution B), à 33 mn (100 % solution A), à 37 mn (100 % solution A). Le débit d'élution est de 0,7 ml/mn à une température ambiante.

#### II.2.2.4.C. Injecteur

Pour introduire l'échantillon à l'entrée de la colonne, celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une seringue dans un injecteur à boucle externe. Cette boucle contient deux positions :

- load (charger) : on injecte toujours un volume inférieur ou égal à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air. En cas d'excès du liquide injecté, celui-ci est évacué par l'ouverture de vidange,
- inject (injecter) : en tournant la valve vers cette position, seul le contenu de la boucle est dirigé vers la colonne à travers la phase mobile.

Dans la présente étude, le volume d'injection est fixé à 100 µl. Avant chaque injection, la colonne est équilibrée avec la solution A. En fin de journée, la colonne est lavée avec un tampon constitué par le méthanol 75% et dans lequel elle est conservée.

#### II.2.2.4.D. Colonne analytique

Elle est constituée par un tube en acier inoxydable qui renferme la phase stationnaire, qui se compose de greffons organiques apolaires (octadécyle C18), fixés sur des micros particules de silice. C'est une phase inversée, RP-HPLC (Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography). La qualité de la séparation dépend de la géométrie de la colonne, de la granulométrie des particules qui constituent la phase stationnaire, d'éventuelles modifications chimiques des groupes silanols (endcapping) et de la qualité du remplissage. La colonne analytique utilisée est de type C18 Vydac 218TP5415, longueur 15 cm, diamètre interne 4,6 mm et diamètre des particules 5 µm.

#### II.2.2.4.E. Détecteur

Un détecteur UV-visible à barrettes de diodes permet de détecter les différents composés contenu dans l'échantillon à analyser par enregistrement du spectre d'absorption entre 190 et 700 nm. Notons qu'il est important que les produits à détecter portent un chromophore qui absorbe dans cette plage de longueur d'onde. La source utilisée est une lampe de deutérium. Dans notre travail, la détection a été réalisée à 280 nm (pour les acides phénoliques) et à 370 nm (pour les flavonoïdes). Au niveau du détecteur, chaque composé du mélange sortant de la colonne est détecté donnant un signal qui est enregistré par le système de traitement des données sous forme d'un pic. L'ensemble des pics forme un chromatogramme.

#### II.2.2.4.F. Système de traitement des données

C'est un ordinateur à travers le logiciel Unipoint (Gilson) installé sur Windows 98. Celui-ci permet de visualiser le signal de sortie du détecteur sous forme de pics. L'ensemble de ces pics forme un chromatogramme. Ce type de logiciel permet d'intégrer les pics du chromatogramme (mesurer la surface) afin de quantifier les différents composés. L'identification chromatographique des extraits phénoliques et des standards est basée sur la comparaison des temps de rétention ( $T_r$ ) des composés sur la colonne et les spectres d'absorptions.

#### II.1.3. Traitements statistiques

L'effet des paramètres expérimentaux abordés (solvant, concentration, temps, température) sur les teneurs moyennes de chaque composé phénolique dosé, est mis en évidence par l'analyse de la variance à un, deux et plusieurs critères de classification au seuil de 5 %. Nous considérons que la différence est : non significative ( $p > 0,05$ ), significative ( $*p \leq 0,05$ ), hautement significative ( $**p \leq 0,01$ ) et très hautement significative ( $***p \leq 0,001$ ). Ces analyses sont exécutées par Minitab 16 en utilisant le test de Tukey pour les comparaisons deux à deux. Les mêmes tests sont réalisés pour faire ressortir l'effet des conditions écologiques (saison, mois, station, exposition et altitude) et de la nature de l'organe végétal (feuilles, tiges, racines et fleurs) sur les concentrations moyennes en composés phénoliques.

L'utilisation de l'analyse en composantes principales (ACP) nous a permis d'intégrer plusieurs variables quantitatives à la fois, d'étudier les liaisons existantes entre elles, de mettre en évidence celles qui sont les plus discriminantes et d'obtenir une image simplifiée sur des plans discriminant au maximum les facteurs (Ceto *et al.*, 2012). Pour cela, une matrice est préparée en prenant les concentrations moyennes en polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) comme individus et les essais comme variables afin d'établir les corrélations possibles en utilisant XLSTAT 2012.

Afin de faire ressortir les conditions théoriques optimales pour l'extraction de chaque type de composé phénolique dosé, nous avons employé la méthode de réponse de surface (Liao *et al.*, 2012 ; Zheng *et al.*, 2012). Cette méthode est adoptée pour chaque type de composé phénolique avec le solvant ayant donné les teneurs expérimentales maximales. Les variables indépendantes étudiées sont : la concentration du solvant organique ( $X_1$ ), la température

d'extraction ( $X_2$ ) et le temps d'extraction ( $X_3$ ). Tandis que la variable dépendante ( $Y$  : variable de réponse) est la teneur en polyphénols dosés. En premier lieu et pour tirer les meilleures combinaisons des variables indépendantes donnant un pourcentage maximal de  $R^2$  ajusté, une régression des meilleurs sous-ensembles est réalisée par Minitab 16. L'équation de régression du modèle est obtenue par une analyse en régression générale. Enfin, les conditions optimales d'extraction sont obtenues en faisant introduire l'équation de régression dans le logiciel Maple 6.

L'analyse factorielle des correspondances (AFC) est une méthode descriptive qui a pour objectif de résumer l'information contenue dans un tableau comportant « n » lignes (dans notre analyse : les organes végétatifs par station d'échantillonnage et par saison de prélèvement) et « p » colonnes ou variables (dans notre analyse : les concentrations saisonnières en phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés ; altitude et exposition) (Legendre et Legendre, 1984). C'est aussi une technique qui a pour but de décrire en particulier sous une forme graphique le maximum de l'information contenue dans un tableau rectangulaire regroupant à la fois des données quantitatives et qualitatives (Dervin, 1992 ; Troude *et al.*, 1993). Cette analyse est accomplie en utilisant XLSTAT 2012.

Afin de faire ressortir les corrélations existantes entre les différents paramètres écologiques choisis, des tests de corrélation de Pearson ont été faits au seuil de 5 % en utilisant le logiciel XLSTAT 2012. Nous considérons que les variables sont en corrélation si  $0,3 < R < 0,8$  (Amaral *et al.*, 2008 ; Alcantara *et al.*, 2012 ; Brahmi *et al.*, 2014).

### II.3. Activités biologiques des flavonoïdes extraits des feuilles

Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel antimicrobien et antioxydant des flavonoïdes extraits des feuilles de *M. vulgare* d'une part et, de tester l'influence de la localité d'échantillonnage sur ces activités biologiques d'autre part.

#### II.3.1. Matériel biologique

Des feuilles de *M. vulgare* ont été récoltées en novembre 2012 sur le mont de Tessala (Station 1) ont fait l'objet d'un test préliminaire pour évaluer le pouvoir antimicrobien des extraits flavonoïques de notre plante. Aussi et afin de caractériser l'influence de la localité d'échantillonnage sur le potentiel antimicrobien et sur l'activité antioxydante, d'autres feuilles de *M. vulgare* ont été prélevées en mai 2013 dans trois autres localités : le mont de Tessala (Station 1), la forêt domaniale de M'sila (Station 6) et Aïn Skhouna (Station 7). Les feuilles échantillonnées ont été lavées à l'eau distillée, séchées à l'air libre et à l'ombre pendant une dizaine de jours puis broyées avec un broyeur à couteau muni d'un filtre à mailles.

#### II.3.2. Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes est faite selon le protocole décrit par Markham (1982) et Merghem *et al.* (1995). Les feuilles broyées ont été macérées dans un mélange méthanol/eau (7/3 : v/v) avec un rapport 1/10 (masse/v), sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est filtré sous vide et le méthanol est évaporé à sec à

l'évaporateur rotatif. L'extrait obtenu correspond à l'extrait brut (EBr) des feuilles. 50 ml de cet extrait ont été congelés puis lyophilisés afin de déterminer le rendement d'extraction. L'extrait brut restant a été extrait par l'hexane (1/1, v/v) plusieurs fois jusqu'à ce que la phase hexanique devienne transparente. Après évaporation à sec à l'évaporateur rotatif, on obtient un extrait hexanique (EHx). La phase aqueuse est ensuite extraite plusieurs fois par le chloroforme puis par l'acétate d'éthyle pour donner les extraits ECh et EAc. Ces deux extraits sont évaporés à sec à l'évaporateur rotatif. 50 ml de chaque extrait concentré (EHx, ECh, EAc et la phase aqueuse résiduelle EAq) ont été congelés puis lyophilisés afin de déterminer les rendements d'extraction. Les différents extraits obtenus après lyophilisation sont pesés pour déterminer le poids sec résultant. Les rendements ont été rapportés à 100 g de poudre de feuilles. Tous les lyophilisats ont été conservés à -20 °C jusqu'à leurs utilisations.

### II.3.3. Screening (criblage) phytochimique de quelques classes phénoliques

Les tests phytochimiques des différents extraits utilisés dans les activités biologiques sont réalisés à base de précipitations ou de colorations caractéristiques en vue de s'assurer de la présence des flavonoïdes d'une part, et d'autre part de mettre en évidence autres classes de composés phénoliques qui peuvent être présents dans les différents extraits obtenus. Ces essais sont réalisés soit sur les extraits soit sur les infusés à 10 % (Dohou *et al.*, 2003 ; Senhadji *et al.*, 2005 ; N'Guessan *et al.*, 2009).

La recherche des groupes chimiques a été déterminée par des réactions en tubes. Les résultats sont classés selon l'apparition en :

- +++ : réaction franchement positive,
- ++ : réaction positive,
- + : réaction moyennement positive,
- ± : réaction louche,
- - : réaction négative.

#### II.3.3.1. Détection des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) a permis de caractériser les polyphénols. À 2 ml de chaque extrait, nous avons ajouté une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols.

#### II.3.3.2. Caractérisation des tanins

Dans des tubes à essai, nous avons introduit 2,5 ml de chacun des extraits puis 0,5 ml de la solution aqueuse de trichlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1 %. La présence de tanins catéchiques ou galliques se traduit par le développement d'une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

La recherche des tanins catéchiques s'est réalisée à partir du réactif de Stiasny (10 ml de formaldéhyde + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré). 5 ml de chaque extrait ont été évaporés

à sec. Après ajout de 15 ml du réactif de Stiasny au résidu, le mélange a été maintenu au bain-Marie à 80 °C pendant 30 mn. Dans ces conditions, les tanins catéchiques sont condensés en précipité rouge confirmant leur présence dans le milieu.

Pour les tanins galliques, nous avons filtré la solution précédente. Le filtrat est recueilli et neutralisé par l'acétate de sodium. L'addition de quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 1 % provoquerait l'apparition d'une coloration bleu-noire intense, signe de la présence de tanins galliques

#### **II.3.3.3. Caractérisation des flavonoïdes**

À 1 ml d'extrait, nous ajoutons 5 ml d'alcool éthylique à 50 % puis 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement de chaleur puis une coloration rose orangée ou violacée apparaît en présence des flavonoïdes.

#### **II.3.3.4. Détection des coumarines**

Un infusé à 10 % de chaque extrait est mis dans un tube et exposé à la lumière U.V en utilisant une lampe ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ). L'apparition d'une intense fluorescence bleue ou verte indique la présence de coumarines et leurs dérivés. Nous nous assurons auparavant que les tubes ne présentent pas de fluorescence à vide. D'autres composés présentent également une fluorescence nette aux U.V. Cette mise en évidence ne correspond donc qu'à une indication et non pas une identification.

#### **II.3.3.5. Recherche des flavanes**

2 ml d'infusé à 10 % sont mélangés dans 2 ml l'acide chlorhydrique concentré renfermant 2 % de vanilline (2 g de vanilline dans 100 ml d'acide chlorhydrique). L'apparition d'une coloration rouge indique que la réaction est positive.

#### **II.3.3.6. Recherche des flavanols**

Introduire dans un tube à essai 2 ml d'infusé à 10 %, ajouter 2 ml d'éthanol chlorhydrique (éthanol à 95 %, eau distillée et acide chlorhydrique en parties égales en volumes de 5 ml) puis quelques copeaux de magnésium et 1 ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des flavanols.

#### **II.3.3.7. Recherche des anthocyanes**

2 ml d'infusé à 10 % sont ajoutés à 2 ml d'acide chlorhydrique 2 N. L'apparition d'une couleur rose-rouge qui vire au bleu-violacée après addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes.

#### **II.3.3.8. Recherche des proanthocyanidols**

À 2 ml d'infusé à 10 % sont additionnés 2 ml d'acide chlorhydrique concentré, le tout est laissé pendant 5 mn dans un bain-marie bouillon ; l'apparition d'une coloration rouge indique une réaction positive.

### II.3.4. Activités antimicrobiennes

Le test biologique constitue le meilleur précurseur permettant de découvrir les substances bioactives. Pour cela, nous avons testé l'effet antimicrobien et antifongique des produits finaux obtenus sur les souches microbiennes testées. Cette étude a été réalisée au laboratoire de microbiologie de la Faculté de Médecine à l'université de Djillali Liabès (Sidi Bel Abbés).

#### II.3.4.1. Les souches microbiennes testées

Les souches microbiennes utilisées dans l'activité antimicrobienne proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). Dans le test préliminaire de l'effet antimicrobien des flavonoïdes, six souches sont testées : quatre bactériennes (Gram- : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 et *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram+ : *Bacillus cereus* ATCC 1306 et *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) et deux fongiques (*Penicillium digitatum* ATCC 201167 et *Aspergillus niger* ATCC 16404). Aussi, pour évaluer l'influence de la localité d'échantillonnage sur le pouvoir antimicrobien des flavonoïdes, cinq souches sont utilisées : trois bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Proteus mirabilis* ATCC 35659) et deux fongiques (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 et *Candida albicans* ATCC 10231). Les souches utilisées font partie de deux groupes de microorganismes : pathogènes et contaminants.

##### II.3.4.1.A. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce germe appartient à la famille des Pseudomonadaceae. Bacille à gram négatif, aérobie et très mobile, très répandu dans l'environnement, pathogène opportuniste, parfois commensal de sujets sains, fréquemment résistant aux biocides et aux antibiotiques. Il s'agit de bactérie d'altération ou pathogène (parfois même mortelle). Un pathogène opportuniste puisqu'il va profiter de la diminution des défenses de l'organisme pour se développer, comme chez les patients atteints de mucoviscidose, ou au cours de l'hospitalisation dans des services de soins intensifs ou de brûlés. Le pathogène opportuniste, dont *P. aeruginosa* est un modèle, utilise l'opportunité que représente la baisse des défenses immunitaires de l'organisme pour provoquer des dommages chez l'hôte. Cela ne signifie pas qu'il ne peut se développer que chez l'immunodéficient ; il peut aussi créer des pathologies chez un individu sain mais ses atteintes seront plus fréquentes et plus sévères chez les immunodéficients. Un certain nombre de données anciennes ont laissé entendre que *P. aeruginosa* était capable de donner des diarrhées chez l'enfant ou le nourrisson (Mann *et al.*, 2000 ; Leclerc, 2002).

##### II.3.4.1.B. *Escherichia coli*

C'est une bactérie qui fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, germe que l'on trouve le plus communément dans les intestins de l'homme et des animaux à sang chaud. Le plus souvent, les souches de *E. coli* qui colonisent l'appareil gastro-intestinal sont des commensaux inoffensifs. Toutefois, à l'intérieur de cette espèce, on trouve quatre principaux types de souches pathogènes : *E. coli* entéropathogène (EPEC), *E. coli* entérotoxigène (ETEC), *E. coli* entéroinvasif (EIEC) et *E. coli* entérohémorragique (EHEC). Ces souches pathogènes sont

responsables de maladies intestinales qui varient en gravité, des formes bénignes jusqu'à des formes graves même être mortelle (le syndrome est mortel dans 20 à 30 % des cas) (Joly et Reynaud, 2002). Il en résulte que la lutte contre les maladies provoquées par ces souches passe nécessairement par une bonne hygiène personnelle et de l'éducation sanitaire du personnel chargé de manipulation des aliments (Manil, 2004).

#### **II.3.4.1.C. *Bacillus cereus***

Il s'agit d'un bâtonnet à coloration Gram positive, sporulant et aéro-anaérobie facultatif. Il est retrouvé sous forme de spores dans le sol où elles y seraient dormantes et se développeraient plutôt dans sa faune, par exemple dans le tube digestif d'insectes, d'arthropodes, de lombrics et même chez les animaux à sang chaud. *B. cereus* peut être responsable, bien que rarement, de mammites chez les bovins et d'avortements chez les bovins et ovins. La principale voie de transmission de cette bactérie à l'Homme est alimentaire. En effet, de par son abondance dans le sol et la résistance de ses spores, *B. cereus* peut contaminer pratiquement toutes les catégories d'aliments et particulièrement les végétaux. En effet, *B. cereus* est responsable d'intoxications se traduisant par des symptômes émétiques et de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques. D'autres formes graves d'infections (septicémie, entérocolite nécrosante, hépatite fulminante, encéphalopathie, abcès cérébral, décès) ont été décrites chez des prématurés, des nouveau-nés, chez des patients atteints d'une hémopathie maligne (Cserhalmi *et al.*, 2002 ; From *et al.*, 2005).

#### **II.3.4.1.D. *Staphylococcus aureus***

Les staphylocoques font partie de la famille des Micrococcaceae, sont des germes ubiquistes que l'on trouve dans l'eau, l'air, la poussière, le lait, les sols et les eaux usées. Le principal réservoir et habitat est constitué par le nez, la gorge, la peau des animaux et des humains. Les toxi-infections alimentaires causées par *S. aureus* sont très fréquentes, se manifestent surtout en faveur d'une hygiène défectueuse. Les symptômes qui peuvent survenir dans les 2 à 4 heures qui suivent la consommation des aliments contaminés sont les nausées, les vomissements et parfois, des diarrhées. Dans le cas grave, la déshydratation peut conduire au choc et au collapsus. Les complications liées à *S. aureus* peuvent être considérables, engendrant parfois des taux de mortalité de l'ordre de 20 % (Devriese *et al.*, 2005). De bonnes pratiques sanitaires ainsi que le contrôle de la température sont nécessaires pour éviter la contamination, la prolifération et la production des toxines (Vincenot *et al.*, 2008).

#### **II.3.4.1.E. *Proteus mirabilis***

Bacille mobile à Gram négatif qui fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, il est décrit depuis longtemps et bien connu des bactériologistes car il est fréquemment rencontré en pathologie humaine. C'est une bactérie commensale de l'intestin de l'homme et des animaux. Elle est souvent associée à : des infections urinaires communautaires ou nosocomiales, grâce à son uréase puissante qui peut alcaliniser les urines et être responsable de lithiases qui se comportent comme du matériel étranger et qui permet à l'infection de devenir chronique,

entraînant ainsi une destruction progressive du parenchyme rénal, des infections localisées surtout cutanées, mais d'autres localisations sont possibles (abcès du cerveau, infections pleurales et péritonéales, infection de cathéter.....), des infections des voies respiratoires surtout en milieu hospitalier (infections ORL et pneumopathies) (Sturgill et Rather, 2004 ; Ma *et al.*, 2012).

#### II.3.4.1.F. *Penicillium digitatum*

Ce champignon appartient à la subdivision des Deuteryomycètes, classe des Hyphomycètes et à la série des Phialidospores. C'est un parasite de blessure très ubiquiste qui se trouve dans le sol et dans l'eau et infecte principalement les fruits d'agrumes et les jus de fruits. Les colonies de *Penicillium digitatum* sur le milieu de culture artificiel (PDA) sont similaires à la pourriture développée sur un fruit infecté. La couleur des spores est verte d'où le nom de la pourriture verte donnée à la maladie. La pourriture verte causée par *Penicillium digitatum* est la maladie des agrumes la plus fréquente en post-récolte dans plusieurs pays agrumicoles. Généralement cette maladie est contrôlée par des fongicides synthétiques comme l'Imazalil et le Thiabendazole (Holmes et Echert, 1999 ; Palou *et al.*, 2002).

#### II.3.4.1.G. *Aspergillus niger*

C'est une espèce cosmopolite, bien que signalée dans le monde entier elle est un peu plus fréquente dans les zones tièdes et les sites exposés au sud. On peut la trouver aussi bien sur les sols glacés, dans les environnements marins que dans les steppes, pâturages, forêts et dunes. Mais c'est une espèce plus courante en zones sèches et dans les sols chauds. Cette espèce a été isolée de substrats et habitats divers, entre autres : bois, caoutchouc, cuir, matériaux synthétiques (plastiques, plastifiants), métaux, vernis, etc. Elle se développe aussi bien sous peu de lumière (à l'intérieur) que sous la forte lumière de l'extérieur. *A. niger* endommage le cuir en surface et en épaisseur. Elle provoque l'hydrolyse des huiles et des graisses en acides gras libres. C'est une souche toxique et pathogène, elle provoque des otomycoses (mycoses pulmonaires) chez l'homme et les oiseaux. Elle peut provoquer l'aspergillose du conduit auditif externe chez les sujets présentant une lésion préalable ou une malformation anatomique du conduit auditif. Cependant, elle possède des toxines à propriété insecticide, actives sur les moustiques responsables de la fièvre jaune. *A. niger* est importante économiquement car elle est utilisée dans la production industrielle, entre autres, des acides citrique et gluconique, de l' $\alpha$ -amylase et du glucose oxidase (Calvo *et al.*, 1980 ; Guglielminetti, 1994).

#### II.3.4.1.H. *Candida albicans*

*Candida albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée et aérobie, elle est considérée chez l'Homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne. C'est un champignon cosmopolite dont les fréquences d'isolement montrent que chez des sujets sains, la levure se répartit différemment en fonction des sites de prélèvement : peau (3 %), vagin (13 %), tractus ano-rectal (15 %),

cavité buccale (18 %), estomac et duodénum (36 %) et jéjunum et iléon (41%). Le réservoir principal est donc le tube digestif où la fréquence de portage varie selon les sujets. La contamination est essentiellement inter humaine, soit par transmission fécale, soit par contact direct (salive, sécrétions, mains). En milieu hospitalier, les levures du genre *Candida* et en particulier *C. albicans* représentent la cause majeure des infections nosocomiales opportunistes d'origine mycosique (Surarit *et al.*, 1988 ; Mavor *et al.*, 2005).

#### **II.3.4.2. Les milieux de culture**

Suivant les méthodes utilisées dans les essais et selon les souches, nous avons utilisé comme milieu de culture les suivants :

- Mueller Hinton (MH) pour la culture des bactéries,
- Oxytetracycline - Glucose - Agar (OGA) pour la culture des champignons.

#### **II.3.4.3. Tests de sensibilité : technique de diffusion en milieu solide**

##### **II.3.4.3.A. Préparation des concentrations**

La solubilisation des lyophilisats obtenus est faite dans le diméthylformamide (DMF) pur. Des essais témoins sont effectués *in vitro* pour le DMF pur vis-à-vis de chaque type de souche microbienne. Pour cela, nous n'avons enregistré aucune inhibition de la croissance pour l'ensemble des souches bactériennes et fongiques.

Pour la préparation des différentes concentrations des différents extraits, 1 mg de chaque extrait lyophilisé est introduit dans un tube à essai auquel 10 ml de DMF pur sont ajoutés. Les tubes sont agités au vortex jusqu'à dissolution totale de l'extrait. Pour tous les extraits, une solution mère à 100 µg/ml a été préparée. Les solutions mères sont diluées progressivement dans le DMF pur afin d'avoir pour chaque extrait, une gamme de solutions ayant des concentrations de 20, 40, 60 et 80 µg/ml. Ces quatre concentrations plus les concentrations mères (100 µg/ml), sont utilisées pour la détermination de leurs activités antimicrobiennes.

##### **II.3.4.3.B. Méthode d'étude**

Le test de la sensibilité des bactéries et des champignons est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, appelée encore la méthode des disques. Cette méthode est la plus utilisée par les laboratoires de diagnostic.

##### **II.3.4.3.B.1. Test antibactérien**

Cette méthode permet de mettre en évidence l'effet antibactérien des extraits testés sur les souches bactériennes, ainsi que la détermination de la résistance où la sensibilité de ces souches vis-à-vis des différents extraits (Essawi et asarour, 2000 ; Bssaibis *et al.*, 2009).

Pour la préparation de l'inoculum bactérien, chaque souche a étéensemencée en stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies isolées. Après incubation de 24 h à 37 °C, nous avons choisi 4 à 5 colonies bien isolées avec une anse de platine et nous les avons transférées dans un tube contenant 5 ml de solution d'eau physiologique stérile. L'ensemencement doit se

faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum. Dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm, 20 ml de gélose Mueller Hinton (MH) sont coulés et laissés pendant 15 mn pour se solidifier. Sur ce milieu de culture, 100 µl de suspension bactérienne est disposé et ensemencé sur toute la surface de la boîte de Pétri à l'aide d'un râteau en verre.

Des disques de 6 mm de diamètre préparés en papiers Whatman n° 1 et autoclavés pendant 15 mn, sont imprégnés à l'aide d'une pince métallique stérile dans chaque concentration (20, 40, 60, 80 et 100 µg/ml) et disposés sur la surface du milieu solidifié. Une fois appliqués, les disques ne doivent pas être déplacés. Les boîtes de Preti sont ainsi incubées dans une étuve à 37°C pendant vingt quatre à quarante huit heures.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle graduée et à l'extérieur de la boîte fermée, le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, déterminé par les différentes concentrations des différents extraits.

#### **II.3.4.3.B.2. Test antifongique**

Ce test met en évidence la sensibilité des souches fongiques vis-à-vis des extraits testés, permettant ainsi de les classer selon leurs diamètres d'inhibition (Senhadji *et al.*, 2005 ; Vinod *et al.*, 2010 ; Traoré *et al.*, 2012).

L'inoculum des champignons a été préparé de la même façon que celui des bactéries, en prenant deux tubes contenant chacun 5 ml d'eau physiologique stérile et à l'aide d'une anse en platine, nous avons raclé quelques colonies bien isolées de chacun des champignons testés qui vont être déchargés chacun dans un tube.

Dans des boîtes de Pétri stériles, nous avons versé 20 ml de gélose OGA (Oxytétracycline - Glucose - Agar). Après solidification du milieu, ce dernier est inoculé avec 100 µl de suspension des champignons à étudier ensuite étalé en surface à l'aide d'un râteau en verre.

Des disques stériles en papiers Whatman n° 1 de 6 mm de diamètre, imprégnés de différentes concentrations des extraits (20, 40, 60, 80 et 100 µg/ml) sont disposés sur la surface du milieu solidifié. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant une demi-heure à température ambiante, ensuite pendant 24 à 48 h dans une étuve.

Comme pour le test antibactérien, la détermination de l'activité antifongique a été faite en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance fongique n'est observée.

#### **II.3.4.3.C. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques**

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe ou de plusieurs germes à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique et de donner des indications sur l'efficacité «*in vitro*» de ces antibiotiques. De même pour un antifongigramme, qui consiste à déterminer «*in vitro*» la sensibilité des mycètes

vis-à-vis d'un ou de plusieurs antifongiques. Un autre but c'est de comparer les résultats des différents extraits obtenus avec ceux de l'antibiogramme et de l'antifongigramme.

Le choix des antifongiques et des antibiotiques est fait selon la disponibilité :

- les antibiotiques : la kanamicine, l'ampicilline, la piperacilline, la gentamicine, l'aztréonam, l'acide nalidixique, le chloramphénicol, la ceftazidime et l'imipénème,
- les antifongiques : l'amphotéricine B, le nitrate d'éconazole, le fluconazole et la terbinafine.

Le test de la sensibilité des bactéries et des moisissures vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques est réalisé par la même méthode utilisée pour les tests antibactériens et antifongiques des différents extraits obtenus.

#### II.3.4.3.C.1. Antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé suivant les mêmes étapes que celles décrites précédemment (diffusion sur milieu solide). Dans quatre boîtes de Pétri stériles, 1 ml de chaque suspension bactérienne est inoculée à la surface de 20 ml de gélose Mueller Hinton (MH) solide et étalée à l'aide d'un râteau en verre. À l'aide d'une pince métallique, des disques de papier buvard de 6 mm de diamètre, imprégnés d'antibiotiques commercialisés à doses connues (Tab. 15) sont appliqués à la surface à des distances déterminées. Les boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 à 48h. La lecture des résultats se fait à l'aide d'une règle graduée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque bactérie en cas d'une activité positive.

**Tableau 14** : Les antibiotiques commercialisés utilisés

Les antibiotiques	Signes	Concentrations (µg/ml)
Kanamycine	K	30
Ampicilline	AMP	10
Pipéracilline	PIP	100
Gentamicine	CN	10
Aztréonam	ATM	30
Chloramphénicol	C	30
Acide nalidixique	NA	30
Ceftazidime	CAZ	30
Imipénème	IPM	10

#### II.3.4.3.C.2. Antifongigramme

20 ml de gélose OGA (Oxytetracycline - Glucose - Agar) sont versés dans deux boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, ce dernier estensemencé avec quatre gouttes de suspension des champignons à étudier, chacun dans une boîte, ensuite étalées en surface. Les disques imprégnés d'antifongiques à différentes concentrations (Tab. 16) sont disposés à la surface du milieu solideensemencé. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48h. Les lectures sont effectuées en contrôlant le diamètre de la zone d'inhibition en cas d'une réponse positive aux agents.

**Tableau 15** : Les antifongiques commercialisés utilisés

Les antibiotiques	Signes	Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )
Amphotéricine	AMB 1	100
	AMB 2	50
	AMB 3	20
	AMB 4	10
Fluconazole	FLC 1	100
	FLC 2	50
	FLC 3	20
	FLC 4	10
Terbinafine	TER 1	100
	TER 2	50
	TER 3	20
	TER 4	10
Nitrate d'éconazole	N	20

#### II.3.4.3.D. Classement des souches testées selon leurs sensibilités aux antibiotiques et aux extraits

La catégorisation des souches bactériennes et fongiques lors de l'antibiogramme, de l'antifongogramme et vis-à-vis des différents extraits s'effectue comme suit (Tab. 17) : souches sensibles (+), intermédiaires ( $\pm$ ) et résistantes (-). Cette classification a été établie par Bonnet *et al.* (2012).

**Tableau 16** : Classement des souches microbiennes selon leurs sensibilités

Souche sensible (+)	Souche intermédiaire ( $\pm$ )	Souche résistante (-)
$10 \text{ mm} \leq \emptyset \leq D$	$d \leq \emptyset < 10 \text{ mm}$	$\emptyset < d$

Avec :

- **D** : diamètre critique haut (le plus grand diamètre atteint par la souche),
- **d** : diamètre critique bas (le plus petit diamètre atteint par la souche),
- **$\emptyset$**  : diamètre d'inhibition.

#### II.3.4.4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) : technique de dilution en milieu liquide

La détermination des CMI est faite en utilisant la méthode de microdilution en milieu gélosé (Billerbeck *et al.*, 2002 ; Yakhlef *et al.*, 2012) à partir d'une gamme de concentrations de l'extrait végétal. Elle est réalisée seulement pour les extraits végétaux les plus actifs constatés lors des tests de sensibilité en milieu solide, ce choix est arbitraire ( $\emptyset \geq 16 \text{ mm}$ ). Une série de dilution à raison géométrique de 2 sont réalisées à partir d'une solution mère de 200  $\mu\text{g/ml}$  de chaque extrait végétal préparé dans le DMF pur. Ces concentrations sont de : 100, 50, 25, 12,5, 6,25 et 3,12  $\mu\text{g/ml}$ .

2 ml de chaque dilution sont alors incorporés à 38 ml de milieu MH (bactéries) ou d'OGA (champignons). Les mélanges sont immédiatement répartis dans deux boîtes de Pétri à raison de 20 ml de milieu par boîte. Après solidification, l'inoculation des géloses, contenant l'extrait ou non (témoin), est effectuée en surface sous forme de quatre (pour les bactéries) ou cinq (pour les champignons) dépôts de 1 µl de chaque souche microbienne. Après incubation à 35°C pendant six jours, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance bactérienne ou fongique n'est visible comparativement au témoin sans extrait végétal.

### II.3.5. Activités antioxydantes

#### II.3.5.1. Quantification des phénols totaux et des flavonoïdes

Le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits flavonoïques des feuilles de *M. vulgare* prélevées de trois localités d'échantillonnage est fait selon les protocoles décrits précédemment (pages 77-78).

#### II.3.5.2. Test de piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 515 nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit en changeant de couleur et en virant vers le jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti radicalaire de l'échantillon.

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Benhammou *et al.* (2006). Un volume de 50 µl de l'extrait flavonoïque et des standards (acide ascorbique, acide gallique, acide caféique, acide tannique et catéchine) à différentes concentrations préparées dans le méthanol à raison géométrique de 2 (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 et 15,62 µg/ml) est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g de DPPH/l de méthanol) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Le blanc de la réaction contient seulement le méthanol. Après incubation à l'obscurité pendant 30 mn et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le calcul des pourcentages de l'activité antiradicalaire est effectué par la formule suivante :

$$AA \% = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Avec :

- **AA** : activité antiradicalaire ;
- **Ac** : absorbance du contrôle négatif ;
- **At** : absorbance de l'extrait végétale.

La concentration inhibitrice 50 % ( $IC_{50}$ ), aussi appelée efficient concentration 50 % ( $EC_{50}$ ), est la concentration de l'échantillon testé ou du standard, nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Ces concentrations sont calculées graphiquement par les équations de régressions linéaires résultantes des graphes tracés des pourcentages d'activité antioxydante (AA %) en fonction de différentes concentrations des extraits flavonoïques et des standards.

### II.2.6. Analyses statistiques

Des analyses de la variance (ANOVA) à un, deux et à plusieurs critères de classification au seuil de 5 % sont réalisées pour :

- la mise en évidence de l'effet du type de l'extrait flavonoïque et de sa concentration, la nature de la souche microbienne et la localité d'échantillonnage des feuilles de *M. vulgare* sur le pouvoir antimicrobien représenté par les diamètres d'inhibitions,
- la caractérisation de l'influence du type de l'extrait flavonoïque et sa concentration, et la localité de prélèvement des feuilles de *M. vulgare* sur les activités antioxydantes résumées par les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH.

Nous considérons que la différence est : non significative ( $p > 0,05$ ), significative ( $*p \leq 0,05$ ), hautement significative ( $**p \leq 0,01$ ) et très hautement significative ( $***p \leq 0,001$ ). Ces analyses sont exécutées par Minitab 16 en utilisant le test de Tukey pour les comparaisons deux à deux.

Pour la mise en évidence des corrélations existantes entre les concentrations moyennes en composés phénoliques (phénols totaux et flavonoïdes) des différents extraits flavonoïques et les concentrations inhibitrices 50 ( $CI_{50}$ ), des tests de corrélation de Pearson ont été réalisés au seuil de 5 % en utilisant le logiciel XLSTAT 2012. Nous considérons que les variables sont en corrélation si  $0,3 < R < 0,8$ .

## **CHAPITRE III : Résultats et discussion**

### III.1. Résultats

#### III.1.1. Étude quantitative et qualitative des composés phénoliques

##### III.1.1.1. Étude quantitative des composés phénoliques

##### III.1.1.1.A. Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles

###### III.1.1.1.A.1. Variations quantitatives des composés phénoliques

Afin de faire ressortir l'influence de chaque paramètre d'extraction sur les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés, les résultats obtenus sont représentés dans les figures 11 et 12. Les analyses de la variance à un seul, à deux ou à plusieurs critères de classification sont regroupées dans le tableau 17.

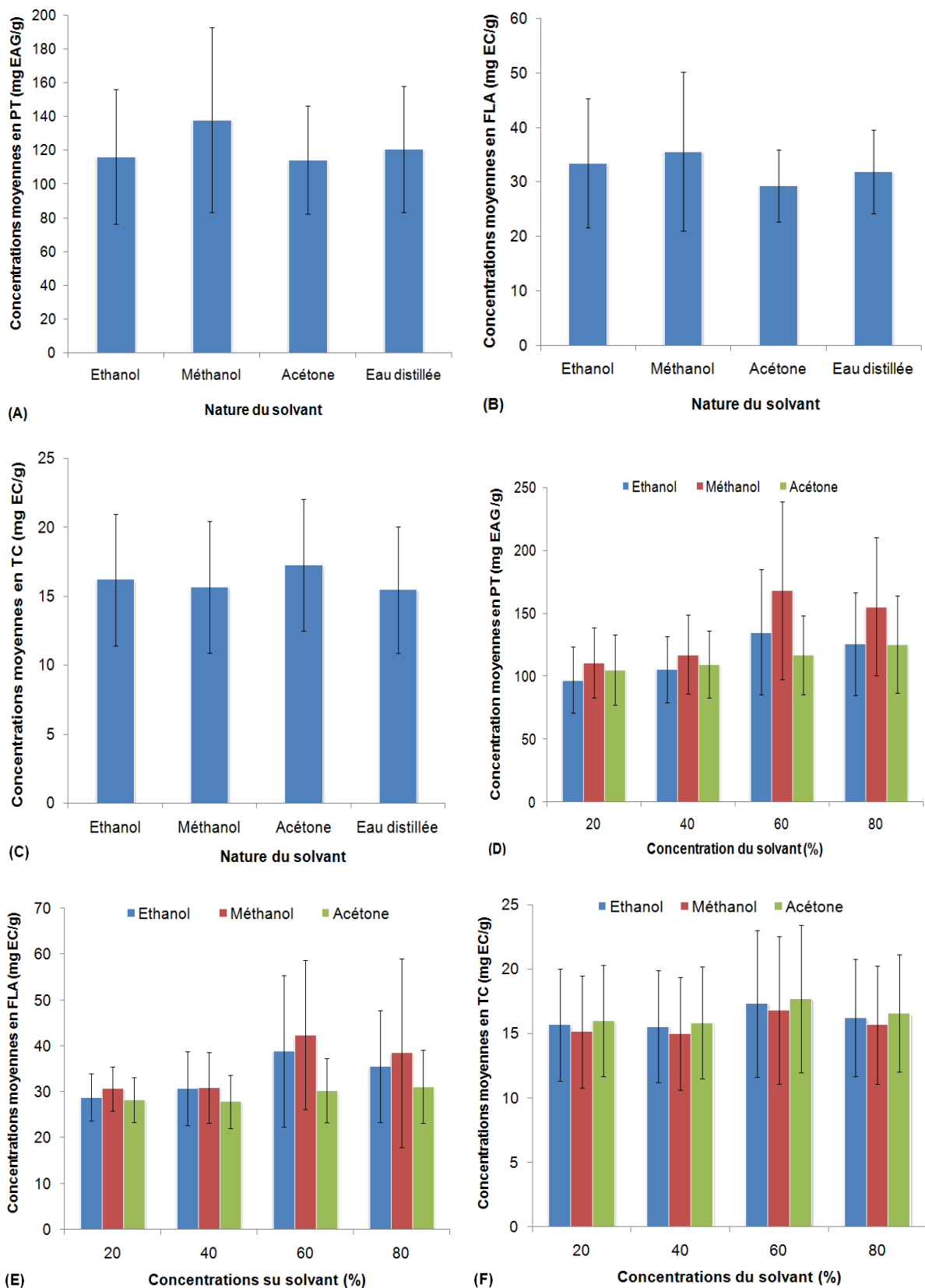
Selon la nature du solvant d'extraction, le méthanol avec des concentrations moyennes maximales respectives de  $137,97 \pm 54,62$  mg EAG/g et  $35,64 \pm 14,61$  mg EC/g s'est révélé le solvant d'extraction idéal pour les phénols totaux (Fig. 11, A) et les flavonoïdes (Fig. 11, B). Il est suivi respectivement par l'eau ( $120,59 \pm 37,34$  mg EAG/g), l'éthanol ( $115,97 \pm 39,78$  mg EAG/g) et l'acétone ( $114,28 \pm 32,13$  mg EAG/g) pour les phénols totaux, et par l'éthanol ( $33,46 \pm 11,88$  mg EC/g), l'eau ( $31,93 \pm 7,66$  mg EC/g) et l'acétone ( $29,38 \pm 6,60$  mg EAG/g) pour les flavonoïdes. En ce qui concerne les tanins condensés (Fig. 11, C), l'acétone avec une concentration moyenne maximale de  $17,24 \pm 4,77$  mg EC/g s'est révélé le meilleur solvant d'extraction. Il est suivi respectivement par l'éthanol ( $16,19 \pm 4,77$  mg EC/g), le méthanol ( $15,65 \pm 4,79$  mg EC/g) et l'eau ( $15,45 \pm 4,57$  mg EC/g).

Du point de vue concentration du solvant organique, 60 % est la concentration idéale pour les phénols totaux (Fig. 11, D) enregistrant ainsi des concentrations moyennes maximales de  $168,41 \pm 70,60$  mg EAG/g et  $135,22 \pm 49,51$  mg EAG/g avec le méthanol et l'éthanol respectivement, par contre l'acétone avec une concentration de 80 % enregistre une concentration maximale de  $125,50 \pm 38,77$  mg EAG/g. Chez les flavonoïdes (Fig. 11, E), 60 % est la concentration idéale pour le méthanol ( $42,40 \pm 16,22$  mg EC/g) et l'éthanol ( $38,83 \pm 16,55$  mg EC/g), 80 % pour l'acétone ( $31,13 \pm 8,00$  mg EC/g). Pour les tanins condensés (Fig. 11, F), 60 % est la concentration idéale pour tous les solvants organiques testés :  $17,68 \pm 5,69$  mg EC/g avec l'acétone,  $17,33 \pm 5,69$  mg EC/g avec l'éthanol et  $16,79 \pm 5,71$  mg EC/g avec le méthanol.

En ce qui concerne le temps d'extraction, 180 mn est le temps parfait pour l'extraction des phénols totaux (Fig. 12, A) quel que soit le solvant utilisé :  $155,16 \pm 69,83$  mg EAG/g avec le méthanol,  $146,28 \pm 55,81$  mg EAG/g avec l'eau distillée,  $133,89 \pm 53,81$  mg EAG/g avec l'éthanol et  $117,45 \pm 28,46$  avec l'acétone. Pour les flavonoïdes (Fig. 12, B), le meilleur temps d'extraction est évalué à 450 mn pour le méthanol ( $35,93 \pm 17,90$  mg EC/g), 270 mn pour l'acétone ( $29,91 \pm 7,30$  mg EC/g) et l'eau distillée ( $33,62 \pm 9,09$  mg EC/g), tandis que 450 mn est le temps idéal pour l'éthanol ( $34,14 \pm 13,76$ ). 180 mn est le temps idéal pour

l'extraction des tanins condensés (Fig. 12, C) pour tous les solvants organiques :  $17,51 \pm 5,18$  mg EC/g avec l'acétone,  $17,20 \pm 4,38$  mg EC/g avec l'éthanol,  $16,75 \pm 5,46$  mg EC/g avec l'eau distillée et  $16,61 \pm 5,89$  mg EC/g avec le méthanol.

Pour la température d'extraction, quelque soit le solvant d'extraction utilisé, 25 °C est la température idéale pour l'extraction des phénols totaux (Fig. 12, D) enregistrant des concentrations moyennes maximales de  $194,16 \pm 15,45$  mg EAG/g avec le méthanol,  $161,01 \pm 28,36$  mg EAG/g avec l'eau distillée,  $156,01 \pm 17,49$  mg EAG/g avec l'éthanol et  $146,37 \pm 17,28$  mg EAG/g avec l'acétone. Cette même température (25 °C) a enregistré des concentrations moyennes maximales en flavonoïdes (Fig. 12, E) et ceci pour tous les solvants d'extraction utilisés :  $53,31 \pm 1,83$  mg EC/g avec le méthanol,  $47,81 \pm 2,40$  mg EC/g avec l'éthanol,  $40,41 \pm 5,20$  mg EC/g avec l'eau distillée et  $36,99 \pm 1,35$  mg EC/g avec l'acétone. Pour les tanins condensés (Fig. 12, F), les plus fortes concentrations sont obtenues à 50 °C pour tous les solvants d'extraction :  $22,18 \pm 1,27$  mg EC/g avec l'acétone,  $21,86 \pm 1,29$  mg EC/g avec l'éthanol,  $21,32 \pm 1,37$  mg EC/g avec le méthanol et  $21,11 \pm 1,88$  mg EC/g avec l'eau distillée.



**Figure 11 :** Effets de la nature du solvant organique (A, B, C) et de sa concentration (D, E, F) sur les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés.

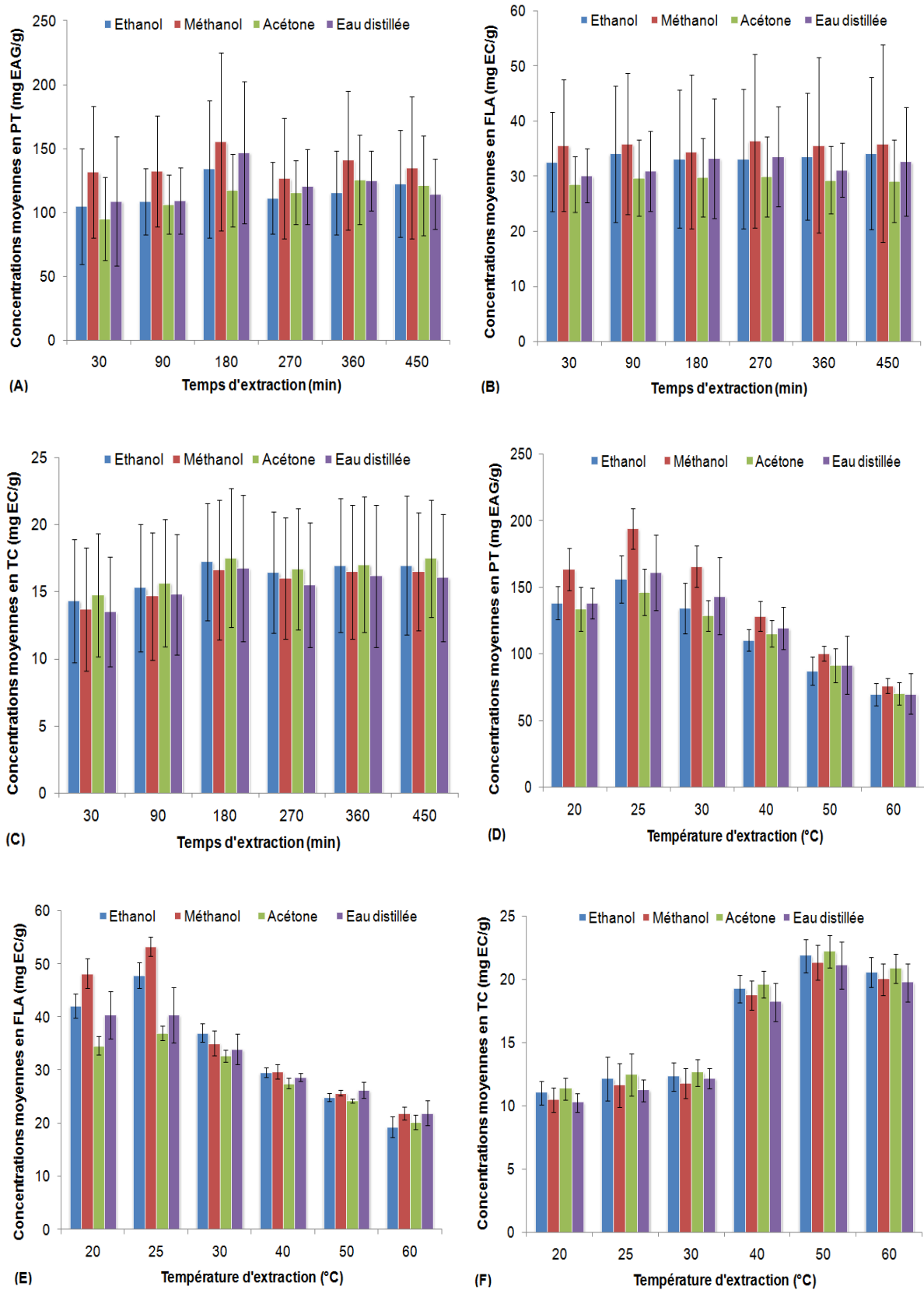


Figure 12 : Effets du temps d'extraction (A,B,C) et de la température d'extraction (D,E,F) sur les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés.

**Tableau 17** : Analyse de la variance (ANOVA) à plusieurs critères de classification : effet des conditions d'extraction sur les concentrations moyennes en polyphénols.

Source	DDL	SC	CM	F	p > F
Solvant	2	40326,1 <sup>PT</sup>	20163,1 <sup>PT</sup>	262,15 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		2326,12 <sup>FL</sup>	1163,06 <sup>FL</sup>	274,61 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		43,14 <sup>TC</sup>	21,57 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Concentration	4	107832,8 <sup>PT</sup>	26958,2 <sup>PT</sup>	350,49 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		5132,83 <sup>FL</sup>	1283,21 <sup>FL</sup>	302,98 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		257,24 <sup>TC</sup>	64,31 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Temps	5	45983,2 <sup>PT</sup>	9196,6 <sup>PT</sup>	119,57 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		111,09 <sup>FL</sup>	22,22 <sup>FL</sup>	5,25 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		592,16 <sup>TC</sup>	118,43 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Température	5	553938,7 <sup>PT</sup>	110787,7 <sup>PT</sup>	1440,39 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		39821,11 <sup>FL</sup>	7964,22 <sup>FL</sup>	1880,44 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		10589,43 <sup>TC</sup>	2117,89 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Solvant*Concentration	8	31097,1 <sup>PT</sup>	3887,1 <sup>PT</sup>	50,54 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		1654,30 <sup>FL</sup>	206,79 <sup>FL</sup>	48,82 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		10,91 <sup>TC</sup>	1,36 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Solvant*Temps	10	7922,1 <sup>PT</sup>	792,2 <sup>PT</sup>	10,30 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		54,86 <sup>FL</sup>	5,49 <sup>FL</sup>	1,30 <sup>FL</sup>	0,235
		2,59 <sup>TC</sup>	0,26 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Solvant*Température	10	14801,5 <sup>PT</sup>	1480,1 <sup>PT</sup>	19,24 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		2422,48 <sup>FL</sup>	242,25 <sup>FL</sup>	57,20 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		0,00 <sup>TC</sup>	0,00 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Concentration*Temps	20	35664,5 <sup>PT</sup>	1783,2 <sup>PT</sup>	23,18 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		599,22 <sup>FL</sup>	29,96 <sup>FL</sup>	7,07 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		100,97 <sup>TC</sup>	5,05 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Concentration*Température	20	48446,9 <sup>PT</sup>	2422,3 <sup>PT</sup>	31,49 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		7603,54 <sup>FL</sup>	380,18 <sup>FL</sup>	89,76 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		233,26 <sup>TC</sup>	11,66 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Temps*Température	25	18241,9 <sup>PT</sup>	729,7 <sup>PT</sup>	9,49 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		767,42 <sup>FL</sup>	30,70 <sup>FL</sup>	7,25 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		92,06 <sup>TC</sup>	3,68 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Solvant*Concentration*Temps	40	8775,9 <sup>PT</sup>	219,4 <sup>PT</sup>	2,58 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		314,37 <sup>FL</sup>	7,86 <sup>FL</sup>	1,86 <sup>FL</sup>	0,003**
		1,26 <sup>TC</sup>	0,03 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Solvant*Température*Concentration	40	18002,2 <sup>PT</sup>	450,1 <sup>PT</sup>	5,85 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		3061,91 <sup>FL</sup>	76,55 <sup>FL</sup>	18,07 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		0,00 <sup>TC</sup>	0,00 <sup>TC</sup>	0,00 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Solvant*Temps*Température	50	5440,4 <sup>PT</sup>	108,8 <sup>PT</sup>	1,41 <sup>PT</sup>	0,050*
		272,27 <sup>FL</sup>	5,45 <sup>FL</sup>	1,29 <sup>FL</sup>	0,116
		0,00 <sup>TC</sup>	0,00 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Concentration*Temps*Température	100	46098,9 <sup>PT</sup>	461,0 <sup>PT</sup>	5,99 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		1176,72 <sup>FL</sup>	11,77 <sup>FL</sup>	2,78 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		176,67 <sup>TC</sup>	1,77 <sup>TC</sup>	ND <sup>TC</sup>	< 0,0001***

**DDL** : degré de liberté ; **SC** : somme des carrés ; **CM** : carrés moyens ; **F** : Fisher ; **p** : probabilité ; **ND** : valeur nulle ou non définie ; **PT** : phénols totaux ; **FL** : flavonoïdes ; **TC** : tanins condensés.

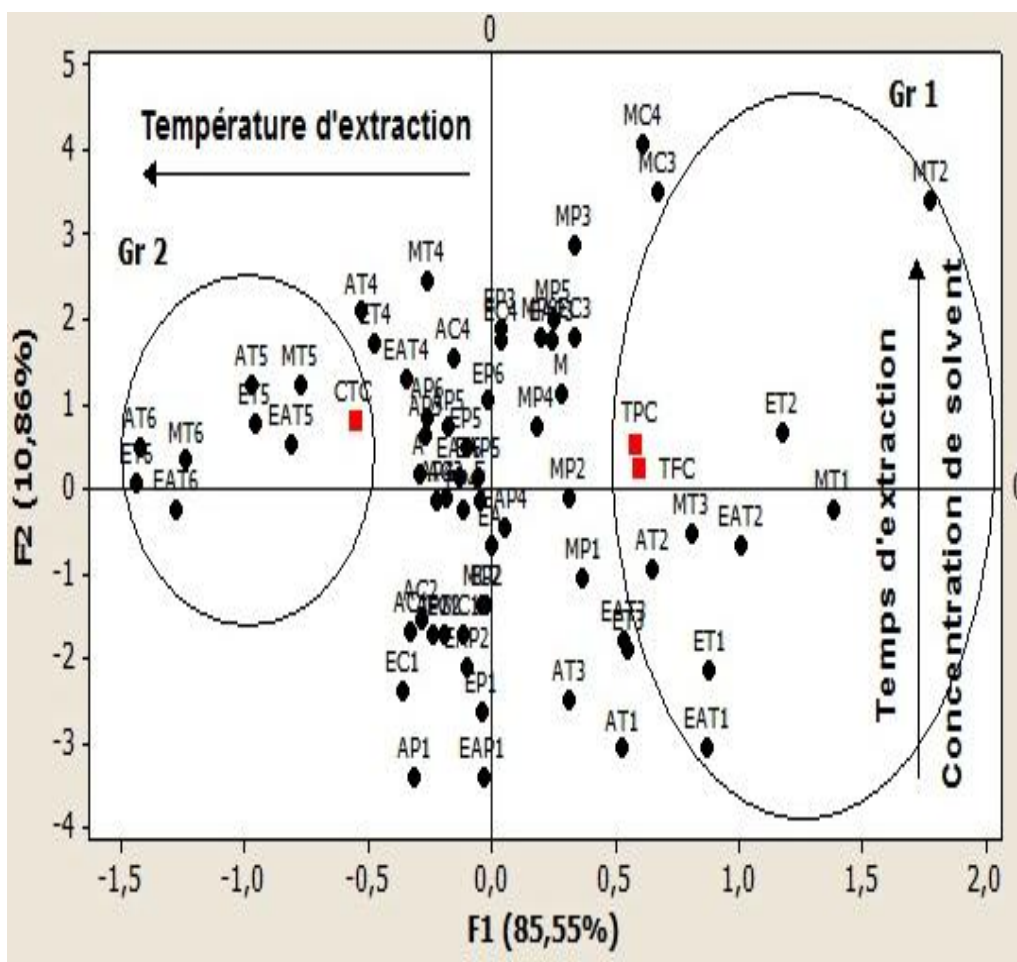
**III.1.1.1.A.2. Analyse en composantes principales (ACP)**

La superposition du cercle de corrélation des variables sur le plan factoriel des individus (Fig. 13), fait ressortir deux groupes sur l'axe F1 qui représente 85,55 % de l'information totale contre 10,86 % expliqué par l'axe F2 :

- groupe (Gr 1) du coté positif formé par les phénols totaux (TPC avec une contribution de 0,932) et les flavonoïdes (TFC avec une contribution de 0,958). Ces deux métabolites secondaires sont liés aux extraits éthanolique, méthanolique et aqueux à des basses températures 20 °C et 25 °C (ET1, ET2, MT1, MT2, EAT1, EAT2 avec des contributions respectives de 2,285 ; 3,040 ; 3,578 ; 4,596 ; 2,253 et 2,618),
- groupe (Gr 2) du coté négatif constitué par les tanins condensés (CTC avec une contribution de - 0,883). Ce composé phénolique se trouve attaché aux extraits éthanolique, acétonique et aqueux aux fortes températures 50 °C et 60 °C (ET5, ET6, AT5, AT6, EAT5 et EAT6 avec des contributions respectives de - 2,473 ; - 3,705 ; - 2,506 ; - 3,661 ; - 2,089 et - 3,290).

Aussi, en tenant compte des contributions des individus et des variables sur l'axe F1, nous avons pu définir deux gradients (Fig. 13) :

- un gradient horizontal de la droite vers la gauche de l'axe F1, formé par la température d'extraction, ce qui explique la position des flavonoïdes et des phénols totaux à droite de l'axe F1 en corrélation avec les basses températures, et l'emplacement des tanins condensés à gauche de l'axe F1 en corrélation avec les fortes températures,
- un gradient vertical du bas vers le haut de l'axe F1, constitué par la concentration du solvant organique et le temps d'extraction. Ceci explique la position des trois composés phénoliques dosés en haut de l'axe F1, en corrélation avec les fortes concentrations (60 % pour les phénols totaux et les tanins condensés, 80 % pour les flavonoïdes) et les temps élevés (180 mn pour phénols totaux et les tanins condensés, 450 mn pour les flavonoïdes).



**Figure 13** : Analyse en composantes principales (ACP).

**Gr** : groupe ; **M** : méthanol ; **E** : éthanol ; **EA** : eau ; **A** : acétone ; **TPC** : phénols totaux ; **TFC** : flavonoïdes ; **CTC** : tanins condensés ; **P** : temps en mn (1 : 30 ; 2 : 90 ; 3 : 180 ; 4 : 270 ; 5 : 360 ; 6 : 450) ; **T** : température en °C (1 : 20 ; 2 : 25 ; 3 : 30 ; 4 : 40 ; 5 : 50 ; 6 : 60) ; **C** : concentration en % (1 : 20 ; 2 : 40 ; 3 : 60 ; 4 : 80).

#### III.1.1.1.A.3. Méthode de réponse de surface

Les résultats dégagés par la méthode de réponse de surface sont illustrés dans la figure 14. Les équations de régression des modèles choisis pour chaque type de composés phénoliques dosés ainsi que les coefficients de corrélations sont :

- pour les phénols totaux :  $Y = 323,205 - 827,094 X_1 - 4,2516 X_2 + 0,015029 X_3 + 843,115 X_1^2 + 17,1341 X_1 X_2 - 13,5293 X_2 X_1^2 - 0,0615286 X_1 X_2^2$ , avec un  $R^2 = 82,03$  %,
- pour les flavonoïdes :  $Y = 32,4239 + 31,9683 X_1 + 0,42576 X_2 + 0,0308808 X_3 + 98,4907 X_1^2 - 0,0108914 X_2^2 - 2,96617 X_1 X_2 - 0,00163763 X_3 X_2 - 0,00122396 X_1 X_3 X_2 + 0,0702683 X_3 X_1^2 - 2,22016 X_2 X_1^2 + 2,10557e-5 X_3 X_2^2 + 0,0492972 X_1 X_3^2$ , et un  $R^2 = 77,61$  %,

- pour les tanins condensés :  $Y = -2,19999 + 7,81089 X_1 + 0,603279 X_2 + 0,01403 X_3 - 12,395 X_1^2 - 0,00405521 X_2^2 - 2,96468e-5 X_3^2 - 0,220734 X_1X_2 + 0,00680008 X_3X_1^2 + 0,388604 X_2X_1^2 + 2,36161e-7 X_2X_3^2$ , et un  $R^2 = 90,62 \%$ .

La méthode de réponse de surface dégage des concentrations théoriques maximales de :

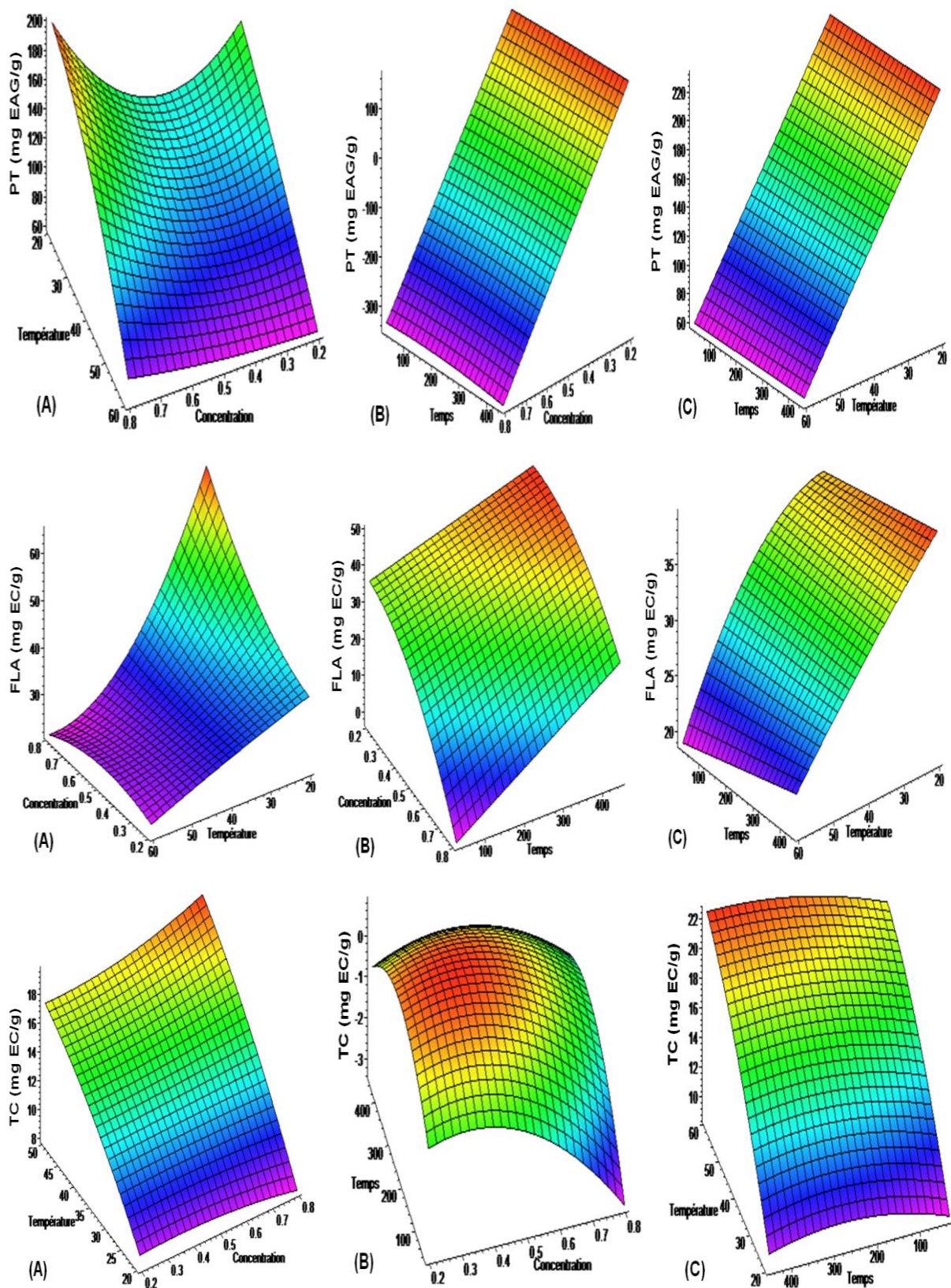
- 204,75 mg EAG/g de phénols totaux avec le méthanol 80 % à 20 °C et pendant 167 mn,
- 79,46 mg EC/g de flavonoïdes avec le méthanol 80 % à 20 °C et pendant 450 mn,
- 20,81 mg EC/g tanins condensés enregistrés avec l'acétone 60 %, 50 °C et pendant 180 mn.

La comparaison entre les valeurs expérimentales et théoriques (Tab. 18) des concentrations maximales en polyphénols dosés, montre que les deux ensembles de valeurs sont très proches. En effet, les concentrations moyennes maximales en flavonoïdes (expérimentale : 79,52 mg EC/g et théorique : 79,46 mg EC/g) et en tanins condensés (expérimentale : 28,15 mg EC/g et théorique : 20,81 mg EC/g) sont obtenus avec les mêmes conditions d'extraction expérimentales et théoriques (méthanol 80 % à 20 °C et pendant 450 mn pour les flavonoïdes et acétone 60 % à 50 °C et pendant 180 mn pour les tanins condensés). Pour les phénols totaux, les concentrations maximales ainsi que les conditions d'extraction théoriques et expérimentales sont différentes (expérimentales : 293,34 mg EAG/g obtenu avec le méthanol 60 % à 25 °C et pendant 180 mn ; théoriques : 204,75 mg EAG/g obtenu avec le méthanol 80 % à 20 °C et pendant 167 mn). Dans l'ensemble, la comptabilité des résultats théoriques et expérimentales enregistrées indique que le modèle expérimentale choisi est valide.

**Tableau 18** : Valeurs expérimentales et théoriques maximales des concentrations en polyphénols dosés et des paramètres d'extraction.

	Concentrations en polyphénols		Nature du solvant		Concentration du solvant		Température d'extraction		Temps d'extraction	
	VE	VT	VE	VT	VE	VT	VE	VT	VE	VT
<b>Phénols totaux</b>	293,34	204,75	Méthanol		60	80	25	20	180	167
<b>Flavonoïdes</b>	79,52	79,46	Méthanol		80	80	20	20	450	450
<b>Tanins condensés</b>	28,15	20,81	Acétone		60	60	50	50	180	180

VE : valeur expérimentale, VT : valeur théorique.



**Figure 14 :** Tracé de surface de réponse de l'effet de la concentration du solvant-température d'extraction (A), concentration du solvant-temps d'extraction (B) et temps d'extraction-température d'extraction (C) sur les concentrations en composés phénoliques.

### III.1.1.1.B. Effet des paramètres environnementaux sur les concentrations en polyphénols chez différents organes

#### III.1.1.1.B.1. Variations saisonnières et mensuelles des composés phénoliques

Les variations saisonnières des différents composés phénoliques dosés chez les organes de *M. vulgare* sont représentées par les figures 15 et 16. Les concentrations moyennes mensuelles (minimales et maximales) sont regroupées dans le tableau 19.

Les phénols totaux :

- pour les feuilles (Fig. 15, A), les concentrations les plus élevées sont obtenues au printemps (S1, S3, S4 et S5) et en été (S2 et S6). Une concentration moyenne maximale de 244,93 mg EAG/g est notée en mai dans S1 et minimale de 99,26 mg EAG/g en mars dans S4 (Tab. 19),
- pour les tiges (Fig. 15, D), c'est pendant l'été que les plus fortes concentrations sont obtenues (S1, S4, S5 et S6) et au printemps (S2 et S3). Une concentration moyenne maximale (98,54 mg EAG/g) est notée pour S1 en juillet et minimale (38,58 mg EAG/g) en mars pour S4 (Tab. 19),
- pour les racines (Fig. 16, A), le printemps est la saison où les plus grandes concentrations sont enregistrées dans la majorité des stations étudiées (S2, S3, S4, S5 et S6) ; en revanche pour S1, l'été est la saison optimale. Une concentration maximale de 70,21 mg EAG/g est enregistrée en mai pour S5 et la concentration minimale de 19,65 mg EAG/g est notée en mars dans S3 (Tab. 19),
- sur les trois organes précités (feuilles, tiges et racines), l'hiver et l'automne enregistrent toujours les concentrations les plus faibles en phénols totaux,
- sur les fleurs (Fig. 16, D), les concentrations les plus élevées sont obtenues en été (S1, S2, S3 et S5) et au printemps (S4 et S6). Une concentration moyenne maximale de 148,26 mg EAG/g en juillet pour S5 et une concentration moyenne minimale de 84,89 mg EAG/g en septembre pour S4 (Tab. 19).

Les flavonoïdes :

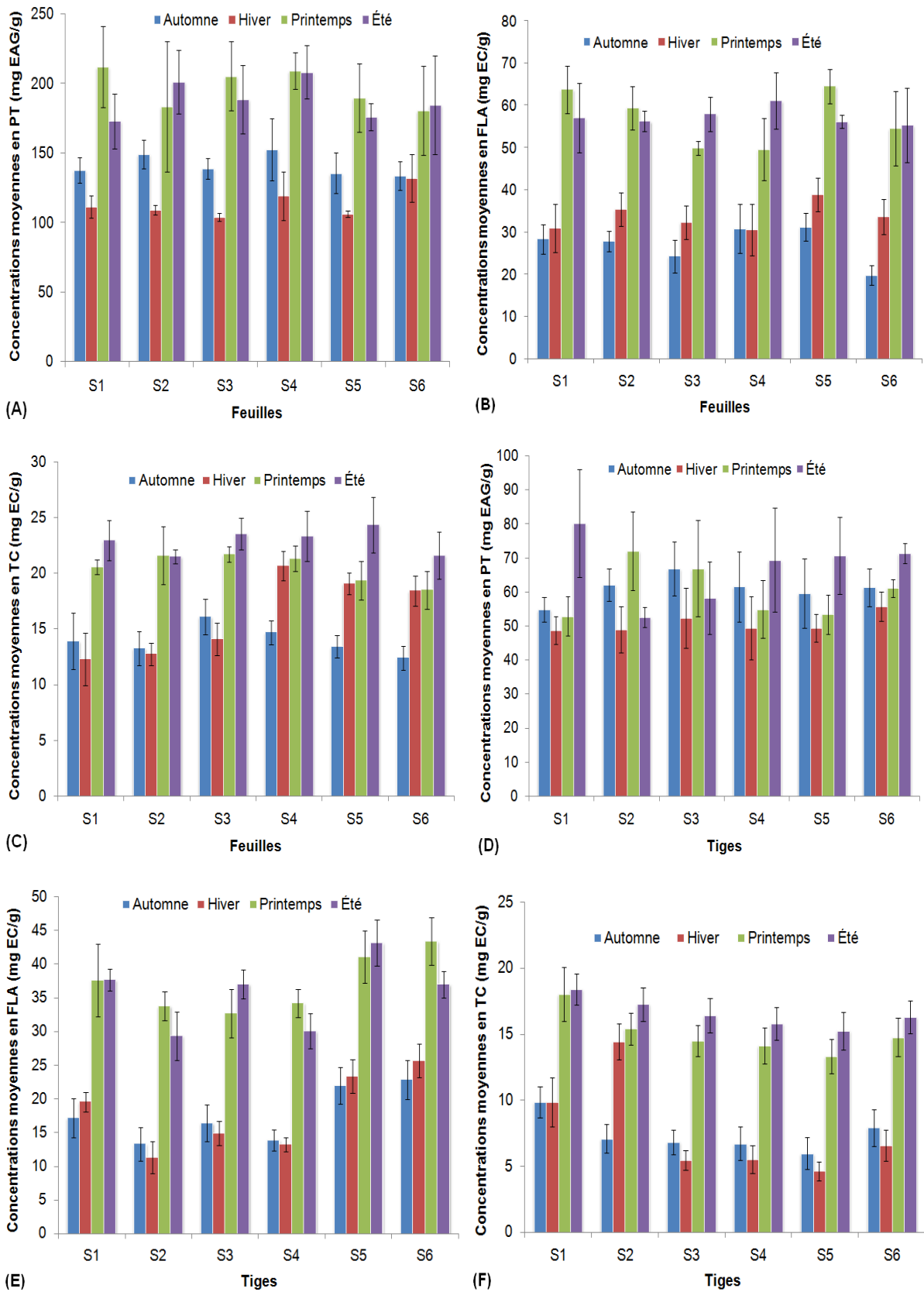
- pour les feuilles (Fig. 15, B), les concentrations optimales sont enregistrées au printemps (S1, S2 et S5) et en été (S3, S4 et S6). La concentration moyenne maximale de 70,07 mg EC/g est enregistrée dans S1 en mai, par contre la concentration moyenne minimale de 18,38 mg EC/g est notée en novembre pour S6 (Tab. 19),
- pour les tiges (Fig. 15, E), le printemps est la saison où les concentrations en flavonoïdes sont optimales (S1, S2, S4 et S6), tandis que l'été l'est dans deux stations (S3 et S5). Une concentration moyenne maximale de 47,42 mg EC/g est

évaluée dans S6 en avril, tandis qu'une concentration moyenne minimale de 8,57 mg EC/g est notée en février dans S2 (Tab. 19),

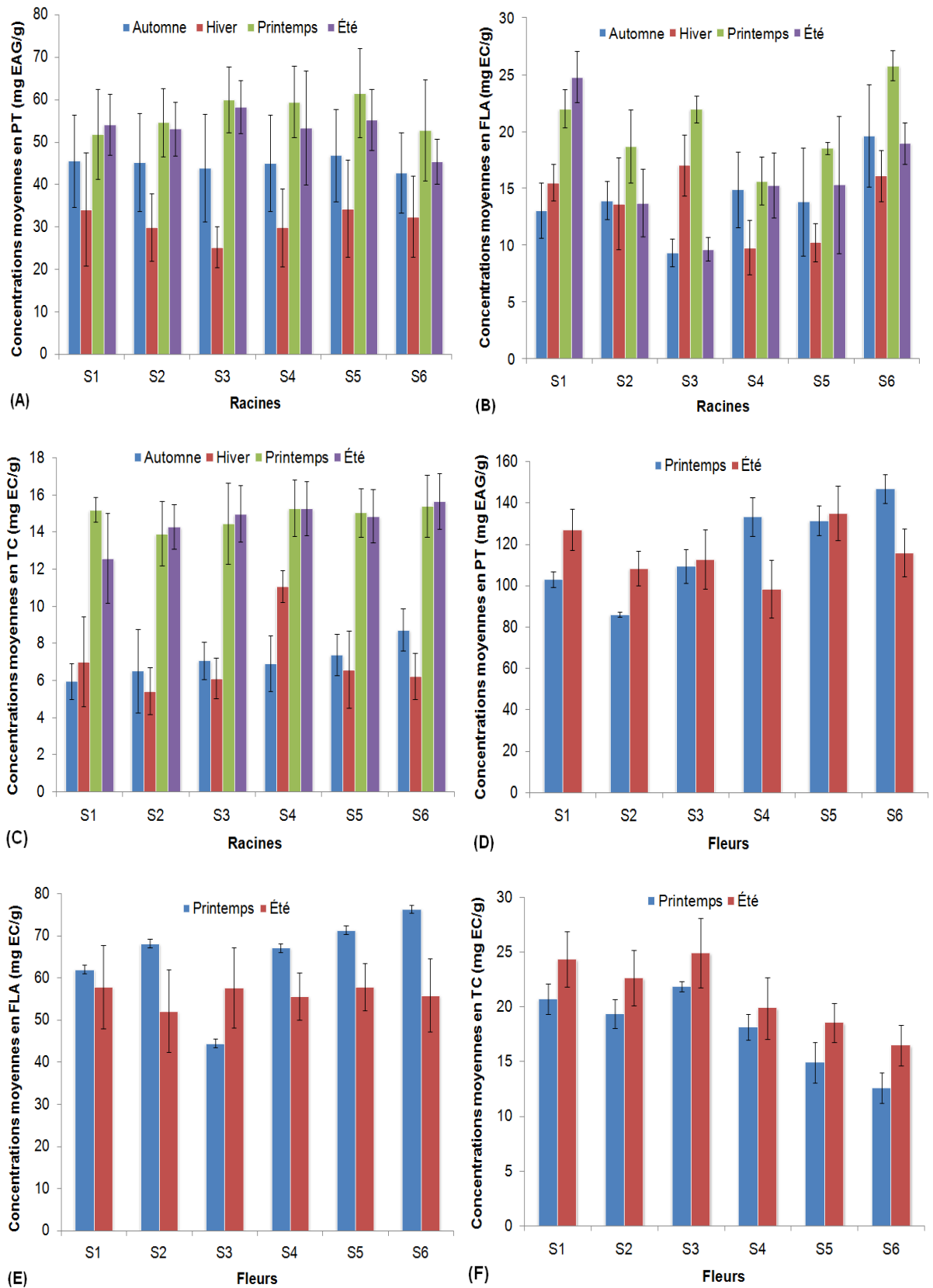
- pour les racines (Fig. 16, B), les concentrations moyennes les plus élevées sont obtenues au printemps (S2, S3, S4, S6) et en été (S1 et S5). La concentration moyenne maximale de 27,25 mg EC/g est obtenue dans S6 en juin, et minimale de 8,05 mg EC/g en novembre dans S3 (Tab. 19),
- en ce qui concerne les trois organes (feuilles, tiges et racines), l'automne et l'hiver présentent toujours les plus faibles concentrations,
- pour les fleurs (Fig. 16, E), le printemps est la saison optimale pour la majorité des stations (S1, S2, S4, S5 et S6) ; par contre l'été l'est pour S3. Une concentration moyenne maximale de 76,31 mg EC/g est enregistrée en juin pour S6, et minimale de 42,72 mg EC/g pour la S2 en septembre (Tab. 19).

Les tanins condensés :

- les concentrations maximales chez les feuilles (Fig. 15, C) sont notées en été (S1, S3, S4, S5 et S6) et au printemps (S2). Une concentration moyenne maximale de 26,57 mg EC/g est relevée en septembre pour S5, et minimale de 9,67 mg EC/g en janvier pour la S1 (Tab. 19),
- pour les tiges (Fig. 15, F), les concentrations optimales sont enregistrées au printemps pour toutes les stations étudiées avec une concentration moyenne maximale de 20,02 mg EC/g enregistrée en juin pour S1, et minimale de 3,85 mg EC/g en mars pour S5 (Tab. 19),
- concernant les racines (Fig. 16, C), les concentrations les plus élevées sont notées au printemps (S1, S2, S3, S4 et S5) et en été (S6). Une concentration moyenne maximale de 16,68 mg EC/g est enregistrée en septembre pour S6, et minimale de 4,02 mg EC/g en février pour la S2 (Tab. 19),
- pour tous les organes précités, les saisons d'automne et d'hiver présentent les plus faibles concentrations en tanins condensés,
- sur les fleurs (Fig. 16, F), les plus fortes concentrations sont notées en été pour toutes les stations étudiées. Une concentration moyenne maximale de 27,54 mg EC/g est enregistrée en août pour S3, et minimale de 12,58 mg EC/g en juin pour S6 (Tab. 19).



**Figure 15 :** Variations saisonnières des concentrations moyennes en composés phénoliques dosés sur les feuilles (A, B et C) et les tiges (D, E et F)



**Figure 16 :** Variations saisonnières des concentrations moyennes en composés phénoliques dosés sur les racines (A, B et C) et les fleurs (D, E et F)

**Tableau 19** : Concentrations moyennes mensuelles (maximales et minimales) des polyphénols dosés sur différents organes.

Organes	Stations	Phénols totaux		Flavonoïdes		Tanins condensés	
		Mois Max.-Min.	Concentrations Max.-Min.	Mois Max.-Min.	Concentrations Max.-Min.	Mois Max.-Min.	Concentrations Max.-Min.
Feuilles	S1	Mai-Mars	<b>244,93</b> -103,98	Mai-Jan.	<b>70,07</b> -24,81	Août-Jan.	24,99- <u>9,67</u>
	S2	Juin-Fév.	236,56-106,36	Avr.-Nov.	63,76-25,06	Juin-Fév.	24,56-11,58
	S3	Juin-Jan.	233,3-100,96	Août-Déc.	61,58-20,23	Août-Mars	25,16-13,06
	S4	Juil.-Mars	230,37- <u>99,26</u>	Août-Fév.	68,69-23,62	Juil.-Déc.	25,74-13,94
	S5	Mai-Jan.	210,33-104,14	Mai-Déc.	68,17-27,6	Sep.-Déc.	<b>26,57</b> -12,65
	S6	Mai-Mars	217,19-113,46	Juin-Nov.	64,36- <u>18,38</u>	Août-Jan.	23,96-16,99
Tiges	S1	Juil.-Fév.	<b>98,54</b> -46,16	Juin-Déc.	38,84-14,63	Juin-Jan.	<b>20,02</b> -7,71
	S2	Mai-Mars	85,49-41,16	Avr.-Fév.	36,18- <u>8,57</u>	Août-Déc.	18,11-5,98
	S3	Juin-Jan.	80,41-42,27	Juil.-Fév.	39,46-12,81	Juil.-Fév.	17,34-4,79
	S4	Août-Mars	87- <u>38,58</u>	Avr.-Jan.	36,64-12,4	Août-Fév.	16,67-4,49
	S5	Sep.-Fév.	81-46,76	Sep.-Déc.	46,96-18,83	Sep.-Mars	16,21- <u>3,85</u>
	S6	Juil.-Jan.	74,69-51,8	Avr.-Déc.	<b>47,42</b> -19,54	Sep.-Jan.	17,14-5,66
Racines	S1	Avr.-Fév.	64,14-22,83	Sep.-Déc.	26,99-10,89	Juin-Fév.	15,23-4,4
	S2	Mai-Jan.	63,5-21,92	Mai-Janv.	22,23-9,36	Août-Fév.	15,19- <u>4,02</u>
	S3	Mai-Mars	68,58- <u>19,65</u>	Mai-Nov.	22,76- <u>8,05</u>	Sep.-Mars	15,99-5,15
	S4	Juin-Jan.	68,94-22,79	Juil.-Déc.	17,97-11,05	Sep.-Déc.	16,17-5,77
	S5	Mai-Fév.	<b>70,21</b> -24,14	Sep.-Fév.	22,25-9,27	Juil.-Jan.	15,74-4,26
	S6	Avr.-Fév.	64,38-24,42	Juin-Jan.	<b>27,25</b> -14,05	Sep.-Fév.	<b>16,68</b> -5,02
Fleurs	S1	Sep.-Juin	138,54-103,26	Juil.-Août	65,99-46,85	Sep.-Juin	26,57-20,72
	S2	Sep.-Juin	117,23-86,32	Juin-Sep.	68,21- <u>42,72</u>	Sep.-Juin	24,88-19,36
	S3	Juil.-Sep.	123,3-96,48	Août-juin	68,61-44,5	Août-juil.	<b>27,54</b> -21,44
	S4	Juin-Sep.	133,46- <u>84,89</u>	Juin-Sep.	67,1-51,21	Sep.-Juil.	21,9-16,67
	S5	Juil.-Août	<b>148,26</b> -122,27	Juin-Sep.	71,35-53,39	Juil.-Juin	20,12-14,89
	S6	Juin-Sep.	146,96-110,53	Juin-Sep.	<b>76,31</b> -47,75	Août-Juin	18,36- <u>12,58</u>

**S** : Station ; **Max.** : maximum ; **Min.** : minimum, **Jan.** : janvier, **Fév.** : février, **Avr.** : avril ; **Juil.** : juillet ; **Sep.** : septembre ; **Nov.** : novembre ; **Déc.** : décembre.

Les analyses de la variance à plusieurs critères de classification sont regroupées dans les tableaux 20, 21, 22, 23 et 24.

**Tableau 20** : Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet des saisons (automne-hiver-printemps) sur les organes végétatifs (feuilles-tiges-racines).

Source	DDL	SC	CM	F	p > F
Station	5	1091 <sup>PT</sup>	218 <sup>PT</sup>	1,14 <sup>PT</sup>	= 0,338
		2511,3 <sup>FL</sup>	502,3 <sup>FL</sup>	32,83 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		89,38 <sup>TC</sup>	17,88 <sup>TC</sup>	7,73 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Saison	2	123027 <sup>PT</sup>	61514 <sup>PT</sup>	321,54 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		33194,6 <sup>FL</sup>	16597,3 <sup>FL</sup>	1084,70 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		5182,23 <sup>TC</sup>	2591,12 <sup>TC</sup>	1120,32 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Organe	2	1089294 <sup>PT</sup>	544647 <sup>PT</sup>	2846,92 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		44875,4 <sup>FL</sup>	22437,7 <sup>FL</sup>	1466,40 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		5327,11 <sup>TC</sup>	2663,56 <sup>TC</sup>	1151,64 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Station*Saison	10	5526 <sup>PT</sup>	553 <sup>PT</sup>	2,89 <sup>PT</sup>	= 0,002**
		767,8 <sup>FL</sup>	76,8 <sup>FL</sup>	5,02 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		229,36 <sup>TC</sup>	22,94 <sup>TC</sup>	9,92 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Station*Organe	10	5941 <sup>PT</sup>	594 <sup>PT</sup>	3,11 <sup>PT</sup>	= 0,001**
		2958,7 <sup>FL</sup>	295,9 <sup>FL</sup>	19,34 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		708,50 <sup>TC</sup>	70,85 <sup>TC</sup>	30,63 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Saison*Organe	4	89140 <sup>PT</sup>	22285 <sup>PT</sup>	116,49 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		8052,2 <sup>FL</sup>	2013,1 <sup>FL</sup>	131,56 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		200,17 <sup>TC</sup>	50,04 <sup>TC</sup>	21,64 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Saison*Station*Organe	20	9778 <sup>PT</sup>	489 <sup>PT</sup>	2,56 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		1376,8 <sup>FL</sup>	68,8 <sup>FL</sup>	4,50 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		783,38 <sup>TC</sup>	39,17 <sup>TC</sup>	16,94 <sup>TC</sup>	< 0,0001***

**Tableau 21** : Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet des mois de l'automne (octobre-novembre-décembre) sur les organes végétatifs (feuilles-tiges-racines).

Source	DDL	SC	CM	F	p > F
Station	5	1268,2 <sup>PT</sup>	253,6 <sup>PT</sup>	5,15 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		544,36 <sup>FL</sup>	108,87 <sup>FL</sup>	20,93 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		28,928 <sup>TC</sup>	5,786 <sup>TC</sup>	5,26 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois	2	2009,0 <sup>PT</sup>	1004,5 <sup>PT</sup>	20,41 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		64,80 <sup>FL</sup>	32,40 <sup>FL</sup>	6,23 <sup>FL</sup>	= 0,003**
		70,572 <sup>TC</sup>	35,286 <sup>TC</sup>	32,07 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Organe	2	287866,4 <sup>PT</sup>	143933,2 <sup>PT</sup>	2923,92 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		5102,63 <sup>FL</sup>	2551,32 <sup>FL</sup>	490,39 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		1619,894 <sup>TC</sup>	809,947 <sup>TC</sup>	736,19 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Station*Mois	10	1828,6 <sup>PT</sup>	182,9 <sup>PT</sup>	3,71 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		357,03 <sup>FL</sup>	35,70 <sup>FL</sup>	6,86 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		27,671 <sup>TC</sup>	2,767 <sup>TC</sup>	2,52 <sup>TC</sup>	= 0,009**
Station*Organe	10	2130,3 <sup>PT</sup>	213,0 <sup>PT</sup>	4,33 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		1307,78 <sup>FL</sup>	130,78 <sup>FL</sup>	25,14 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		169,166 <sup>TC</sup>	16,917 <sup>TC</sup>	15,38 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois*Organe	4	3309,8 <sup>PT</sup>	827,5 <sup>PT</sup>	16,81 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		251,73 <sup>FL</sup>	62,93 <sup>FL</sup>	12,10 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		34,564 <sup>TC</sup>	8,641 <sup>TC</sup>	7,85 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois*Station*Organe	20	5755,5 <sup>PT</sup>	287,8 <sup>PT</sup>	5,85 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		479,33 <sup>FL</sup>	23,97 <sup>FL</sup>	4,61 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		76,473 <sup>TC</sup>	3,824 <sup>TC</sup>	3,48 <sup>TC</sup>	< 0,0001***

**Tableau 22** : Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet des mois de l'hiver (janvier-février-mars) sur les organes végétatifs (feuilles-tiges-racines).

Source	DDL	SC	CM	F	$p > F$
Station	5	2709,3 <sup>PT</sup>	541,9 <sup>PT</sup>	10,57 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		964,30 <sup>FL</sup>	192,86 <sup>FL</sup>	31,86 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		223,499 <sup>TC</sup>	44,700 <sup>TC</sup>	48,68 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois	2	63,4 <sup>PT</sup>	31,7 <sup>PT</sup>	0,62 <sup>PT</sup>	= 0,541
		152,04 <sup>FL</sup>	76,02 <sup>FL</sup>	12,56 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		17,441 <sup>TC</sup>	8,720 <sup>TC</sup>	9,50 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Organe	2	198630,5 <sup>PT</sup>	99315,3 <sup>PT</sup>	1936,67 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		11767,36 <sup>FL</sup>	5883,68 <sup>FL</sup>	972,04 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		2800,542 <sup>TC</sup>	1400,271 <sup>TC</sup>	1524,81 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Station*Mois	10	2446,3 <sup>PT</sup>	244,6 <sup>PT</sup>	4,77 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		358,50 <sup>FL</sup>	35,85 <sup>FL</sup>	5,92 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		58,069 <sup>TC</sup>	5,807 <sup>TC</sup>	6,32 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Station*Organe	10	3449,9 <sup>PT</sup>	345,0 <sup>PT</sup>	6,73 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		1382,78 <sup>FL</sup>	138,28 <sup>FL</sup>	22,84 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		1178,449 <sup>TC</sup>	117,845 <sup>TC</sup>	128,33 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois*Organe	4	4303,2 <sup>PT</sup>	1075,8 <sup>PT</sup>	20,98 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		43,35 <sup>FL</sup>	10,84 <sup>FL</sup>	1,79 <sup>FL</sup>	= 0,136
		18,584 <sup>TC</sup>	4,646 <sup>TC</sup>	5,06 <sup>TC</sup>	= 0,001**
Mois*Station*Organe	20	4139,5 <sup>PT</sup>	207,0 <sup>PT</sup>	4,04 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		646,51 <sup>FL</sup>	32,33 <sup>FL</sup>	5,34 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		127,991 <sup>TC</sup>	6,400 <sup>TC</sup>	6,97 <sup>TC</sup>	< 0,0001***

**Tableau 23** : Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet des mois du printemps (avril-mai-juin) sur les organes végétatifs (feuilles-tiges-racines).

Source	DDL	SC	CM	F	$p > F$
Station	5	2639 <sup>PT</sup>	528 <sup>PT</sup>	5,90 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		1517,44 <sup>FL</sup>	303,49 <sup>FL</sup>	37,10 <sup>FL</sup>	= 0,462
		66,315 <sup>TC</sup>	13,263 <sup>TC</sup>	15,28 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois	2	1898 <sup>PT</sup>	949 <sup>PT</sup>	10,60 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		12,72 <sup>FL</sup>	6,36 <sup>FL</sup>	0,78 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		9,903 <sup>TC</sup>	4,952 <sup>TC</sup>	5,70 <sup>TC</sup>	= 0,004**
Organe	2	691937 <sup>PT</sup>	345968 <sup>PT</sup>	3865,91 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		9978,66 <sup>FL</sup>	4989,33 <sup>FL</sup>	609,98 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		1106,845 <sup>TC</sup>	553,423 <sup>TC</sup>	637,51 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Station*Mois	10	9434 <sup>PT</sup>	943 <sup>PT</sup>	10,54 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		188,13 <sup>FL</sup>	18,81 <sup>FL</sup>	2,30 <sup>FL</sup>	= 0,017
		36,533 <sup>TC</sup>	3,653 <sup>TC</sup>	4,21 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Station*Organe	10	10139 <sup>PT</sup>	1014 <sup>PT</sup>	11,33 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		470,55 <sup>FL</sup>	47,06 <sup>FL</sup>	5,75 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		144,265 <sup>TC</sup>	14,427 <sup>TC</sup>	16,62 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois*Organe	4	2597 <sup>PT</sup>	649 <sup>PT</sup>	7,26 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		387,46 <sup>FL</sup>	96,86 <sup>FL</sup>	11,84 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		142,073 <sup>TC</sup>	35,518 <sup>TC</sup>	40,9 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois*Station*Organe	20	24342 <sup>PT</sup>	1217 <sup>PT</sup>	13,60 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		136,66 <sup>FL</sup>	6,83 <sup>FL</sup>	0,84 <sup>FL</sup>	= 0,666
		67,516 <sup>TC</sup>	3,376 <sup>TC</sup>	3,89 <sup>TC</sup>	< 0,0001***

**Tableau 24** : Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet des mois de l'été (juillet-août-septembre) sur les organes analysés (feuilles-tiges-racines-fleurs).

Source	DDL	SC	CM	F	$p > F$
Station	5	1061,9 <sup>PT</sup>	212,4 <sup>PT</sup>	2,74 <sup>PT</sup>	= 0,022
		926,05 <sup>FL</sup>	185,21 <sup>FL</sup>	19,85 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		143,616 <sup>TC</sup>	28,723 <sup>TC</sup>	34,37 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois	2	2530,2 <sup>PT</sup>	1265,1 <sup>PT</sup>	16,30 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		100,54 <sup>FL</sup>	50,27 <sup>FL</sup>	5,39 <sup>FL</sup>	= 0,006
		129,540 <sup>TC</sup>	64,770 <sup>TC</sup>	77,50 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Organe	3	606567,8 <sup>PT</sup>	202189,3 <sup>PT</sup>	2604,28 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		61226,69 <sup>FL</sup>	20408,90 <sup>FL</sup>	2187,69 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		2405,898 <sup>TC</sup>	801,966 <sup>TC</sup>	959,54 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Station*Mois	10	4769,6 <sup>PT</sup>	477,0 <sup>PT</sup>	6,14 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		981,50 <sup>FL</sup>	98,15 <sup>FL</sup>	10,52 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		40,171 <sup>TC</sup>	4,017 <sup>TC</sup>	4,81 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Station*Organe	15	20579,4 <sup>PT</sup>	1372,0 <sup>PT</sup>	17,67 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		1890,17 <sup>FL</sup>	126,01 <sup>FL</sup>	13,51 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		535,162 <sup>TC</sup>	35,677 <sup>TC</sup>	42,69 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois*Organe	6	5554,2 <sup>PT</sup>	925,7 <sup>PT</sup>	11,92 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		733,05 <sup>FL</sup>	122,17 <sup>FL</sup>	13,10 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		48,568 <sup>TC</sup>	8,095 <sup>TC</sup>	9,69 <sup>TC</sup>	< 0,0001***
Mois*Station*Organe	30	18648,9 <sup>PT</sup>	621,6 <sup>PT</sup>	8,01 <sup>PT</sup>	< 0,0001***
		2643,44 <sup>FL</sup>	88,11 <sup>FL</sup>	9,45 <sup>FL</sup>	< 0,0001***
		288,898 <sup>TC</sup>	9,630 <sup>TC</sup>	11,52 <sup>TC</sup>	< 0,0001***

#### III.1.1.1.B.2. Analyse factorielle des correspondances (AFC)

La projection des variables et des individus sur le plan factoriel (Axe F1 x Axe F2) permet de faire ressortir l'existence de trois groupes répartis sur les deux cotés de l'axe F1, où un taux maximum d'inertie de 54,32 % est fourni contre 27,33 % pour l'axe F2 (Fig. 17) :

- le groupe 1 (Gr 1), situé sur le coté positif de l'axe F1, est formé essentiellement par les fleurs prélevées au printemps sur plusieurs stations (S1FLP, S2FLP, S4FLP, S5FLP et S6FLP avec des contributions respectives de 0,198 ; 0,330 ; 0,099 ; 0,118 et 0,091). Ce groupe est corrélé aux flavonoïdes (FL) dont la contribution est de 0,226,
- le groupe 2 (Gr 2), situé également sur le coté positif de l'axe F1, est constitué de feuilles et surtout de fleurs d'été et de printemps (S1FE, S3FLP, S2FLE, S1FLE, S4FLE et S3FLE avec des contributions respectives de 0,075 ; 0,059 ; 0,123 ; 0,084 ; 0,188 et 0,152). Ce groupe est corrélé aux tanins condensés (TC) dont la contribution est de 0,179,
- le groupe 3 (Gr 3), situé dans le coté négatif de l'axe F1, est constitué particulièrement de feuilles de printemps et d'été de différentes stations (S1FP, S5FP, S6FP, S5FE, S6FE, S4FE, S3FP et S4FP avec des contributions respectives

de -0,138 ; -0,079 ; -0,105 ; -0,070 ; -0,123 ; -0,190 ; -0,196). Ce groupe est corrélé aux phénols totaux (PT) dont la contribution de -0,119.

En prenant compte les contributions des individus et des variables sur l'axe F1, deux gradients s'individualisent (Fig. 17) :

- un gradient horizontal du coté négatif vers le coté positif de l'axe F1, mettant en évidence la corrélation existante entre les deux organes les plus riches en polyphénols (feuilles et fleurs) et les saisons de printemps et d'été,
- un gradient vertical du haut vers le bas de l'axe F1, faisant ressortir la corrélation existante entre les deux organes pauvres en composés phénoliques et les saisons d'automne et d'hiver.

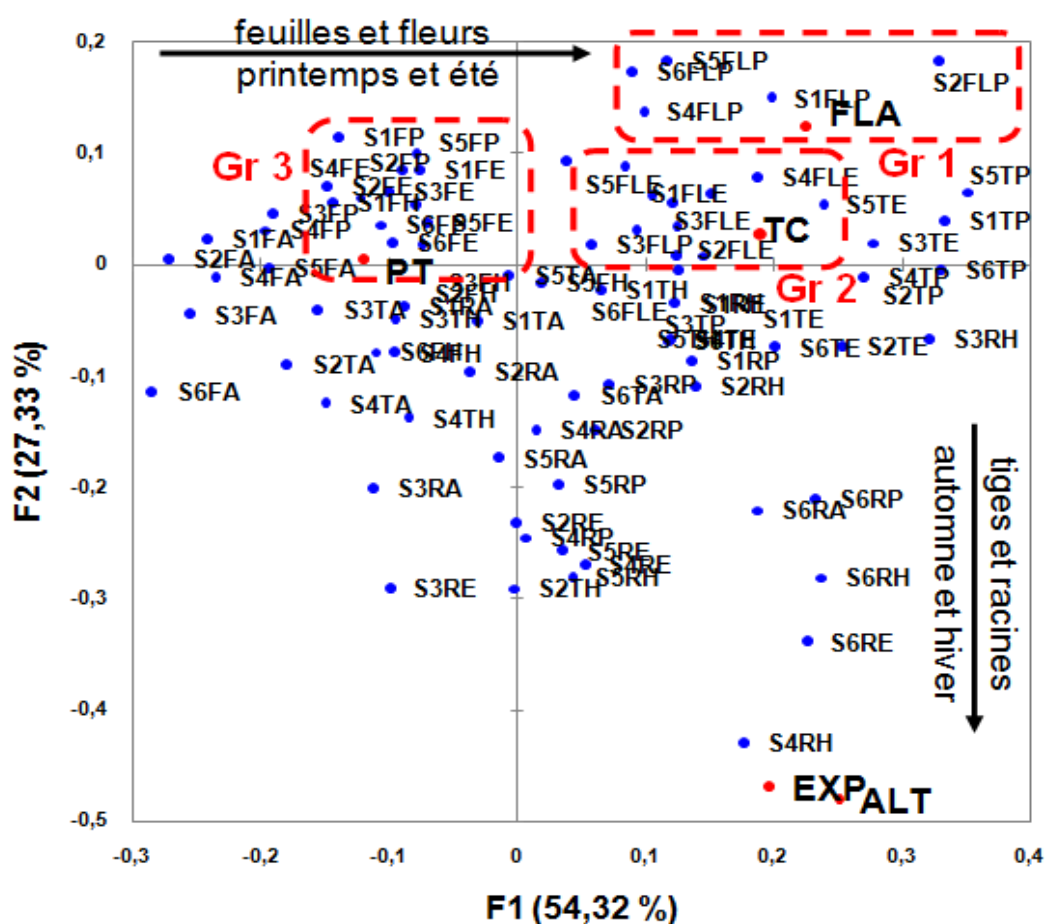


Figure 17 : Analyse factorielle des correspondances (AFC)

**Gr** : groupe ; **PT** : phénols totaux ; **FLA** : flavonoïdes ; **TC** : tanins condensés, **EXP** : exposition ; **ALT** : altitude ; première lettre (**S** : station) ; les chiffres (de 1 à 6 : numéros des stations d'échantillonnage ; deuxième lettre (**F** : feuilles ; **T** : tiges ; **R** : Racines ; **FL** : fleurs) ; troisième lettre (**A** : automne ; **H** : hiver ; **P** : printemps ; **E** : été).

### III.1.1.2. Étude qualitative des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée

#### III.1.1.2.A. Standards phénoliques

Les résultats relatifs aux temps de rétentions (Tr) et des aires de pic des différents standards phénoliques testés sont regroupés dans le tableau 25. Aussi, les profils chromatographiques sont illustrés par les figures 18 et 19.

**Tableau 25** : Temps de rétention et aires des pics des standards phénoliques testés (acides phénoliques et flavonoïdes).

Standards phénoliques		
Acide phénoliques	Temps de rétention (mn)	Aires des pics
Acide chlorogénique	3,62	153019536
Acide férulique	8,37	1838394496
Acide ellagique	8,41	48864868
Acide tannique	4,96	99345208
Acide caféique	2,47	18737578
Acide vanillique	5,02	344181536
Acide hydrocinnamique	10,30	1168703232
Acide syringique	5,30	230363328
Acide gallique	2,82	52505272
Vanilline	6,75	1511309696
Flavonoïdes		
Diosmétine	23,68	1080889856
Nobilétine	27,64	905116672
Lutéoline	17,12	3793842432
Kaempférol	22,12	3863920640
Diosmine	29,73	28050426
Catéchine	9,50	68073088
Silibinine	28,51	325225664
Naringine	10,52	186818432
Naringinine	19,15	384443392
Tangéritine	28,73	261425184

Les résultats mentionnés ci-dessus montrent que les temps de rétention des standards phénoliques sont répartis par ordre chronologique comme suit :

- pour les acides phénoliques référenciés : acide caféique (Tr= 2,47 mn), acide gallique (Tr= 2,82 mn), acide chlorogénique (Tr= 3,62 mn), acide tannique (Tr= 4,96 mn), acide vanillique (Tr= 5,02 mn), acide syringique (Tr= 5,30 mn), vanilline (Tr= 6,75 mn), acide férulique (Tr= 8,37 mn), acide ellagique (Tr= 8,41 mn) et acide hydrocinnamique (Tr= 10,30 mn),
- pour les standards flavonoïques : catéchine (Tr= 9,50 mn), naringine (Tr= 10,52 mn), lutéoline (Tr= 17,12 mn), naringinine (Tr= 19,15 mn), kaempférol (Tr= 22,12 mn), diosmétine (Tr= 23,68 mn), nobilétine (Tr= 27,64 mn), silibinine (Tr= 28,51 mn), tangéritine (Tr= 28,73 mn) et diosmine (Tr= 29,73 mn).

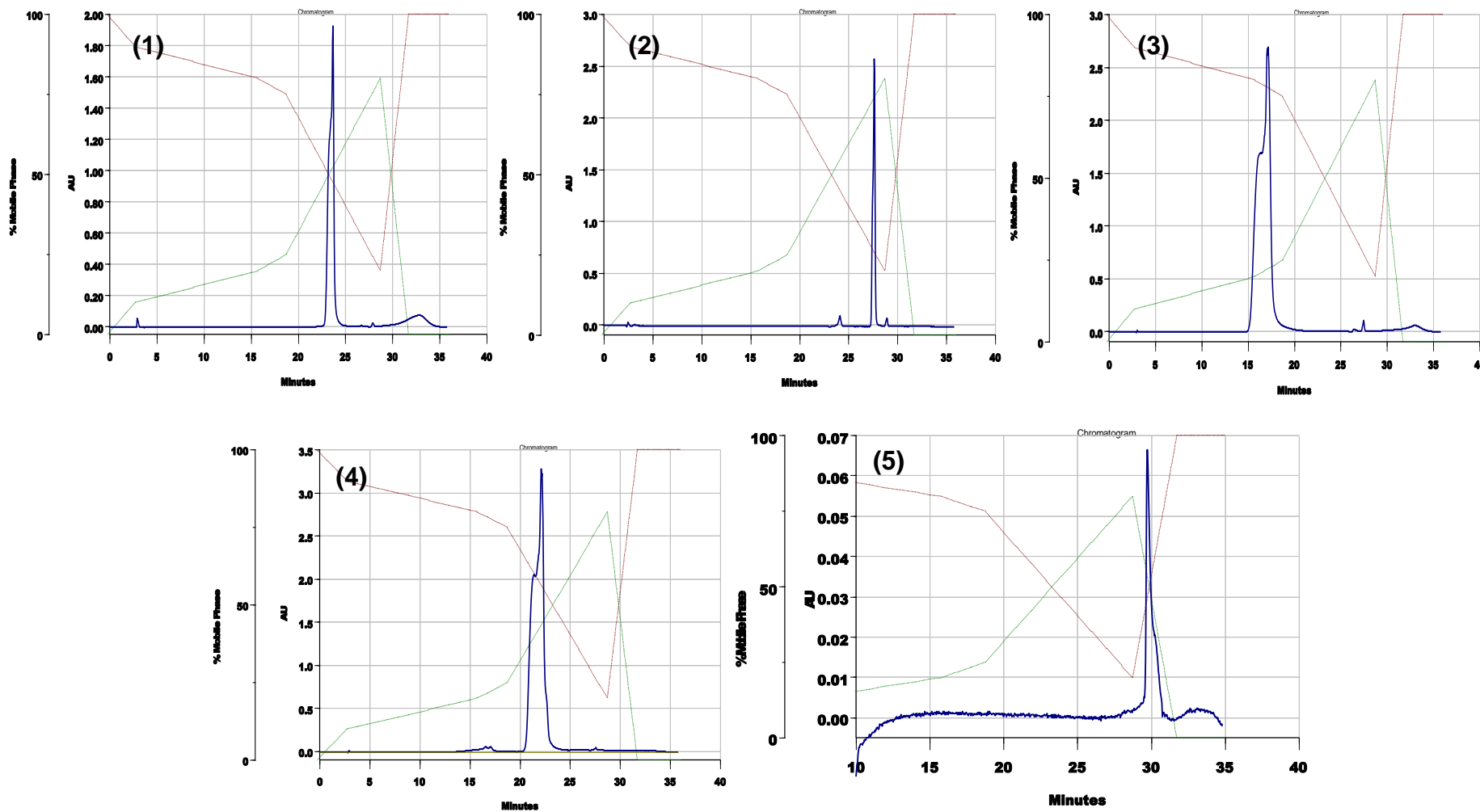


Figure 18 : Profils du chromatogramme CLHP ( $\lambda = 370 \text{ nm}$ ) des standards flavonoïques (feuille 1/2).

(1) : Diosmétique ; (2) : Nobéline ; (3) : Lutéoline ; (4) : Kaempférol ; (5) : Diosmine.

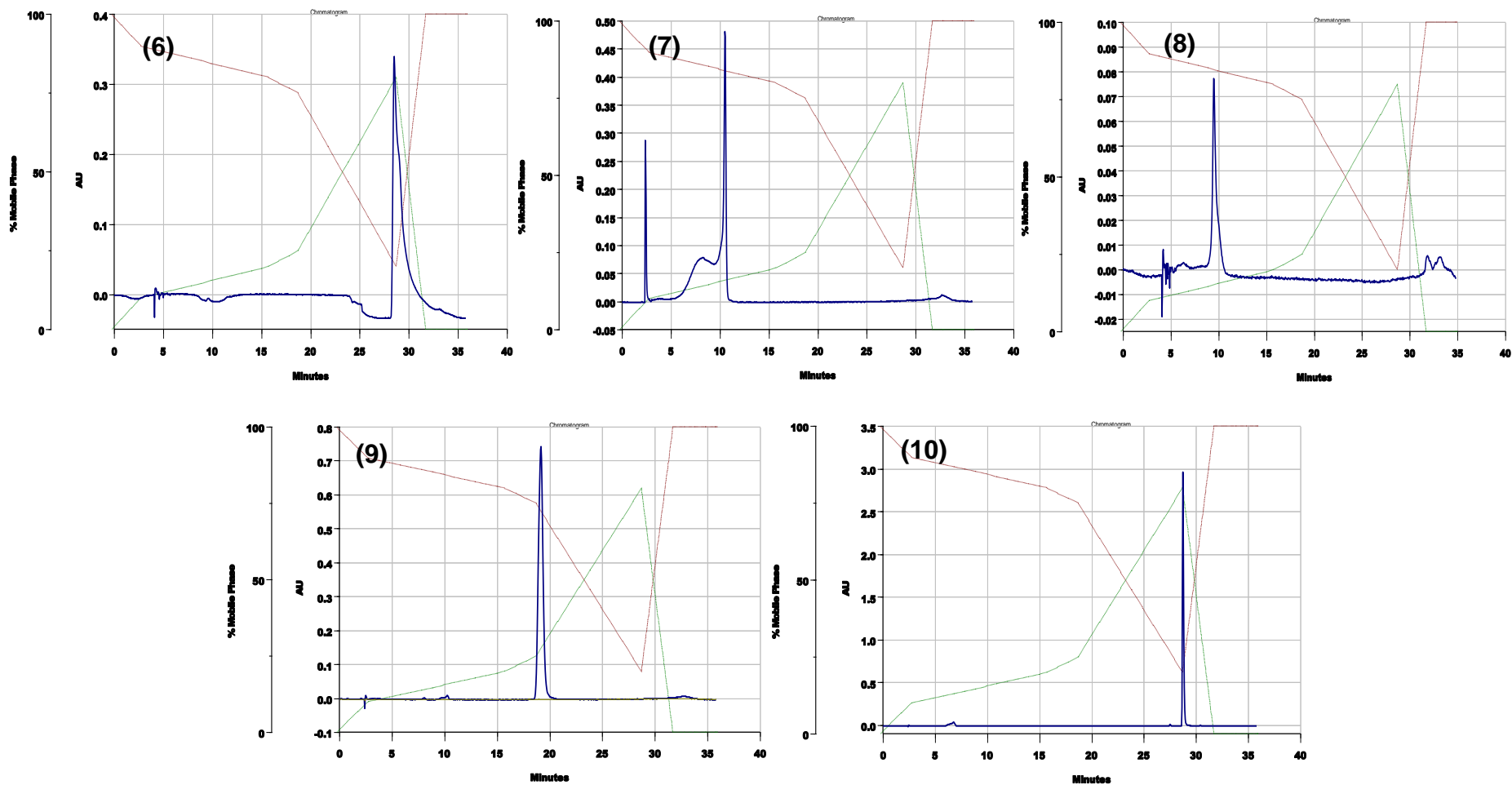


Figure 18 : Profils du chromatogramme CLHP ( $\lambda = 370$  nm) des standards flavonoïques (feuille 2/2).

(6) : Silibinine ; (7) : Naringine ; (8) : Catéchine ; (9) : Naringinine ; (10) : Tangéritine.

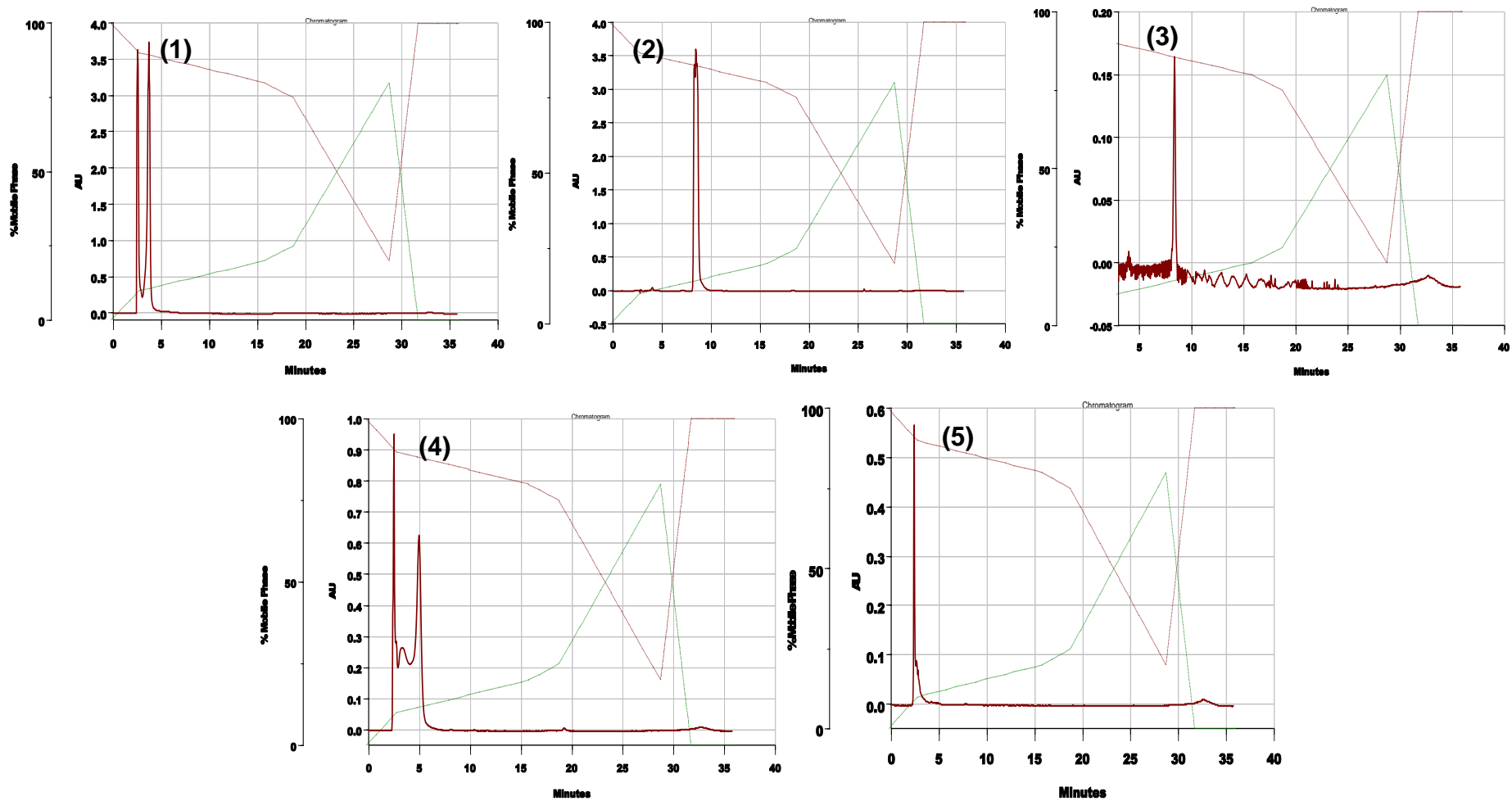


Figure 19 : Profils du chromatogramme CLHP ( $\lambda = 280$  nm) des acides phénoliques commercialisés (feuille 1/2).

(1) : Acide chlorogénique ; (2) : Acide férulique ; (3) : Acide ellagique ; (4) : Acide tannique ; (5) : Acide caféique.

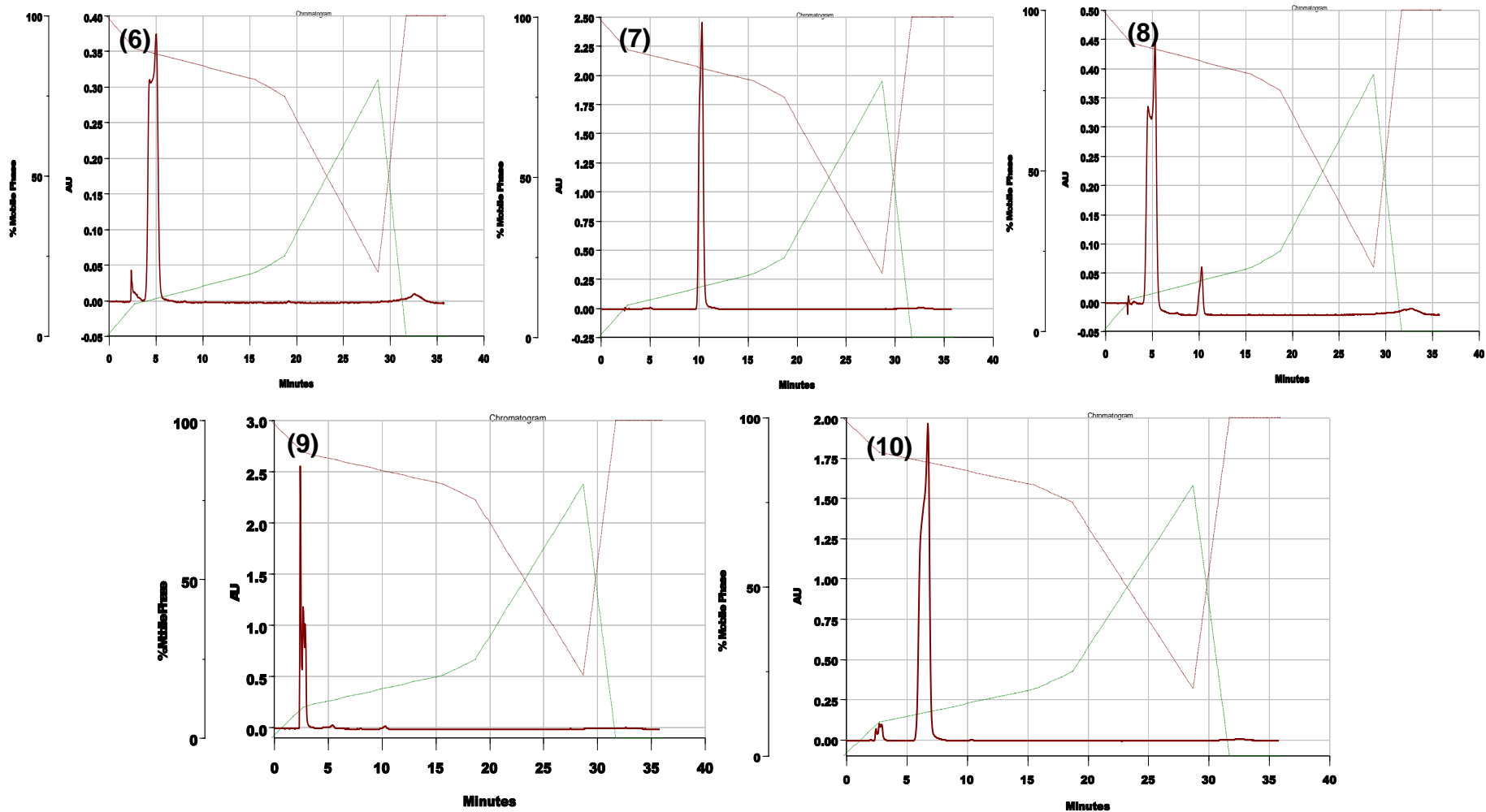


Figure 19 : Profils du chromatogramme CLHP ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) des acides phénoliques commercialisés (feuille 2/2).

(6) : Acide vanillique ; (7) : Acide hydrocinnamique ; (8) : Acide syringique ; (9) : Acide gallique ; (10) : Vanniline.

### III.1.1.2.B. Variation saisonnière des acides phénoliques extraits des feuilles de quatre provenances

L'analyse des extraits flavonoïques obtenus des feuilles de *M. vulgare* prélevées pendant les quatre saisons de l'année et en provenance de quatre localités d'échantillonnage en utilisant une chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée fait ressortir les profils chromatographiques ( $\lambda = 280$  nm) des acides phénoliques représentées par les figures 20, 21, 22 et 23. Les données correspondantes aux différents temps de rétention (Tr) et des airs de pics sont regroupées sur les tableaux 26, 27, 28 et 29.

Ces résultats montrent des différences intra-localité (entre les différentes saisons de prélèvement pour la même station d'échantillonnage) et inter-localité (entre les quatre localités d'échantillonnage) :

- pour les extraits phénoliques du mont de Tessala, 25 acides phénoliques sont séparés en automne, 23 en hiver, 26 au printemps et 29 en été. L'acide férulique avec un temps de rétention de 8,37 mn, est probablement présent en automne (composé 3), en hiver (composé 2) et en printemps (composé 3). En été, le composé 3 (Tr= 6,75 mn) correspond à la vanilline, le composé 4 (Tr= 8,41 mn) correspond à l'acide ellagique et le composé 8 (Tr= 10,30) correspond à l'acide hydrocinnamique,
- pour les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila, 25 acide phénoliques sont séparés en automne, 30 en hiver, 31 au printemps et 28 en été. Le composé 4 de l'automne avec un temps de rétention de 8,41 mn correspondant probablement à l'acide ellagique. Le composé 1 du printemps (Tr= 4,96 mn) correspond à l'acide tannique et le composé 3 en été (Tr= 8,37 mn) correspond à l'acide férulique. Les pics obtenus en hiver ne correspondent à aucun acide phénolique référencié,
- pour les extraits phénoliques de Béni Saf, 27 acides phénoliques sont obtenus en automne, 20 en hiver, 22 en printemps et 25 en été. Avec un temps de rétention de 6,75 mn, la vanilline est probablement présente en printemps (composé 2) et en été (composé 3). En printemps, le composé 6 (Tr= 10,30 mn) correspond à l'acide hydrocinnamique et le composé 6 (Tr= 8,41 mn) de l'été correspond à l'acide ellagique. En automne et en hiver, les pics obtenus ne correspondent à aucun standard phénolique,
- pour les extraits phénoliques de Aïn Skhouna, 31 acides phénoliques sont caractérisés en automne, 26 en hiver, 33 en printemps et 30 en été. L'acide férulique (Tr= 8,37 mn) est probablement présent en automne (composé 4), au printemps (composé 7) et en été (composé 3). Au printemps, le composé 1 (Tr= 4,96 mn) correspond à l'acide tannique. En hiver, les pics obtenus ne correspondent à aucun standard phénolique.

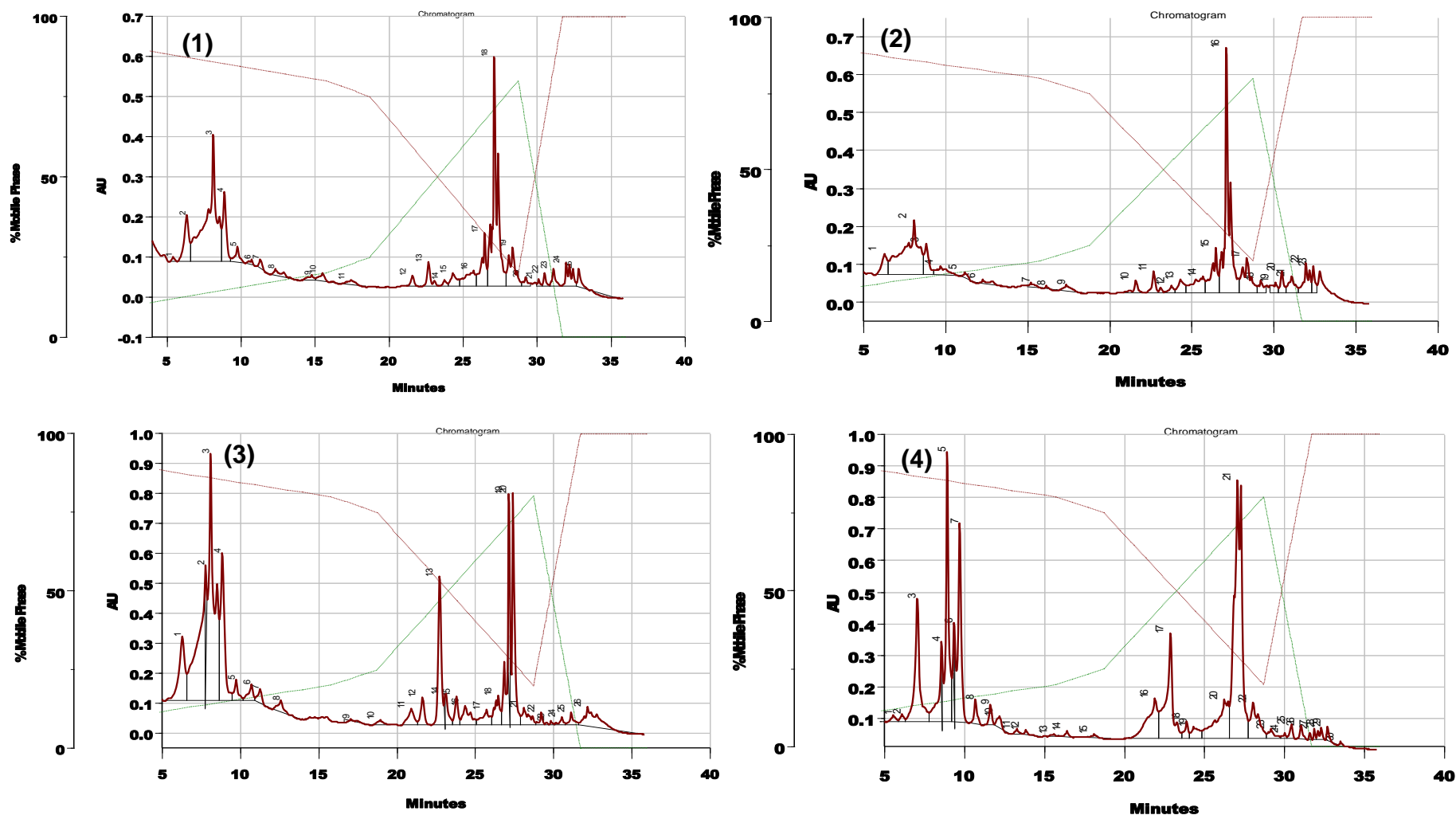


Figure 20 : Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des acides phénoliques ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) extraits des feuilles du mont de Tessala.

(1) : Automne ; (2) : Hiver ; (3) : Printemps ; (4) : Été.

Tableau 26 : Variation saisonnière (temps de rétention et aires de pics) des acides phénoliques extraits des feuilles du mont de Tessala.

Mont de Tessala															
Automne				Hiver				Printemps				Été			
Comp.	Tr	Aires de pics	%	Comp.	Tr	Aires de pics	%	Comp.	Tr	Aires de pics	%	Comp.	Tr	Aires de pics	%
1	5,42	2506266	0,31	1	6,30	21315032	3,06	1	6,30	98149288	5,92	1	5,58	9915983	0,59
2	6,33	44323096	5,48	2	<b>8,37</b>	141654784	20,36	2	7,78	27029594	1,63	2	6,12	7455016	0,44
3	<b>8,37</b>	217159792	<b>26,89</b>	3	8,84	25265816	3,63	3	<b>8,37</b>	568403520	<b>34,31</b>	3	<b>6,75</b>	143621312	8,64
4	8,88	49707480	6,15	4	9,73	17181578	2,47	4	8,86	154886880	9,35	4	<b>8,41</b>	12883703	0,77
5	9,77	13633085	1,68	5	11,25	4311079	0,61	5	9,74	21754168	1,31	5	8,93	234305488	14,10
6	10,75	3793167	0,46	6	12,85	7312239	1,05	6	10,71	19418202	1,17	6	9,61	18841980	1,13
7	11,33	5151948	0,63	7	15,24	4594184	0,66	7	11,28	14103021	0,85	7	9,71	185449584	11,16
8	12,35	9829753	1,21	8	16,17	1367361	0,19	8	12,59	16217758	0,97	8	<b>10,30</b>	18474964	1,11
9	14,78	6598958	0,81	9	17,41	9583386	1,37	9	16,65	685817	0,04	9	11,64	14255749	0,85
10	15,53	9470062	1,17	10	21,62	10108355	1,45	10	18,92	7952900	0,48	10	12,22	11601116	0,69
11	17,48	8394997	1,03	11	22,70	16406524	2,35	11	20,93	24463626	1,47	11	13,30	4364974	0,26
12	21,60	8038875	0,99	12	23,79	6290879	0,9	12	21,65	25213806	1,52	12	13,87	4146328	0,24
13	22,68	18377678	2,27	13	24,36	15369382	2,2	13	22,74	140556896	8,48	13	15,61	3669741	0,22
14	23,77	5536649	0,68	14	25,72	34212840	4,91	14	23,10	4052679	0,24	14	16,43	6151191	0,37
15	24,35	16307766	2,01	15	26,48	46072412	6,62	15	23,81	23421452	1,41	15	18,19	4446051	0,26
16	25,72	32531998	4,02	16	27,13	189965856	<b>27,31</b>	16	24,38	35296652	2,13	16	21,93	95685880	5,76
17	26,48	42661616	5,28	17	28,37	48964772	7,03	17	25,75	27679476	1,67	17	22,89	156480352	9,42
18	27,13	198673584	24,6	18	29,23	11493924	1,65	18	26,49	37787144	2,28	18	23,91	15473507	0,93
19	28,37	48589872	6,01	19	30,13	10827249	1,55	19	27,17	59226712	3,57	19	24,36	22667666	1,36
20	29,25	7940666	0,98	20	30,49	12531616	1,8	20	27,42	230147232	13,89	20	26,49	110952304	6,67
21	30,14	3822862	0,47	21	31,11	19190490	2,75	21	28,13	28907552	1,74	21	27,08	446952576	<b>26,9</b>
22	30,52	6932712	0,85	22	31,97	28616390	4,11	22	29,24	9931238	0,59	22	28,06	68224072	4,1
23	31,13	12549908	1,55	23	32,41	12949916	1,86	23	29,88	2060612	0,12	23	29,19	15474574	0,93
24	31,98	25897616	3,2					24	30,54	7208317	0,43	24	30,06	5107783	0,3
25	32,83	9010310	1,11					25	31,15	12430017	0,75	25	30,45	10159999	0,61
								26	32,19	59271272	3,57	26	31,05	9944159	0,59
												27	31,89	7158566	0,43
												28	32,31	9823108	0,59
												29	32,71	7346991	0,44

Comp. : composé ; Tr : temps de rétention.

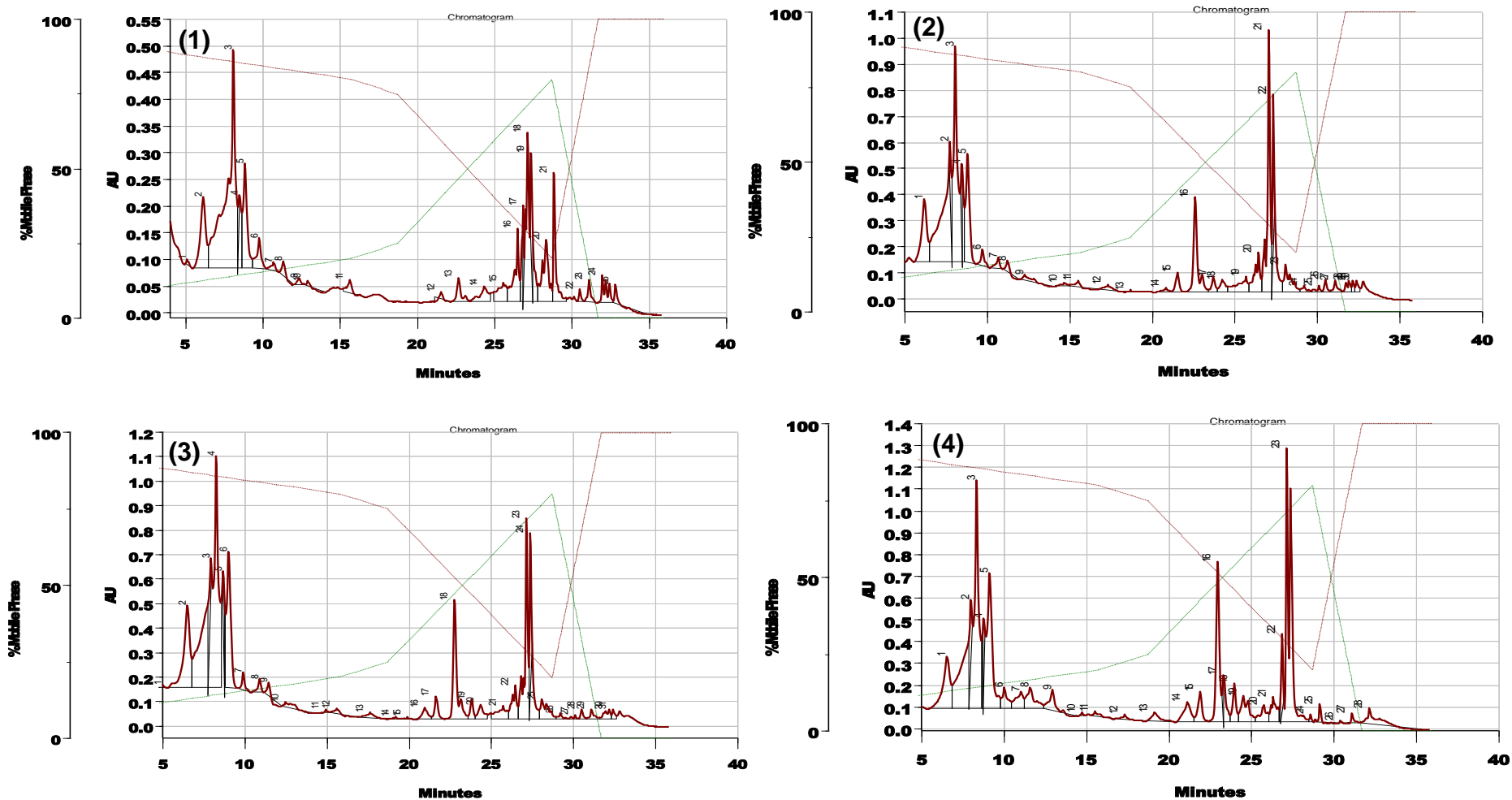


Figure 21 : Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des acides phénoliques ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) extraits des feuilles de la forêt domaniale de M'sila.

(1) : Automne ; (2) : Hiver ; (3) : Printemps ; (4) : Été.

**Tableau 27** : Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des acides phénoliques extraits des feuilles de la forêt domaniale de M'sila.

Forêt domaniale de M'sila															
Automne				Hiver				Printemps				Été			
Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%
1	5,14	1610936	0,19	1	6,20	92507296	6,04	1	<b>4,96</b>	2350133	0,13	1	6,56	124945656	5,47
2	6,14	56166948	6,82	2	7,89	32919326	2,15	2	6,51	151961376	8,79	2	7,90	49403928	2,16
3	8,10	270703744	<b>32,87</b>	3	8,07	511302624	<b>33,4</b>	3	7,78	45495360	2,63	3	<b>8,37</b>	535915552	<b>23,49</b>
4	<b>8,41</b>	8258747	1	4	8,57	24506174	1,6	4	8,27	558816576	<b>32,33</b>	4	8,76	25924326	1,13
5	8,85	59597828	7,23	5	8,82	110312824	7,2	5	8,79	28299966	1,63	5	9,14	294670016	12,92
6	9,77	20015656	2,43	6	9,72	14833503	0,96	6	9,03	166542912	9,63	6	10,04	36430552	1,59
7	10,72	5336696	0,64	7	10,68	11005335	0,71	7	9,92	13955727	0,8	7	11,04	42972852	1,88
8	11,34	6176070	0,74	8	11,25	6958874	0,45	8	10,91	12768767	0,73	8	11,60	56852352	2,49
9	12,35	3575499	0,43	9	12,29	13806444	0,9	9	11,46	6776003	0,39	9	12,94	41472732	1,81
10	12,94	1409307	0,17	10	14,71	5579916	0,36	10	12,81	16251485	0,94	10	14,74	3802766	0,16
11	15,64	8944598	1,08	11	15,51	8303123	0,54	11	14,96	2817875	0,16	11	15,54	11714533	0,51
12	21,56	692933	0,08	12	17,35	12210034	0,79	12	15,64	7070669	0,4	12	17,34	9559367	0,41
13	22,68	14493812	1,76	13	18,71	1790662	0,11	13	17,67	12019589	0,69	13	19,18	24468168	1,07
14	24,36	17667328	2,14	14	20,85	5733474	0,37	14	19,21	2844133	0,16	14	21,15	47005996	2,06
15	25,58	22627740	2,74	15	21,54	18415674	1,2	15	20,02	1942282	0,11	15	21,90	42498476	1,86
16	26,49	40939280	4,97	16	22,61	102561544	6,7	16	20,97	19124600	1,1	16	22,96	212054736	9,29
17	26,85	10063263	1,22	17	23,72	14521266	0,94	17	21,66	23667276	1,36	17	23,39	13575509	0,59
18	27,14	120801392	14,66	18	24,28	17742008	1,15	18	22,78	131012120	7,58	18	23,97	42482236	1,86
19	27,38	22249262	2,7	19	25,69	40341224	2,63	19	23,82	18496934	1,07	19	24,51	64740812	2,83
20	28,34	53048364	6,44	20	26,46	52858688	3,45	20	24,36	24136410	1,39	20	25,75	34944360	1,53
21	28,85	41721364	5,06	21	27,07	261758752	17,1	21	25,74	35656844	2,06	21	26,33	45209368	1,98
22	30,52	3964762	0,48	22	27,33	63810180	4,16	22	26,48	45789520	2,64	22	26,86	40767820	1,78
23	31,12	9428549	1,14	23	28,09	47895596	3,12	23	27,15	231926016	13,41	23	27,15	395154272	17,32
24	31,98	19155090	2,32	24	29,21	7747220	0,5	24	27,39	69277464	4	24	28,60	4279683	0,18
25	32,83	4832215	0,58	25	30,11	5809612	0,37	25	28,09	42725852	2,47	25	29,17	14274428	0,62
				26	30,50	8525983	0,55	26	29,22	7492471	0,43	26	30,42	3400508	0,14
				27	31,11	10877720	0,71	27	30,13	4659096	0,26	27	31,12	9834113	0,43
				28	31,95	11600770	0,75	28	30,52	7879450	0,45	28	32,17	52242228	2,29
				29	32,17	6404591	0,41	29	31,12	11893526	0,68				
				30	32,40	7998191	0,52	30	32,19	16520509	0,95				
								31	32,43	8146409	0,47				

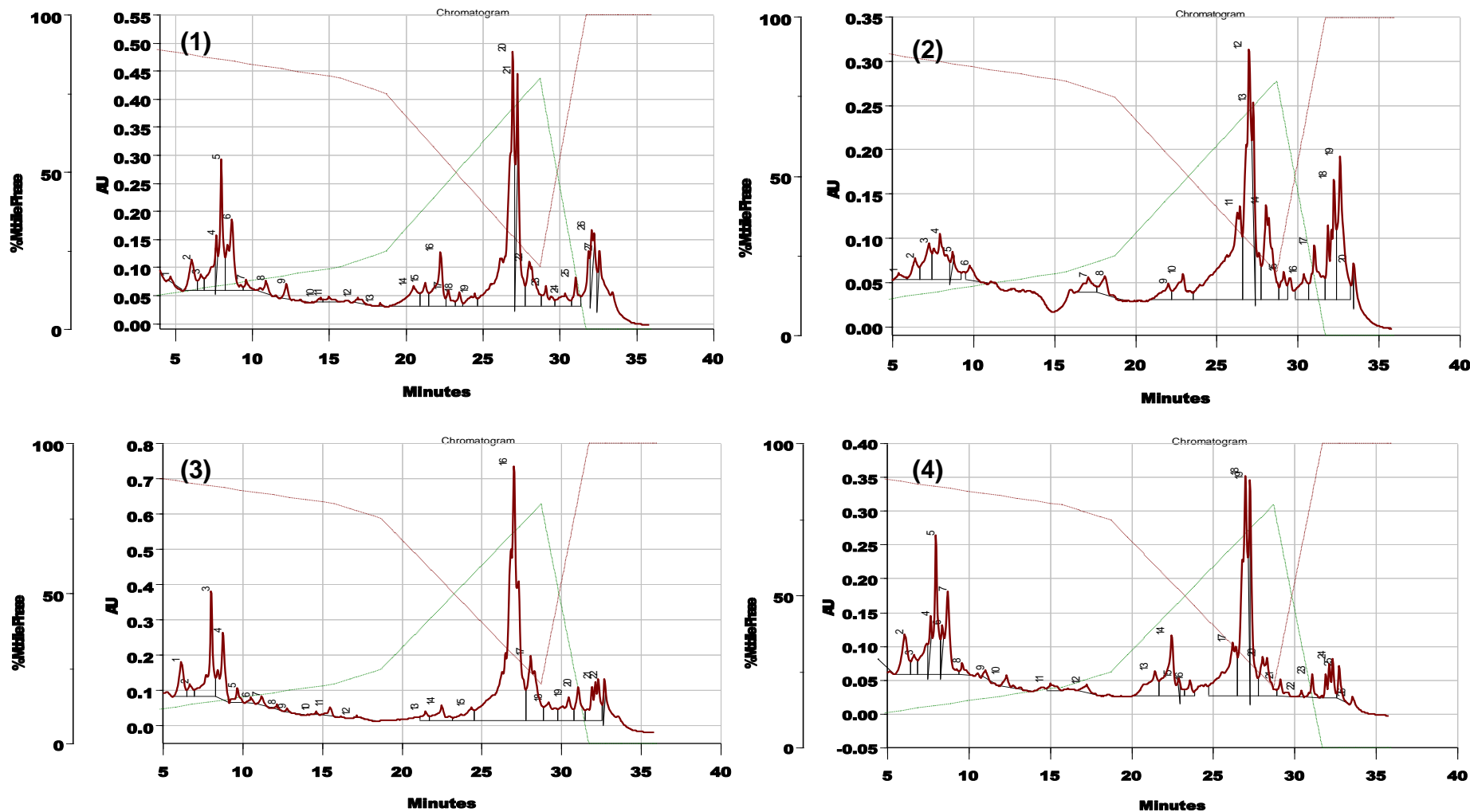


Figure 22 : Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des acides phénoliques ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) extraits des feuilles de Béni Saf.

(1) : Automne ; (2) : Hiver ; (3) : Printemps ; (4) : Été.

Tableau 28 : Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des acides phénoliques extraits des feuilles de Béni Saf.

Béni Saf															
Automne				Hiver				Printemps				Été			
Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%
1	4,73	2077120	0,25	1	5,40	3386874	0,5	1	6,17	35279652	2,96	1	4,62	908722	0,14
2	6,08	23353502	2,83	2	6,41	9900716	1,47	2	<b>6,75</b>	11822484	0,99	2	6,08	26075648	4,08
3	6,69	10574884	1,28	3	7,26	20204632	3,01	3	8,04	90965192	7,64	3	<b>6,75</b>	9804916	1,53
4	7,64	8355690	1,01	4	7,95	43828816	6,53	4	8,78	66599892	5,59	4	7,51	8705236	1,36
5	7,99	84210752	10,2	5	8,54	3808530	0,56	5	9,68	14517117	1,21	5	7,99	77745968	12,18
6	8,68	60420988	7,32	6	9,80	8418633	1,25	6	<b>10,30</b>	4990350	0,41	6	<b>8,41</b>	7295015	1,14
7	9,62	6079658	0,73	7	17,11	11896658	1,77	7	11,21	7489024	0,62	7	8,71	44132424	6,91
8	10,92	9055962	1,09	8	18,12	10944872	1,63	8	12,18	3403866	0,28	8	9,62	5088040	0,79
9	12,23	9280278	1,12	9	22,04	11741924	1,75	9	12,80	2170339	0,18	9	11,03	2524660	0,39
10	14,47	3159575	0,38	10	22,94	20620466	3,07	10	14,63	2355066	0,19	10	12,33	7630891	1,19
11	14,99	6721883	0,81	11	26,45	127504856	19,01	11	15,50	8848048	0,74	11	15,08	6029791	0,94
12	17,04	5794505	0,7	12	27,02	142486432	<b>21,24</b>	12	17,34	1310331	0,11	12	17,25	6004806	0,94
13	18,35	1254675	0,15	13	27,29	18628874	2,77	13	21,49	9649426	0,81	13	21,44	26742732	4,19
14	20,51	31386026	3,8	14	28,07	60771788	9,06	14	22,51	26860702	2,25	14	22,47	48161536	7,54
15	21,25	17227160	2,08	15	29,16	11556566	1,72	15	24,37	27769202	2,33	15	22,98	2341542	0,36
16	22,26	46011584	5,57	16	30,39	16441599	2,45	16	27,03	567506112	<b>47,67</b>	16	23,59	7603199	1,19
17	22,76	9711359	1,17	17	31,05	32765914	4,88	17	28,08	114889776	9,65	17	26,22	70010864	10,97
18	23,48	6872950	0,83	18	32,25	51106180	7,62	18	29,19	35400468	2,97	18	26,99	175583344	<b>27,52</b>
19	24,48	13318417	1,61	19	32,62	63397820	9,45	19	30,46	42846360	3,59	19	27,30	18389180	2,88
20	26,95	309716928	<b>37,54</b>	20	33,47	1174993	0,17	20	31,07	37867428	3,18	20	28,05	37214696	5,83
21	27,09	36041488	4,36					21	32,33	68046480	5,71	21	29,15	8092053	1,26
22	28,05	49822484	6,03					22	32,69	9818047	0,82	22	30,43	1332675	0,2
23	29,11	17033210	2,06									23	31,09	7627880	1,19
24	30,35	16547184	2									24	32,35	22504336	3,52
25	31,04	15492142	1,87									25	32,74	10372185	1,62
26	32,05	18843480	2,28												
27	32,44	6616249	0,8												

Comp. : composé ; Tr : temps de rétention.

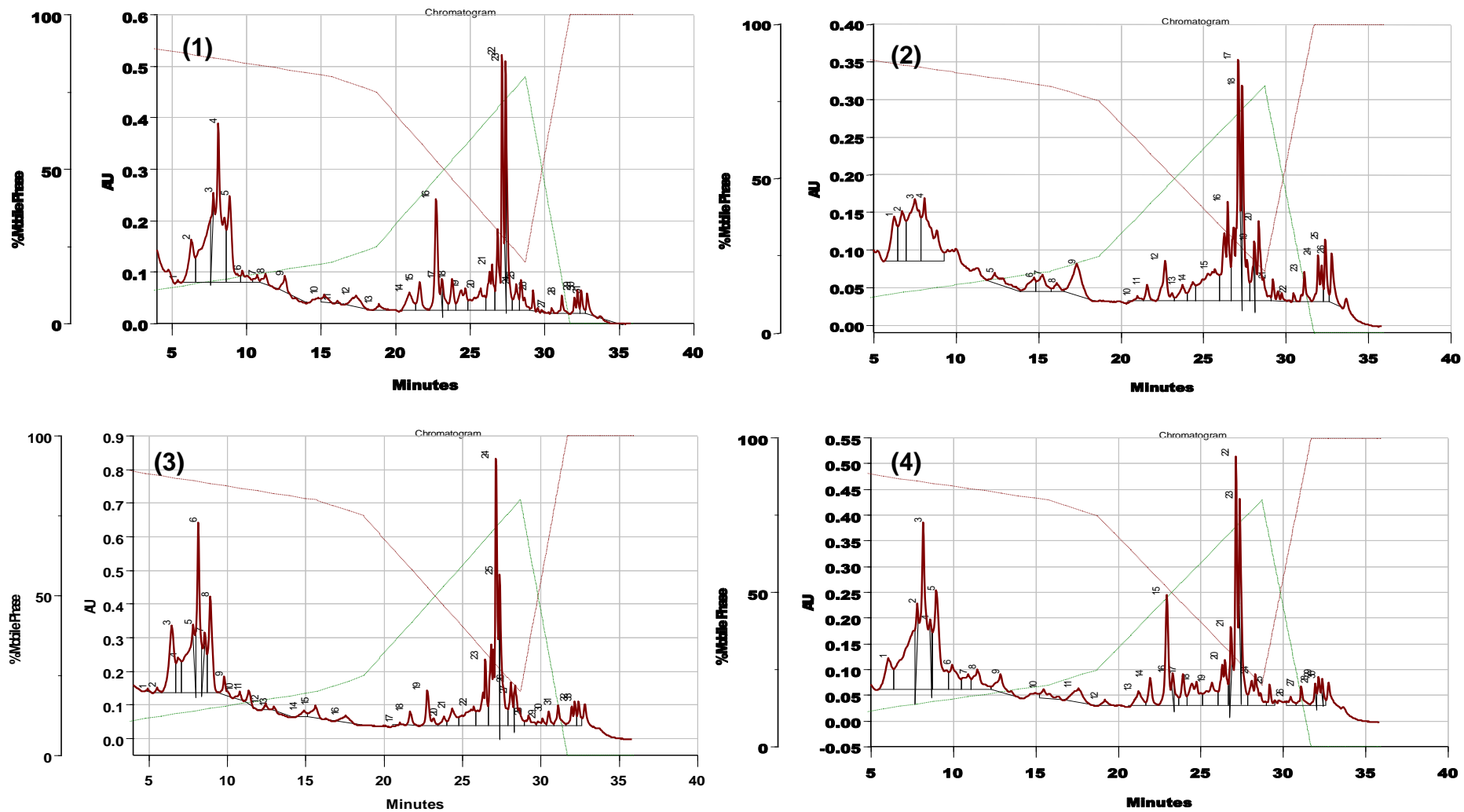


Figure 23 : Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des acides phénoliques ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) extraits des feuilles de Aïn Skhouna.

(1) : Automne ; (2) : Hiver ; (3) : Printemps ; (4) : Été.

Tableau 29 : Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des acides phénoliques extraits des feuilles de Aïn Skhouna.

Aïn Skhouna															
Automne				Hiver				Printemps				Été			
Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%
1	5,43	537732	0,06	1	6,27	25412784	4,08	1	<b>4,96</b>	1506201	0,12	1	6,09	31873534	3,28
2	6,33	36501420	4,2	2	6,76	29070002	4,67	2	5,53	3782633	0,32	2	7,70	18063412	1,86
3	7,63	14498035	1,67	3	7,52	61063736	9,81	3	6,47	79609360	6,85	3	<b>8,37</b>	240020192	<b>24,72</b>
4	<b>8,37</b>	227920176	<b>26,26</b>	4	8,09	58586652	9,41	4	6,89	35766332	3,07	4	8,71	8564469	0,88
5	8,88	61501804	7,08	5	12,35	10135878	1,62	5	8,02	19948838	1,71	5	8,99	85286608	8,78
6	9,75	10382001	1,19	6	14,73	7820308	1,25	6	8,16	246677344	21,24	6	9,94	26603768	2,74
7	10,74	4213467	0,48	7	15,23	10883576	1,74	7	<b>8,37</b>	16354278	1,4	7	10,91	15029901	1,54
8	11,29	7273542	0,83	8	16,11	3354858	0,53	8	8,92	76363632	6,57	8	11,49	22887684	2,35
9	12,60	8748354	1	9	17,33	27288618	4,38	9	9,82	13729065	1,18	9	12,87	19605654	2,01
10	15,25	6737210	0,77	10	21,00	2474475	0,39	10	10,81	5958103	0,51	10	15,49	11641078	1,19
11	16,12	1589114	0,18	11	21,61	5707129	0,91	11	11,39	9896865	0,85	11	17,61	21123076	2,17
12	17,37	16575927	1,91	12	22,69	19542930	3,14	12	12,46	5243949	0,45	12	19,21	5128608	0,52
13	18,90	4837346	0,55	13	23,75	9453892	1,51	13	13,02	408051	0,03	13	21,26	12927855	1,33
14	20,94	17290242	1,99	14	24,39	9642542	1,54	14	14,91	9299249	0,8	14	21,95	14326392	1,47
15	21,63	15927397	1,83	15	25,68	47340984	7,6	15	15,65	18606078	1,6	15	22,96	59854792	6,16
16	22,74	64341076	7,41	16	26,48	47344504	7,6	16	17,59	13314726	1,14	16	23,51	6152621	0,63
17	23,26	5078189	0,58	17	27,13	118600544	<b>19,06</b>	17	21,05	815666,62	0,07	17	23,94	16945418	1,74
18	23,81	15867609	1,82	18	27,37	14431740	2,31	18	21,70	10162789	0,87	18	24,75	30359502	3,12
19	24,70	23855402	2,74	19	28,15	4505194	0,72	19	22,78	29664364	2,55	19	25,71	29579426	3,04
20	25,72	30996610	3,57	20	28,36	43638232	7,01	20	23,83	8039574	0,69	20	26,50	34928792	3,59
21	26,49	34104112	3,93	21	29,22	9084492	1,46	21	24,37	24066490	2,07	21	26,84	12775251	1,31
22	27,16	149682016	17,25	22	30,50	1791650	0,28	22	25,74	42152632	3,62	22	27,15	142354784	14,66
23	27,40	35998712	4,14	23	31,13	8952205	1,43	23	26,48	60484828	5,2	23	27,39	24243500	2,49
24	28,11	14232984	1,64	24	31,96	17620268	2,83	24	27,16	271162848	<b>23,34</b>	24	28,34	32124544	3,3
25	28,42	16117488	1,85	25	32,41	13384834	2,15	25	27,41	13239387	1,13	25	29,20	7679150	0,79
26	29,24	7185130	0,82	26	32,79	15090051	2,42	26	28,10	63821984	5,49	26	30,47	5654292	0,58
27	30,51	1524733	1,17					27	28,33	2017981	0,17	27	31,12	9906276	1,02
28	31,17	7360623	0,84					28	29,25	11307308	0,97	28	32,06	2422601	0,24
29	32,22	11162951	1,28					29	30,14	7145416	0,61	29	32,17	19656210	2,02
30	32,47	7972717	0,91					30	30,52	8897208	0,76	30	32,41	3180498	0,32
31	32,87	7680942	0,88					31	31,12	16230332	1,39				
								32	32,19	22048948	1,89				
								33	32,43	13649166	1,17				

### III.1.1.2.C. Variation saisonnière des flavonoïdes extraits des feuilles de quatre provenances

les profils chromatographiques ( $\lambda = 370$  nm) des flavonoïdes obtenus après séparation des extraits phénoliques des feuilles de *M. vulgare* prélevées pendant les quatre saisons de l'année de quatre localités d'échantillonnage par une chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée sont illustrés dans les figures 24, 25, 26 et 27. Les temps de rétention (Tr) et les airs des pics sont regroupés sur les tableaux 30, 31, 32 et 33.

De ces résultats, il ressort que :

- pour les extraits phénoliques du mont de Tessala, 16 flavonoïdes sont obtenus en automne, 15 en hiver, 22 au printemps et 21 en été. Avec un temps de rétention de 29,73 mn, la diosmine est probablement présente en automne (composé 13), en hiver (composé 14) et en été (composé 18). La catéchine (Tr= 9,50 mn) correspond au composé 6 au printemps et au composé 4 en été ; la naringine (Tr= 10,52 mn) correspond au composé 7 au printemps et au composé 6 en été. Au printemps, le composé 11 (Tr= 17,12) correspond à la lutéoline, le composé 15 (Tr= 22,12 mn) correspond au kaempférol, le composé 16 (Tr= 23,68 mn) correspond à la diosmétine et le composé 21 (Tr= 27,64 mn) correspond à la nobilétine,
- pour les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila, 17 flavonoïdes sont caractérisés en automne, 27 en hiver, 23 au printemps et 22 en été. La diosmine (Tr= 29,73 mn) est probablement présente en automne (composé 16) et au printemps (composé 21) ; la catéchine (Tr= 9,50 mn) est présente en hiver et au printemps (composé 6 pour les deux saisons) et la nobilétine (Tr= 27,64 mn) est présente au printemps (composé 18) et en été (composé 19). En hiver, le composé 7 (Tr= 10,52 mn) correspond à la naringine. Au printemps, le composé 13 (Tr= 23,68 mn) correspond à la diosmétine. En été, le composé 10 (Tr= 19,15 mn) correspond à la naringinine,
- pour les composés phénoliques de Béni Saf, 15 flavonoïdes sont obtenus en automne, 10 en hiver, 19 au printemps et en été. En printemps, le composé 5 (Tr= 9,50) correspond à la catéchine et le composé 6 (Tr= 10,52 mn) correspond à la naringine. En été, le composé 10 (Tr= 23,68 mn) correspond à la diosmétine et le composé 16 (Tr= 29,73) correspond à la diosmine. Les pics obtenus en automne et en hiver ne correspondent à aucun standard flavonoïque,
- pour les composés phénoliques de Aïn Skhouna, 20 flavonoïdes sont caractérisés en automne, 15 en hiver et 23 au printemps et en été. Avec un temps de rétention de 27,64 min la nobilétine est probablement présente en automne (composé 17), au printemps (composé 18) et en le été (composé 20). En hiver, le composé 13 (Tr= 29,73 mn) correspond à la diosmine. En été, le composé 11 (Tr= 19,15 mn) correspond à la naringinine et le composé 13 (Tr= 22,12 mn) correspond au kaempférol.

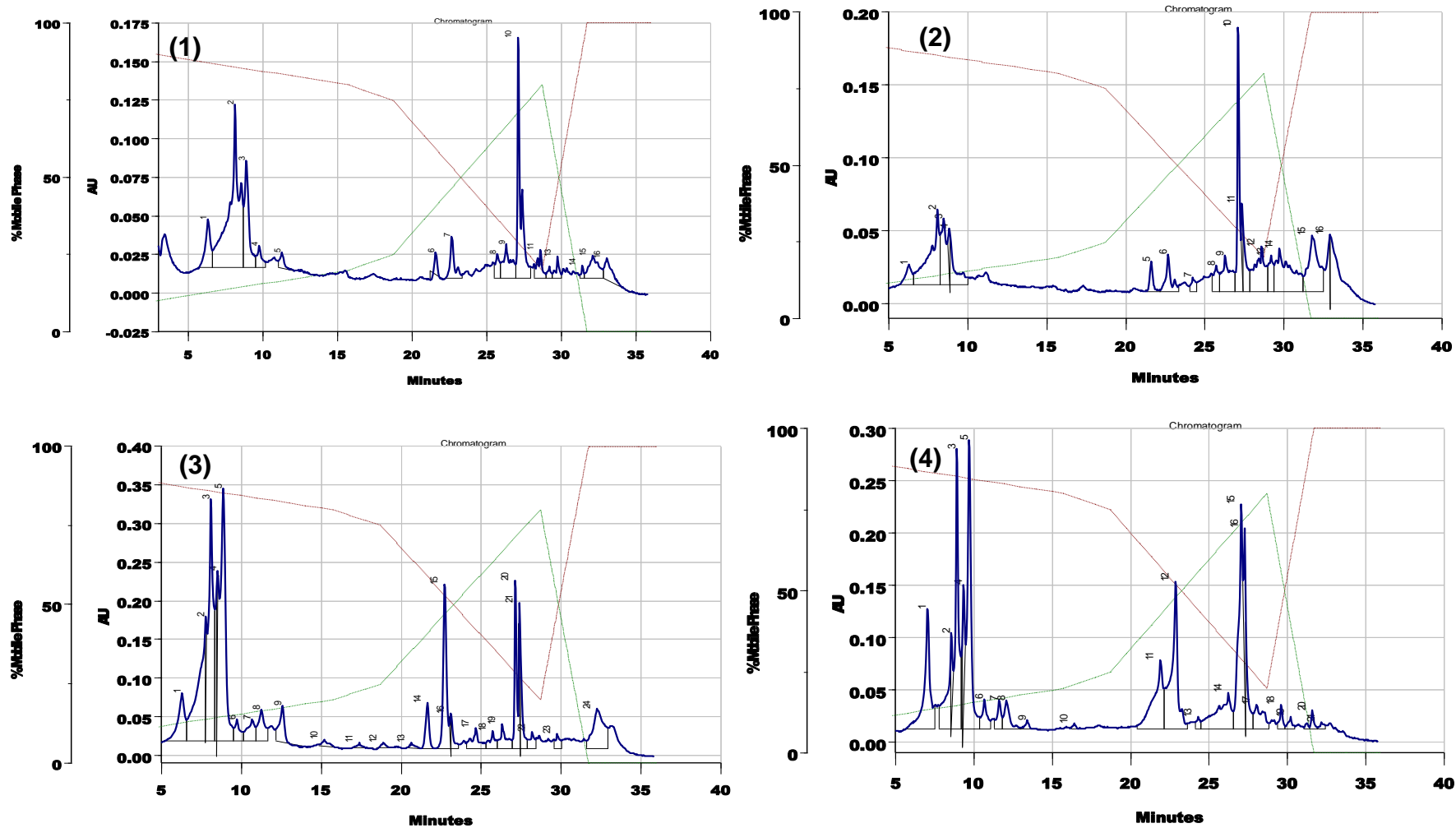


Figure 24 : Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des flavonoïdes ( $\lambda = 370 \text{ nm}$ ) extraits des feuilles du mont de Tessala.

(1) : Automne ; (2) : Hiver ; (3) : Printemps ; (4) : Été.

Tableau 30 : Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des flavonoïdes extraits des feuilles du mont de Tessala.

Mont de Tessala															
Automne				Hiver				Printemps				Été			
Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%
1	6,33	12081991	5,45	1	6,29	6836758	2,75	1	6,30	29905898	4,51	1	7,07	49579980	8,61
2	8,14	75735888	<b>36,16</b>	2	8,10	34412172	13,88	2	7,78	5882052	0,88	2	8,56	7872061	1,36
3	8,89	24076678	10,86	3	8,49	31900580	12,87	3	8,11	187372528	<b>28,3</b>	3	8,93	87246112	15,16
4	9,76	5347870	2,41	4	9,12	3481776	1,40	4	8,48	9734122	1,47	4	<b>9,50</b>	14854848	2,58
5	11,29	3444761	1,55	5	21,62	4987966	2,01	5	8,88	162378752	24,53	5	9,72	90163144	<b>15,66</b>
6	21,61	2147550	0,96	6	22,69	9334179	3,76	6	<b>9,50</b>	10902805	1,64	6	<b>10,52</b>	11214837	1,94
7	22,68	9221208	4,16	7	24,29	2887754	1,16	7	<b>10,52</b>	15160122	2,29	7	11,64	8304266	1,44
8	25,73	4976370	2,24	8	25,73	6467637	2,60	8	11,27	18523884	2,79	8	12,10	12008341	2,08
9	26,31	13124224	5,92	9	26,31	14649820	5,91	9	12,59	17906100	2,7	9	13,43	3220145	0,55
10	27,13	37971692	17,13	10	27,12	38943092	<b>15,71</b>	10	15,19	4687992	0,7	10	16,43	1558774	0,27
11	28,63	6742229	3,04	11	27,44	4053624	1,63	11	<b>17,12</b>	2257075	0,34	11	21,93	45391436	7,88
12	29,21	2090237	0,94	12	28,62	22000378	8,87	12	18,91	3039283	0,45	12	22,89	66185712	11,5
13	<b>29,73</b>	3731374	1,68	13	29,21	8247387	3,32	13	20,69	2816525	0,42	13	24,34	3191149	0,55
14	31,42	1471524	0,66	14	<b>29,73</b>	31067018	12,53	14	21,66	15269525	2,30	14	26,25	37016884	6,34
15	32,14	11197424	5,05	15	31,84	28586656	11,53	15	<b>22,12</b>	61088732	9,22	15	27,08	88010176	15,29
16	33,09	8285473	3,73					16	<b>23,68</b>	2736101	0,41	16	27,30	16736547	2,9
								17	24,71	14231222	2,15	17	28,06	15956112	2,77
								18	25,75	8769705	1,32	18	<b>29,73</b>	5335349	0,92
								19	26,34	14253601	2,15	19	30,22	3851720	0,66
								20	27,16	58506700	8,83	20	31,60	5375870	0,93
								21	<b>27,64</b>	8929539	1,34	21	32,21	2368912	0,41
								22	28,22	7529821	1,13				

**Comp.** : composé ; **Tr** : temps de rétention.

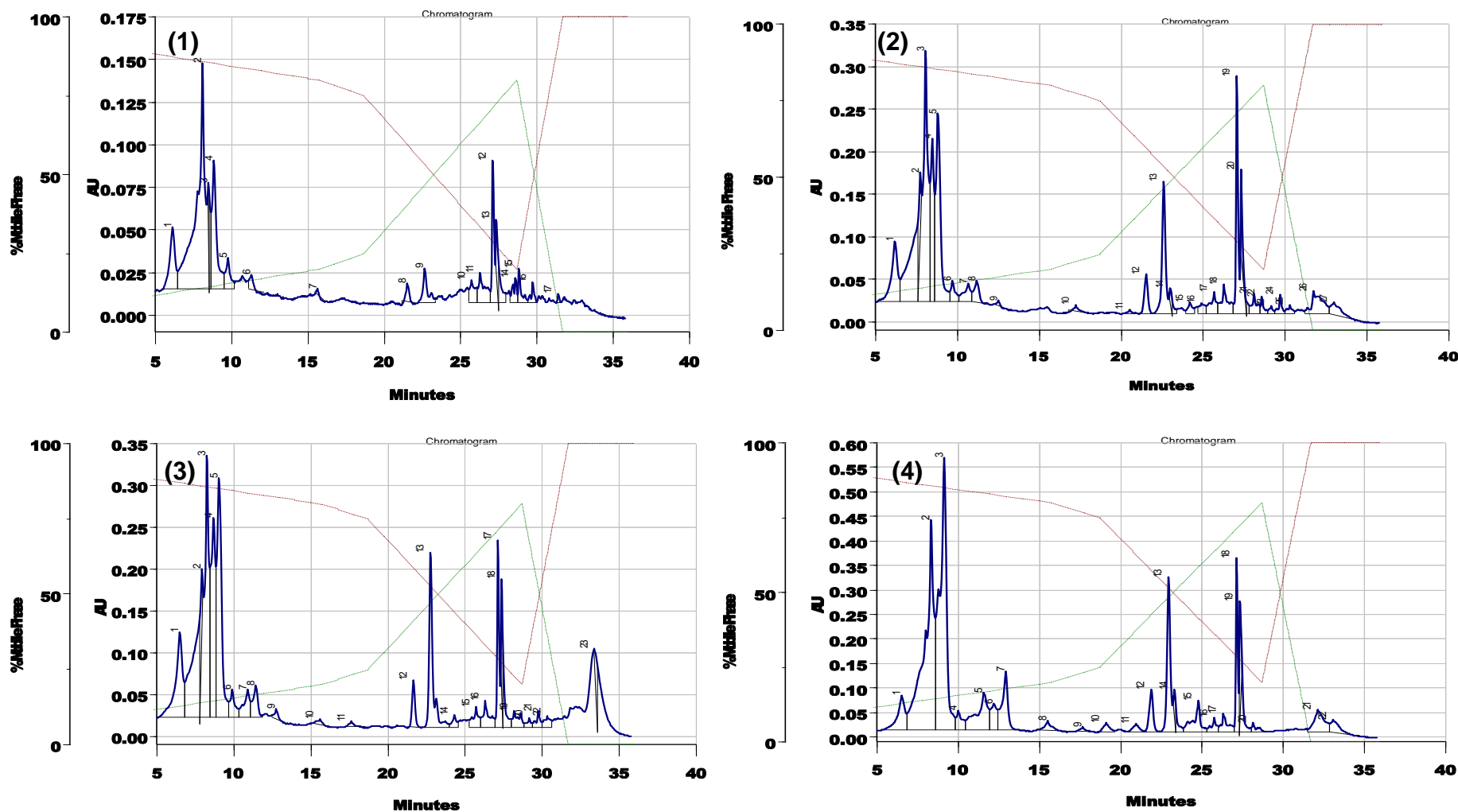


Figure 25 : Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des flavonoïdes ( $\lambda = 370 \text{ nm}$ ) extraits des feuilles de la forêt domaniale de M'sila

(1) : Automne ; (2) : Hiver ; (3) : Printemps ; (4) : Été.

Tableau 31 : Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des flavonoïdes extraits des feuilles de la forêt domaniale de M'sila.

Forêt domaniale de M'sila															
Automne				Hiver				printemps				Été			
Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%
1	6,14	15346132	7,46	1	6,20	32705598	5,63	1	6,51	56325544	8,18	1	6,55	38009140	3,49
2	8,10	90161672	<b>43,88</b>	2	7,62	14649278	2,52	2	7,82	16650434	2,41	2	8,35	264142976	24,29
3	8,56	2875862	1,39	3	8,07	165091904	<b>28,43</b>	3	8,27	175830672	<b>25,53</b>	3	9,15	275275712	<b>25,31</b>
4	8,85	27014732	13,14	4	8,48	47222164	8,13	4	8,70	82282672	11,95	4	10,03	15832342	1,45
5	9,77	6724516	3,27	5	8,83	73340424	12,62	5	9,05	103373648	15,01	5	11,61	58836796	5,41
6	11,32	2475647	1,2	6	<b>9,50</b>	7892074	1,35	6	<b>9,50</b>	13244701	1,92	6	12,22	23050376	2,11
7	15,64	413205	0,2	7	<b>10,52</b>	10044358	1,72	7	10,91	15342076	2,22	7	12,94	48948608	4,5
8	21,56	2361328	1,14	8	11,20	9648570	1,66	8	11,44	14917092	2,16	8	15,52	10624484	0,97
9	22,68	7208678	3,5	9	12,52	1112577	0,19	9	12,78	3421006	0,49	9	17,67	4072051	0,37
10	25,74	5429162	2,64	10	17,25	2310698	0,39	10	15,62	2316331	0,33	10	<b>19,15</b>	8657192	0,79
11	26,31	8673987	4,22	11	20,54	1379662	0,23	11	17,65	2284803	0,33	11	20,97	7805208	0,71
12	27,14	19837264	9,65	12	21,54	11828845	2,03	12	21,67	12669117	1,84	12	21,90	24158822	2,22
13	27,37	5110707	2,48	13	22,61	43302064	7,45	13	<b>23,68</b>	58776324	8,53	13	22,96	89257632	8,2
14	28,63	4260966	2,07	14	23,06	2912922	0,5	14	24,32	4891454	0,71	14	23,37	7065799	0,64
15	28,85	4224295	2,05	15	24,23	4229241	0,72	15	25,73	10150455	1,47	15	24,81	31126876	2,86
16	<b>29,73</b>	2644591	1,28	16	24,94	4881783	0,84	16	26,32	14467717	2,1	16	25,78	10099455	0,92
17	31,43	695954	0,33	17	25,69	9793804	1,68	17	27,15	51767400	7,51	17	26,34	16501709	1,51
				18	26,28	15423466	2,65	18	<b>27,64</b>	13942496	2,02	18	27,15	72595248	6,67
				19	27,07	59588884	10,26	19	28,21	10040117	1,45	19	<b>27,64</b>	24860620	2,28
				20	27,34	10427235	1,79	20	29,20	3717404	0,53	20	28,17	6853913	0,63
				21	28,13	8341949	1,43	21	<b>29,73</b>	5936633	0,86	21	32,17	33148310	3,04
				22	28,59	3757120	0,64	22	30,38	5980729	0,86	22	33,14	16507107	1,51
				23	29,18	2323654	0,4	23	33,62	10187497	1,47				
				24	29,72	5061487	0,87								
				25	30,33	3331095	0,57								
				26	31,76	20134366	3,46								
				27	33,01	9952744	1,71								

Comp. : composé ; Tr : temps de rétention.

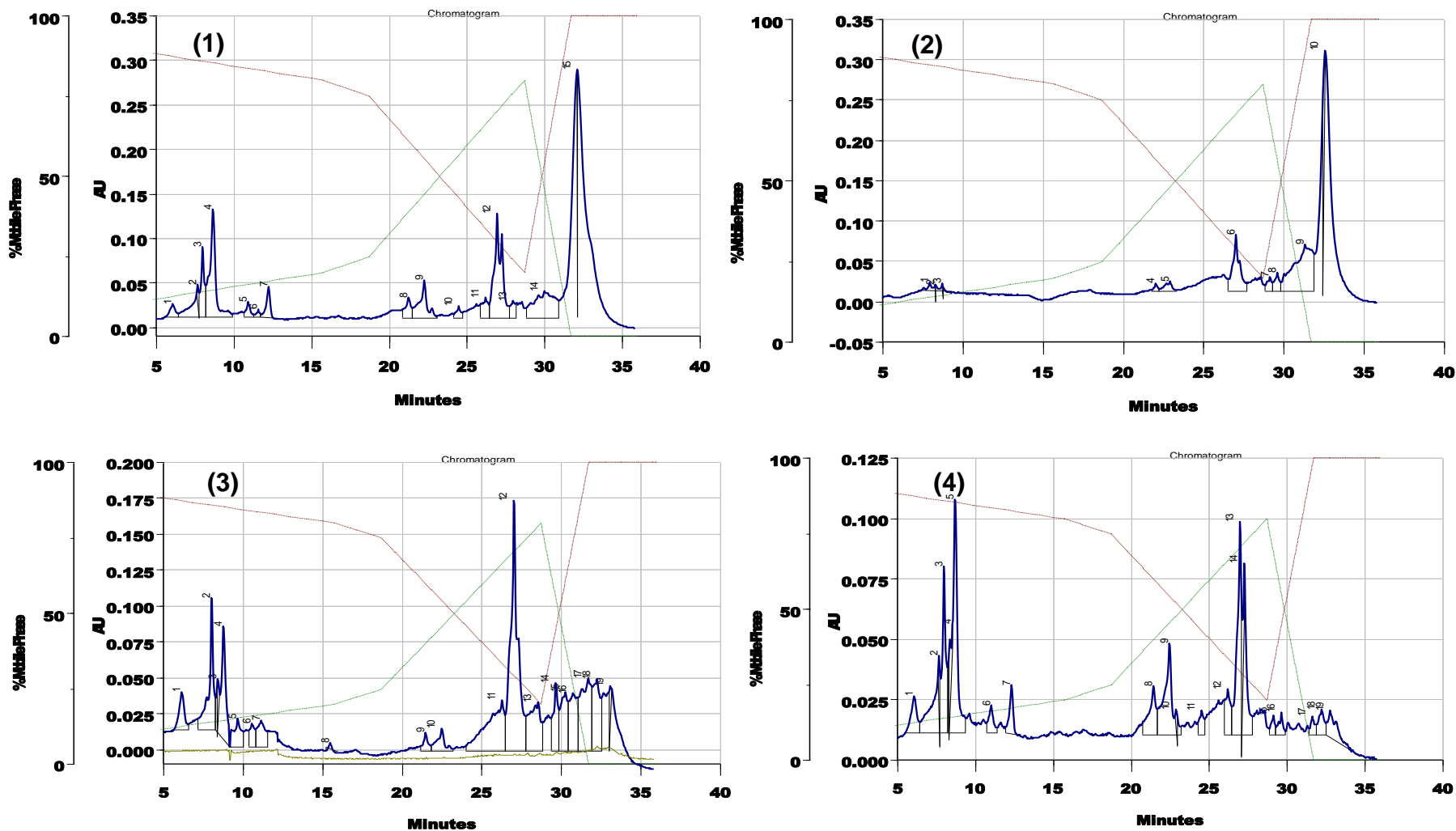


Figure 26 : Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des flavonoïdes ( $\lambda = 370 \text{ nm}$ ) extraits des feuilles de Béni Saf.

(1) : Automne ; (2) : Hiver ; (3) : Printemps ; (4) : Été.

**Tableau 32** : Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des flavonoïdes extraits des feuilles de Béni Saf.

Béni Saf															
Automne				Hiver				Printemps				Été			
Comp.	Tr	Air de pic	%	Comp.	Tr	Air de pic	%	Comp.	Tr	Air de pic	%	Comp.	Tr	Air de pic	%
1	6,06	6949871	1,66	1	7,95	3263698	1,29	1	6,17	10720442	2,62	1	6,07	7070487	3,49
2	7,78	568554	0,13	2	8,57	1396238	0,55	2	8,04	29393344	7,20	2	7,73	2220732	1,09
3	7,99	38594656	9,25	3	8,75	2931529	1,16	3	8,37	3027185	0,74	3	7,99	32225512	15,93
4	8,66	54540808	13,08	4	22,05	2833429	1,12	4	8,78	29222240	7,16	4	8,25	5122014	2,53
5	10,94	5945571	1,42	5	22,94	7845449	3,12	5	<u>9,50</u>	10778484	2,64	5	8,71	34836104	17,22
6	11,58	2336516	0,56	6	27,02	35686756	14,2	6	<u>10,52</u>	6310200	1,54	6	11,01	4114508	2,03
7	12,23	10703038	2,56	7	29,15	6187816	2,46	7	11,15	10920642	2,67	7	12,32	5822462	2,87
8	21,25	9376809	2,24	8	29,61	8399379	3,34	8	15,49	417402	0,1	8	21,44	10327795	5,1
9	22,26	24202902	5,8	9	31,40	78022368	31,05	9	21,49	4580021	1,12	9	22,47	21531658	10,64
10	24,48	4635896	1,11	10	32,6	104668208	<b>41,66</b>	10	22,51	9203505	2,25	10	<u>23,68</u>	1184212	0,58
11	26,23	9976988	2,39					11	26,29	45785376	11,22	11	24,54	3391849	1,67
12	26,95	65425184	15,69					12	27,05	88672720	<b>21,73</b>	12	26,22	7106583	3,51
13	28,00	7189133	1,72					13	<u>28,51</u>	29938148	7,33	13	27,00	40364684	<b>19,96</b>
14	30,07	46749968	11,21					14	29,68	16132563	3,95	14	27,10	6534893	3,23
15	32,45	129760184	<b>31,12</b>					15	30,26	20126446	4,93	15	29,15	2189237	1,08
								16	30,82	23584584	5,78	16	<u>29,73</u>	3006570	1,48
								17	31,78	38552044	9,44	17	31,64	2415187	1,19
								18	32,22	27127960	6,64	18	32,25	4557337	2,25
								19	33,04	3519875	0,86	19	32,80	8180713	4,04

**Comp.** : composé ; **Tr** : temps de rétention.

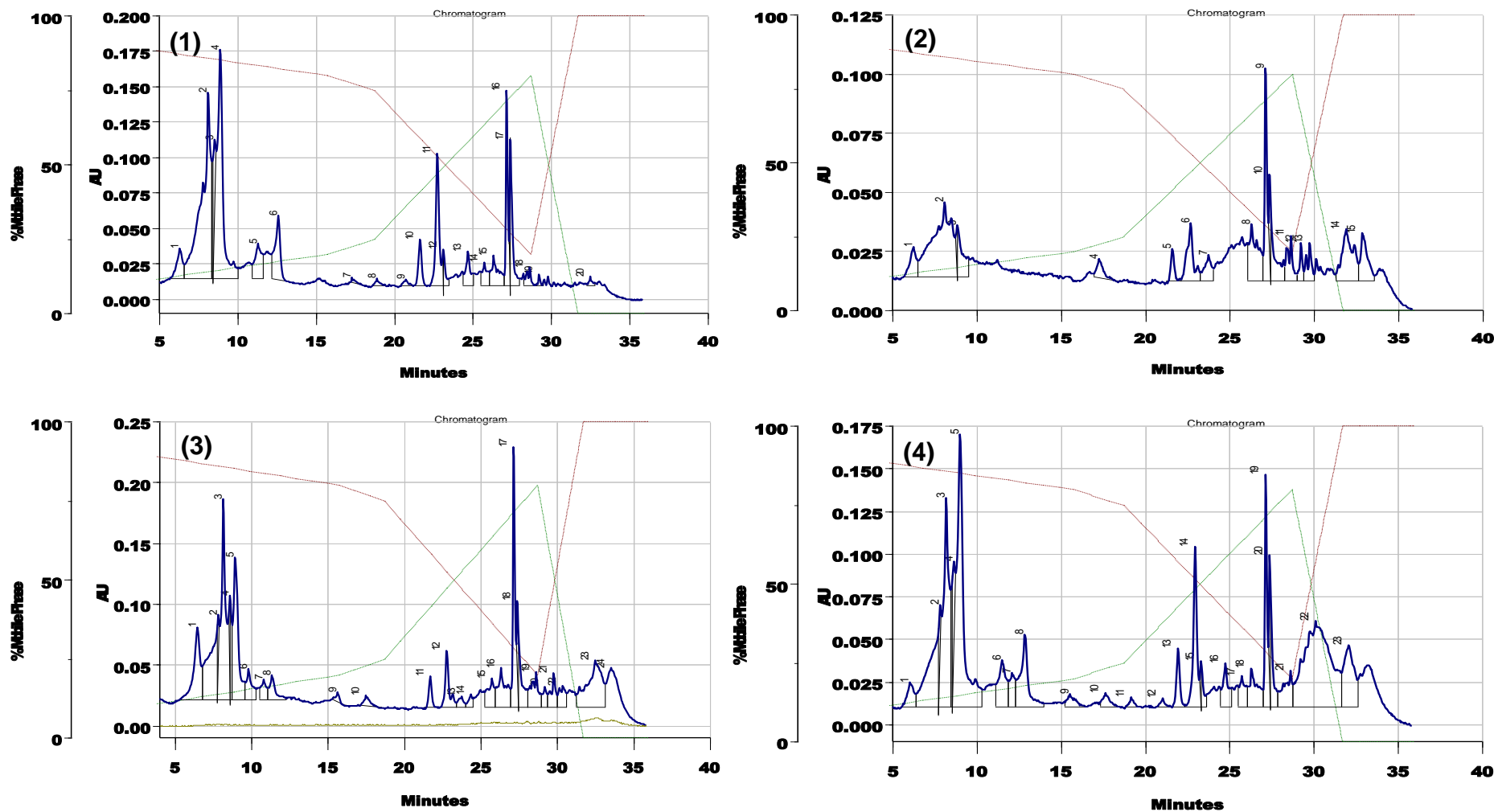


Figure 27 : Profil saisonnier du chromatogramme CLHP des flavonoïdes ( $\lambda = 370 \text{ nm}$ ) extraits des feuilles de Aïn Skhouna.

(1) : Automne ; (2) : Hiver ; (3) : Printemps ; (4) : Été.

Tableau 33 : Variation saisonnière (temps de rétention et aires des pics) des flavonoïdes extraits des feuilles de Aïn Skhoua.

Aïn Skhoua															
Automne				Hiver				Printemps				Été			
Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%	Comp.	Tr	Aires des pics	%
1	6,32	9581967	2,88	1	6,23	5434479	3,40	1	6,47	30850828	7,22	1	6,06	7297654	1,49
2	8,13	86641096	<b>26,09</b>	2	8,10	47566048	<b>29,80</b>	2	7,04	4542742	1,06	2	7,74	4585540	0,93
3	8,44	9754802	2,93	3	8,97	1401149	0,87	3	8,16	109092584	<b>25,53</b>	3	8,18	81346048	16,66
4	8,89	79839720	24,04	4	17,29	3545550	2,22	4	8,62	4309248	1	4	8,05	8358788	1,71
5	11,31	12380117	3,72	5	21,61	3191704	1,99	5	8,94	44064164	10,31	5	9,01	84641152	17,34
6	12,59	18184212	5,47	6	22,68	10643363	6,66	6	9,81	11054054	2,58	6	11,51	14438880	2,95
7	17,39	936306	0,28	7	23,74	5065525	3,17	7	10,81	6561479	1,53	7	12,13	7870296	1,61
8	18,89	1625479	0,48	8	26,30	14028359	8,78	8	11,37	9495229	2,22	8	12,87	23425722	4,8
9	20,75	1828608	0,55	9	27,13	24329512	15,24	9	15,64	2181084	0,51	9	15,53	4964125	1,01
10	21,64	8361350	2,51	10	27,39	3514171	2,2	10	17,56	3966545	0,92	10	17,65	4701271	0,96
11	22,74	29370764	8,84	11	28,63	6594263	4,13	11	21,70	6056965	1,41	11	<b>19,15</b>	2238779	0,45
12	23,14	753476	0,22	12	29,21	3014187	1,88	12	22,78	14666270	3,43	12	21,05	2009396	0,41
13	24,70	8619896	2,59	13	<b>29,73</b>	4690050	2,93	13	23,72	3914429	0,91	13	<b>22,12</b>	8490413	1,73
14	25,74	6226792	1,87	14	31,90	16926980	10,6	14	24,35	3693083	0,86	14	22,96	28455434	5,83
15	26,32	11174959	3,36	15	32,89	9654992	6,04	15	25,75	11385262	2,66	15	23,38	1675800	0,34
16	27,16	35634804	10,73					16	26,33	20068808	4,69	16	24,76	10186051	2,08
17	<b>27,64</b>	3826124	1,15					17	27,16	51149436	11,97	17	25,73	7557942	1,54
18	28,64	4312696	1,29					18	<b>27,64</b>	6671311	1,56	18	26,32	13291405	2,72
19	29,24	1331633	0,40					19	28,62	15430462	3,61	19	27,15	32773960	6,71
20	32,50	1592583	0,47					20	29,20	5355941	1,25	20	<b>27,64</b>	6653756	1,36
								21	29,78	10028454	2,34	21	28,62	12016359	2,46
								22	30,39	8886124	2,08	22	30,23	94510616	<b>19,36</b>
								23	32,52	43732160	10,23	23	32,06	26491688	5,42

Comp. : composé ; Tr : temps de rétention.

### III.1.2. Activités biologiques des flavonoïdes

#### III.1.2.1. Activités antimicrobiennes

##### III.1.2.1.A. Test préliminaire : pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *M. vulgare* en provenance du mont de Tessala

###### III.1.2.1.A.1. Rendements des extractions

Les différents extraits obtenus après lyophilisation ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Les rendements ont été déterminés par rapport au poids total de la matière végétale réduite en poudre (feuilles de *M. vulgare*) et par rapport à l'extrait méthanolique (l'extrait brut). Ces rendements ainsi que l'aspect et la couleur de chaque extrait sont représentés dans le tableau 34.

**Tableau 34** : Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions flavonoïques extraites des feuilles en provenance du mont de Tessala.

Extraits flavonoïques	Aspects	Couleurs	Rendements % (au broyat)	Rendements % (à EBr)
<b>EBr</b>	Pâteux	vert foncé	32,5 %	100 %
<b>EHx</b>	Huileux	vert foncé	13,5 %	20,76 %
<b>ECh</b>	Huileux	marron clair	10,5 %	16,15 %
<b>EAc</b>	Poudre	vert jaunâtre	12,5 %	19,23 %
<b>EAq</b>	Huileux	vert clair	7 %	10,76 %

**EBr** : extrait brut ; **EHx** : extrait hélianthis ; **ECh** : extrait chloroformique ; **EAc** : extrait d'acétate d'éthyle ; **EAq** : extrait aqueux

Les résultats obtenus montrent que :

- les extraits flavonoïques obtenus présentent différents aspects : pâteux, huileux et poudreux, de diverses couleurs : vert foncé, marron clair, vert jaunâtre et vert clair,
- parmi les différentes fractions de l'extrait brut, l'extrait EHx représente le rendement le plus élevé (13,5 %) par rapport au poids total des feuilles, suivi par l'EAc (12,5 %), puis l'ECh (10,5 %) et enfin l'EAq (7 %),
- la même constatation est faite lors de la comparaison des rendements des différents extraits par rapport à l'extrait brut (qui représente 32,5 % par rapport au poids total des feuilles). Ces rendements sont de 20,76 %, 19,23 %, 16,15 % et 10,76 % pour l'EHx, l'EAc, l'ECh et l'EAq respectivement,
- la somme des pourcentages des quatre extraits par rapport à l'extrait brut est de 66,90 %. Etant donné le nombre assez élevé de lavages effectués pour la séparation des trois fractions (l'EHx, l'EAc et l'ECh), le fractionnement de l'extrait brut peut conduire à des pertes substantielles de matière, ces pertes représentent 33,10 %.

### III.1.2.1.A.2. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser quelques familles de composés phénoliques existant dans les extraits flavonoïques des feuilles de *M. vulgare*. Les résultats des tests sont regroupés dans le tableau 35 :

**Tableau 35** : Screening phytochimique des extraits flavonoïques obtenus des feuilles du mont de Tessala.

Composés caractérisés	Extraits flavonoïques				
	EBr	ECh	EAc	EAq	EHx
Polyphénols	+++	+++	+++	+++	+++
Flavonoïdes	+++	+++	+++	+++	+++
Tanins condensés	+	-	-	-	-
Tanins hydrolysables	+	-	-	-	-
Flavanes	+++	-	+++	-	+++
Anthocyanes	-	-	-	-	-
Flavanols	+++	+++	-	-	+++
Proanthocyanidols	-	-	-	-	-
Coumarines	-	-	-	-	-

+++ : réaction franchement positive, + : réaction positive, - : réaction négative.

Les tests du screening phytochimique font ressortir les résultats suivants :

- la présence des polyphénols et des flavonoïdes dans tous les extraits,
- l'EBr est le seul extrait qui contient des tanins condensés et hydrolysables,
- les flavanes sont présents dans l'EBr, l'EHx et l'EAc,
- la présence des flavanols dans l'EBr, l'ECh et l'EHx,
- nous avons noté l'absence des anthocyanes, des proanthocyanidols et des coumarines dans tous les extraits flavonoïques,

### III.1.2.1.A.3. Tests antimicrobiens

#### III.1.2.1.A.3.1. Test de sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques commercialisés

L'utilisation des antibiotiques et des antifongiques commercialisés a induit sur les souches microbiennes utilisées des zones d'inhibition de la croissance (Tab. 36, Pl. VI), dont les diamètres permettent d'établir un antibiogramme et un antifongigramme, à partir desquels sont classées les souches microbiennes selon leur sensibilité.

Les souches microbiennes choisies ne manifestent aucune résistance vis-à-vis des antifongiques et des antibiotiques commercialisés. Elles sont soit intermédiaires soit sensibles. Concernant les antibiotiques :

- la piperacilline (PIP) est l'antibiotique le plus actif vis-à-vis des souches bactériennes testées qui se sont révélées sensibles. Nous avons enregistré des zones d'inhibitions

de 37,6 mm, 30,3 mm, 25 mm et 24,3 mm contre respectivement *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*,

- la kanamicine (K) est moyennement active présentant des zones d'inhibitions hétérogènes : 21,3 mm, 16 mm, 15,6 mm et 7,6 mm vis-à-vis de *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* et *P. aeruginosa*. Les trois premières souches se sont avérées sensibles, tandis que la dernière a montré une sensibilité intermédiaire,
- l'ampicilline (AMP) est le moins actif parmi les antibactériens utilisés, enregistrant une faible zone d'inhibition de 5,6 mm contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*, 6,3 mm contre *B. cereus* classant ainsi ces trois bactéries comme intermédiaires. En revanche, il présente un effet marquant contre *E. coli* qui s'est avérée sensible avec une zone d'inhibition de 17,6 mm,

Pour les antifongiques :

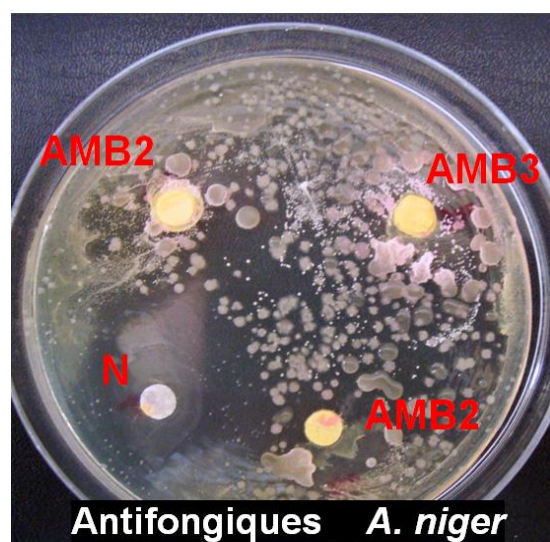
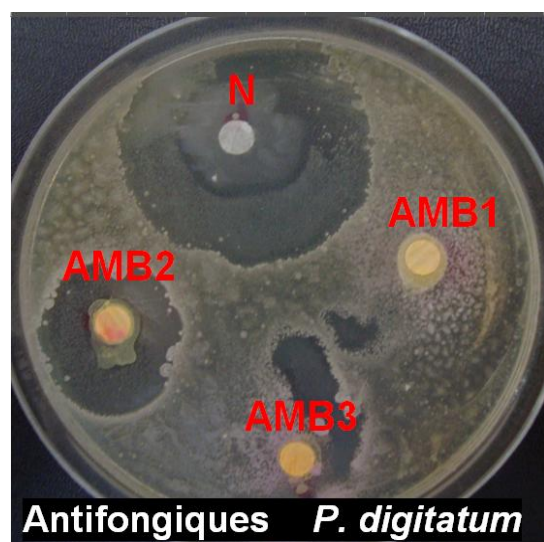
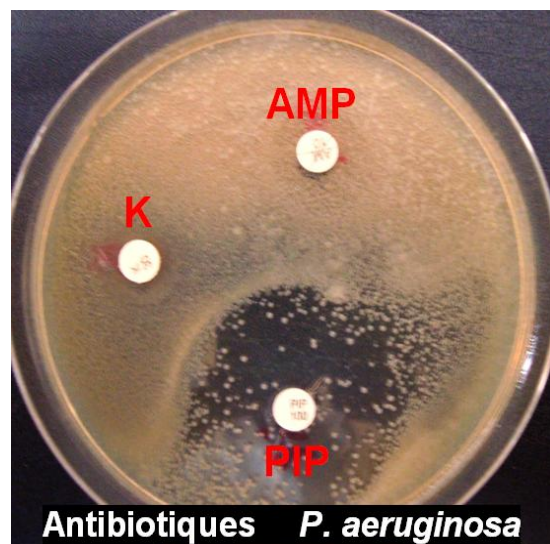
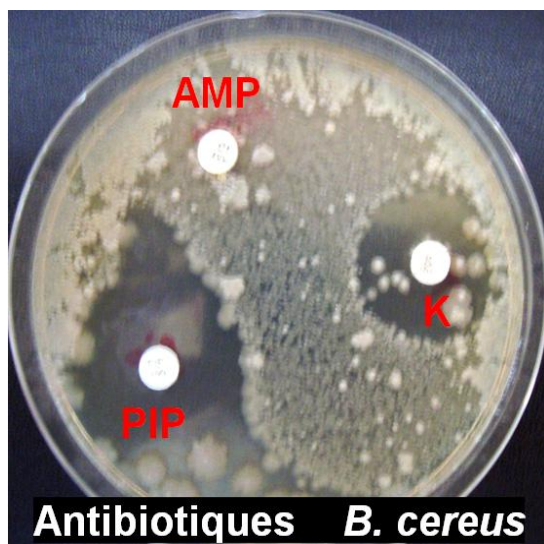
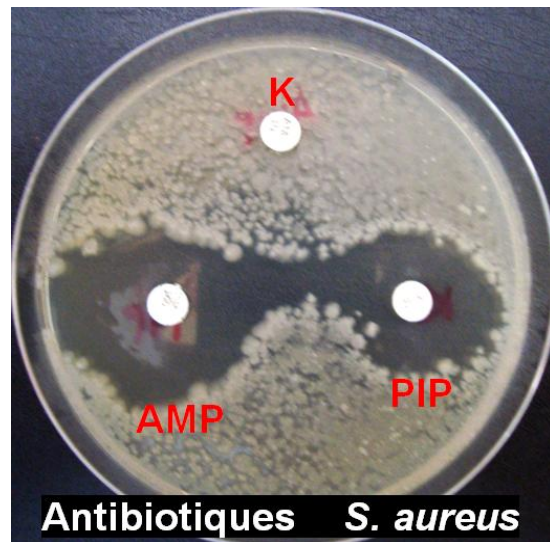
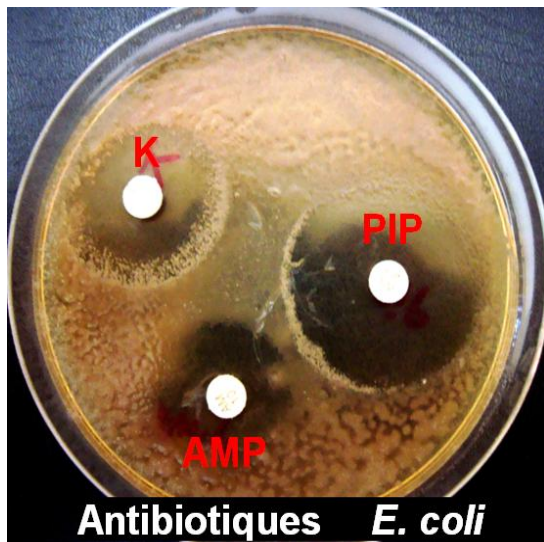
- le nitrate d'éconazole (N) est le plus actif des antifongiques testés, il présente les diamètres d'inhibitions les plus importants, à savoir 35,3 mm et 37,6 mm contre *A. niger* et *P. digitatum* respectivement. Ces deux champignons ont montré une remarquable sensibilité vis-à-vis de cet antifongique,
- l'amphotéricine B2 (AMB2) présente des zones d'inhibitions importantes, avec 22,6 mm contre *A. niger* et 20,6 mm contre *P. digitatum*. Les deux souches fongiques testées se sont révélées sensibles à l'AMB2,
- l'amphotéricine B1 (AMB1) et l'amphotéricine B3 (AMB3), quant à eux, sont les antifongiques les moins actifs sur les deux champignons testés qui ont manifestés une sensibilité intermédiaire ; ils ont induit des zones d'inhibitions ne dépassant pas les 8 mm chacun contre *A. niger* et *P. digitatum*

**Tableau 36** : Diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne  $\pm$  écart-type) et sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques commercialisés.

Antibiotiques	$\mu\text{g/ml}$	Diamètres des zones d'inhibition et sensibilité							
		<i>P. aeruginosa</i>		<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
		D	S	D	S	D	S	D	S
PIP	100	24,3 $\pm$ 1,5	+	37,6 $\pm$ 1,5	+	30,3 $\pm$ 1,5	+	25 $\pm$ 2,6	+
AMP	10	5,6 $\pm$ 1,5	$\pm$	6,3 $\pm$ 1,1	$\pm$	5,6 $\pm$ 1,1	$\pm$	17,6 $\pm$ 1,1	+
K	30	7,6 $\pm$ 0,5	$\pm$	15,6 $\pm$ 2,0	+	21,3 $\pm$ 2,0	+	16 $\pm$ 1,7	+
Antifongiques	$\mu\text{g/ml}$	<i>A. niger</i>				<i>P. digitatum</i>			
		D		S		D		S	
		D	S	D	S	D	S		
AMB1	100	6,3 $\pm$ 1,1	$\pm$			8,0 $\pm$ 1,0	$\pm$		
AMB2	50	22,6 $\pm$ 2,0	+			20,6 $\pm$ 2,0	+		
AMB3	20	7,0 $\pm$ 2,0	$\pm$			7,3 $\pm$ 0,5	$\pm$		
N	20	35,3 $\pm$ 3,5	+			37,6 $\pm$ 1,5	+		

**AMP** : ampicilline ; **K** : kanamycine ; **PIP** : pipéracilline ; **AMB1** : amphotéricine B1 ; **AMB2** : amphotéricine B2 ; **AMB3** : amphotéricine B3 ; **N** : nitrate d'éconazole ; **D** : diamètre de la zone d'inhibition ; **S** : sensibilité ; **+** : sensible ;  **$\pm$**  : intermédiaire.

Planche VI : Photos des tests de sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques commercialisés.



### III.1.2.1.A.3.2. Sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des extraits flavonoïques

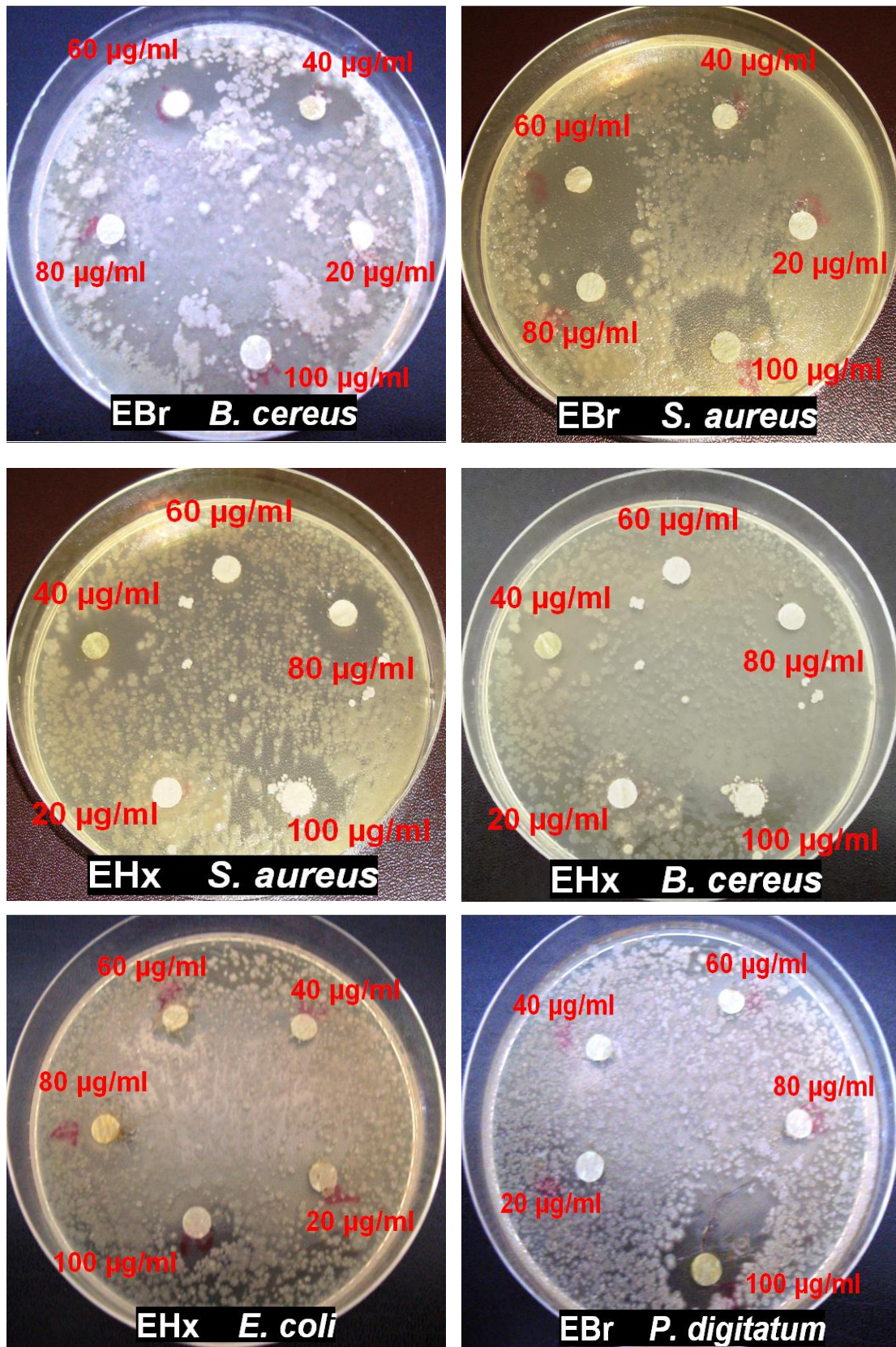
La méthode de diffusion en milieu solide ou de disque a pour but d'étudier l'activité antimicrobienne des différents extraits flavonoïques vis-à-vis des souches microbiennes testées. Elle permet d'obtenir les résultats résumés dans le tableau 37 et représentés par la planche VII.

**Tableau 37** : Diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne  $\pm$  écart-type), concentrations minimales inhibitrices ( $\mu\text{g/ml}$ ) et sensibilité des souches microbiennes.

Extraits flavonoïques	$\mu\text{g/ml}$	Diamètres des zones d'inhibition (en mm), concentrations minimales inhibitrices (en $\mu\text{g/ml}$ ) et sensibilité des souches											
		Bactéries								Champignons			
		<i>P. aeruginosa</i>		<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>A. niger</i>		<i>P. digitatum</i>	
		D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
EBr	100	16,0 $\pm$ 1,0	+	31,6 $\pm$ 2,5	+	27,0 $\pm$ 2,0	+	16,0 $\pm$ 1,7	+	15,6 $\pm$ 2,0	+	19,3 $\pm$ 1,5	+
	80	11,6 $\pm$ 1,1	+	20,0 $\pm$ 1,7	+	18,0 $\pm$ 1,0	+	11,6 $\pm$ 1,1	+	12,6 $\pm$ 1,1	+	12,3 $\pm$ 1,5	+
	60	7,6 $\pm$ 0,5	$\pm$	15,6 $\pm$ 1,1	+	9,3 $\pm$ 2,1	$\pm$	8,3 $\pm$ 1,1	$\pm$	9,6 $\pm$ 1,1	$\pm$	7,6 $\pm$ 1,1	$\pm$
	40	0	-	12,3 $\pm$ 1,5	+	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	8,3 $\pm$ 1,5	$\pm$	0	-	0	-	0	-	0	-
			<b>CMI = 50</b>		<b>CMI = 6,25</b>		<b>CMI = 50</b>		<b>CMI = 50</b>		<b>CMI = 50</b>		
EHx	100	15,3 $\pm$ 1,5	+	24,0 $\pm$ 4,5	+	29,6 $\pm$ 1,5	+	18,0 $\pm$ 1,0	+	13,3 $\pm$ 2,0	+	17,3 $\pm$ 2,0	+
	80	11,3 $\pm$ 1,5	+	22,3 $\pm$ 1,5	+	23,6 $\pm$ 1,5	+	15,3 $\pm$ 1,5	+	8,0 $\pm$ 1,7	$\pm$	10,33 $\pm$ 1,1	+
	60	0	-	17,3 $\pm$ 2,0	+	12,0 $\pm$ 1,0	+	10,0 $\pm$ 1,0	+	0	-	7,6 $\pm$ 1,1	$\pm$
	40	0	-	11,6 $\pm$ 1,1	+	8,6 $\pm$ 1,5	$\pm$	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	5,3 $\pm$ 1,5	$\pm$	0	-	0	-	0	-	0	-
			<b>CMI = 6,25</b>		<b>CMI = 25</b>		<b>CMI = 50</b>		<b>CMI = 50</b>				
ECh	100	12,3 $\pm$ 2,0	+	13,6 $\pm$ 1,5	+	11,0 $\pm$ 1,0	+	14,3 $\pm$ 0,5	+	11,6 $\pm$ 2	+	15,33 $\pm$ 1,5	+
	80	8,6 $\pm$ 1,5	$\pm$	9,3 $\pm$ 1,5	+	7,6 $\pm$ 0,5	$\pm$	11,3 $\pm$ 0,5	+	0	-	10,6 $\pm$ 1,5	+
	60	0	-	6,3 $\pm$ 1,1	$\pm$	0	-	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
			<b>CMI = 50</b>										
EAc	100	11,0 $\pm$ 1,0	+	17,3 $\pm$ 2,0	+	15,3 $\pm$ 2,3	+	11,3 $\pm$ 1,5	+	9,6 $\pm$ 1,1	+	13,0 $\pm$ 1,7	+
	80	0	-	13,6 $\pm$ 1,5	+	12,0 $\pm$ 1,7	+	0	-	0	-	8,3 $\pm$ 1,1	$\pm$
	60	0	-	10,3 $\pm$ 1,5	+	8,6 $\pm$ 1,5	$\pm$	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
			<b>CMI = 50</b>										
EAq	100	12,3 $\pm$ 1,1	+	17,6 $\pm$ 1,1	+	16,6 $\pm$ 1,5	+	13,3 $\pm$ 1,1	+	10,3 $\pm$ 1,5	+	11,3 $\pm$ 2,5	+
	80	0	-	13,3 $\pm$ 2,0	+	11,6 $\pm$ 1,1	+	10,6 $\pm$ 1,1	+	0	-	0	-
	60	0	-	11,0 $\pm$ 2,6	+	8,0 $\pm$ 1,7	$\pm$	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
			<b>CMI = 50</b>		<b>CMI = 50</b>								

**D** : diamètre ; **S** : sensibilité ; **EBr** : extrait brut ; **EHx** : extrait héxanique ; **ECh** : extrait chloroformique ; **EAc** : extrait d'acétate d'éthyle ; **EAq** : extrait aqueux ; - : résistante ;  $\pm$  : intermédiaire, **CMI** : concentration minimale inhibitrice.

Planche VII : Photos du test préliminaire de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits des feuilles en provenance du mont de Tessala.



Les résultats regroupés dans le tableau ci-dessus montrent que l'ensemble des extraits présentent une activité antibactérienne importante, essentiellement avec l'EBr et l'EHx, et à un degré moindre l'EAq. Les tests réalisés permettent de tirer les conclusions suivantes :

- les différentes concentrations de l'EBr présentent une importante activité sur *B. cereus* et *S. aureus*. Ces deux bactéries se sont montrées le plus souvent sensibles à cet extrait donnant des diamètres d'inhibitions comprises entre 8,3 mm et 31,6 mm. En revanche, l'EBr est moins actif sur *E. coli* et *P. aeruginosa* enregistrant des diamètres d'inhibitions ne dépassant pas les 16 mm,
- l'EHx avec ses différentes concentrations, enregistre un effet considérable sur *B. cereus* et *S. aureus*. Ces deux souches se sont avérées le plus souvent sensibles donnant ainsi des diamètres d'inhibitions allant de 5,3 mm à 29,6 mm ; ce dernier diamètre étant le plus élevé vis-à-vis de *S. aureus*. *P. aeruginosa* et *E. coli* se sont montrées beaucoup plus résistantes à l'EHx par rapport aux deux premières souches enregistrant des diamètres d'inhibitions ne dépassant pas les 18 mm,
- l'EAq présente une activité importante sur *B. cereus* et *S. aureus* enregistrant des zones d'inhibitions avec des diamètres compris entre 8 mm et 17,6 mm. En revanche, il présente une activité moins importante sur *P. aeruginosa* et *E. coli* qui se sont avérées le plus souvent sensibles, à l'exception des deux concentrations de 80 µg/ml et 100 µg/ml qui ont manifesté des diamètres de 10,6 mm, 12,3 mm et 13,3 mm,
- l'ECh est plus actif sur *E. coli* aux concentrations de 80 µg/ml et 100 µg/ml enregistrant des diamètres d'inhibition respectifs de 11,3 mm et 14,3 mm. *B. cereus* est qualifié dans la majorité des tests résistant et intermédiaire à l'ECh ayant induit des zones d'inhibition avec des diamètres compris entre 6,3 mm et 13,6 mm. Cet extrait est moins actif sur *P. aeruginosa* et *S. aureus* avec des diamètres compris entre 7,6 mm et 12,3 mm enregistrés avec ses deux plus fortes concentrations (80 µg/ml et 100 µg/ml),
- l'EAc a montré l'activité antibactérienne la plus faible sur *E. coli* et *P. aeruginosa* par rapport aux autres extraits flavonoïques testés donnant ainsi des diamètres ne dépassant pas les 11,3 mm. Par contre, cet extrait présente une activité plus importante sur *B. cereus* et *S. aureus* qui se sont avérées sensibles dans la majorité des tests avec des diamètres d'inhibitions allant de 8,6 mm à 17,3 mm,
- l'activité inhibitrice la plus forte est enregistrée par l'EBr et l'EHx sur *B. cereus* (CMI = 6,25 µg/ml). Une CMI de 25 µg/ml est enregistrée par l'EHx sur *S. aureus*. Toutes les autres CMI sont évaluées à 50 µg/ml, c'est le cas de l'EBr sur *P. aeruginosa*, l'EAc et l'EAq sur *B. cereus*, l'EBr et l'EAq sur *S. aureus*, l'EBr et l'EHx sur *E. coli*.

Comme pour l'activité antibactérienne, l'EBr et l'EHx se sont avérés les deux extraits flavonoïques les plus actifs vis-à-vis des souches fongiques testés. Les résultats des tests antifongiques montrent que :

- pour *P. digitatum*, l'EBr et l'EHx se sont avérés les deux extraits les plus actifs aux concentrations de 60 µg/ml, 80 µg/ml et 100 µg/ml où nous avons enregistré des zones d'inhibitions dont les diamètres sont compris entre 7,6 mm et 19,3 mm. Ces diamètres classent ce champignon comme intermédiaire et sensible à ces deux extraits flavonoïques. L'ECh et l'EAc enregistrent aux fortes concentrations (80 µg/ml et 100 µg/ml) des diamètres d'inhibitions allant de 8,3 mm et 15,33 mm. Ce champignon s'est montré sensible à l'EAq dans la majorité des tests ; excepté à 100 µg/ml où il a été sensible avec un diamètre de 11,3 mm,
- pour *A. niger*, l'EBr à des concentrations de 60 µg/ml, 80 µg/ml et 100 µg/ml et l'EHx à 80 µg/ml et 100 µg/ml, présentent les activités les plus importantes avec des diamètres d'inhibitions compris entre 8 mm et 15,6 mm. L'ECh, l'EAq et l'EAc se sont avérés les moins actifs enregistrant des diamètres respectifs de 11,6 ; 10,3 et 9,6 mm à une concentration de 100 µg/ml,
- une concentration minimale inhibitrice de 50 µg/ml est notée pour les deux extraits EBr et EHx vis-à-vis de *P. digitatum*.

#### III.1.2.1.A.3.3. Classement des souches microbiennes et des extraits flavonoïques

Pour mieux interpréter les résultats de la sensibilité des souches microbiennes testées vis-à-vis des extraits flavonoïques, les souches microbiennes ont été classées selon leurs sensibilités (Tab. 38).

**Tableau 38** : Classement des extraits flavonoïques de *M. vulgare* en provenance du mont de Tessala selon leurs effets antimicrobiens et des souches microbiennes selon leurs sensibilités.

Type du test et de souches		Sensibilité							
		Résistante (-)		Intermédiaire (±)		Sensible (+)		Totaux	
		N	%	N	%	N	%	N	%
		<b>Extraits</b>							
Test antibactérien	EBr	6	30	4	20	10	50	20	100
	EHx	6	30	2	10	12	60	20	100
	ECh	11	55	3	15	6	30	20	100
	EAc	12	60	1	5	7	35	20	100
	EAq	11	55	1	5	8	40	20	100
Test Antifongique	EBr	4	40	2	20	4	40	10	100
	EHx	6	60	1	10	3	30	10	100
	ECh	7	70	0	0	3	30	10	100
	EAc	7	70	1	10	2	20	10	100
	EAq	8	80	0	0	2	20	10	100
		<b>Souches microbiennes</b>							
Bactéries	<i>P. aeruginosa</i>	16	64	2	8	7	28	25	100
	<i>B. cereus</i>	6	24	3	12	16	64	25	100
	<i>S. aureus</i>	10	40	5	20	10	40	25	100
	<i>E. coli</i>	14	56	1	4	10	40	25	100
Champignons	<i>A. niger</i>	18	72	1	4	6	24	25	100
	<i>P. digitatum</i>	14	56	3	12	8	32	25	100

N : nombre de tests.

Il ressort de ces résultats que :

- la bactérie la plus résistante est *P. aeruginosa* avec un pourcentage de 64 % des tests, suivi successivement par *E. coli* avec 56 %, *S. aureus* avec 40 % et *B. cereus* avec 24 %,
- la bactérie la plus sensible est *B. cereus* avec un taux de 64 % suivi par *S. aureus* et *E. coli* avec 40 % chacune et enfin *P. aeruginosa* avec 28 %,
- *A. niger*. est le champignon le plus résistant vis-à-vis des extraits flavonoïques utilisés avec un taux de 72 % des tests réalisés, suivi par *P. digitatum* avec 56 %,
- du point de vue sensibilité, *P. digitatum* est le plus sensible avec un pourcentage de 32 % des essais, à l'opposé *A. niger* n'a présenté qu'un taux de sensibilité de 24 %.

De même, les différents extraits flavonoïques testés, eux aussi, ont été répartis selon leurs effets antibactériens et antifongiques (Tab. 38). Ces résultats nous révèlent que :

- l'EBr et l'EHx sont les deux extraits flavonoïques qui ont enregistré les plus forts taux de tests sensibles avec respectivement 50 % et 60 % vis-à-vis des souches bactériennes ; 40 % et 30 % vis-à-vis des souches fongiques. Les trois extraits flavonoïques restants sont moins actifs enregistrant des taux respectifs de 40 %, 35 % et 30 % de tests sensibles pour l'EAq, l'EAc et l'ECh contre les souches bactériennes ; et des pourcentages de 20 % de tests sensibles pour l'EAq et l'EAc, 30 % pour l'ECh contre les souches fongiques,
- concernant la résistance des bactéries, l'EAc était le moins actif avec 60 % des tests résistants suivi respectivement par l'EAq et l'ECh avec 55 % chacun, l'EBr et l'EHx avec 30 % chacun. Pour la résistance des champignons, EAq est l'extrait flavonoïque le moins actif avec 80 % des tests, suivi respectivement par l'EAc et l'ECh avec 70 % chacun, l'EHx avec 60 % et enfin l'EBr avec 40 %,

### III.1.2.1.B. Variation du pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extrait des feuilles de *M. vulgare* en fonction de la localité d'échantillonnage

#### III.1.2.1.B.1. Rendements en extraits flavonoïques

Les pourcentages relatifs aux différents rendements calculés par rapport au broyat (poudre des feuilles) et à l'extrait méthanolique (EBr), ainsi que les caractéristiques (aspects et couleurs) des extraits flavonoïques obtenus des feuilles de *M. vulgare* de trois localités d'échantillonnage sont synthétisés dans le tableau 39.

**Tableau 39** : Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions flavonoïques extraites des feuilles des trois localités d'échantillonnage.

Localités d'échantillonnage	Extraits flavonoïques	Aspects	Couleurs	Rendements % (au broyat)	Rendements % (à EBr)
Mont de Tessala	TEBr	Pâteux	vert foncé	29,5	100
	TEHx	huileux	vert clair	9,25	31,35
	TECh	Pâteux	marron clair	4,5	15,25
	TEAc	Pâteux	vert jaunâtre	7,5	25,42
	TEAq	huileux	vert clair	2,6	8,81
Forêt domaniale de M'sila	MEBr	Pâteux	vert foncé	19,25	100
	MEHx	huileux	vert clair	3,8	19,74
	MECh	poudre	marron clair	2,1	10,90
	MEAc	poudre	vert foncé	4,5	23,37
	MEAq	huileux	vert clair	1,4	7,27
Aïn Skhouna	SEBr	Pâteux	vert foncé	22,5	100
	SEHx	huileux	vert clair	3,2	14,22
	SECh	huileux	marron foncé	4,1	18,22
	SEAc	huileux	vert foncé	5,3	23,55
	SEAq	huileux	vert clair	2,5	11,11

**T** : Tessala ; **M** : M'sila ; **S** : Skhouna ; **EBr** : extrait brut ; **EHx** : extrait hexanique ; **ECh** : extrait chloroformique ; **EAc** : extrait d'acétate d'éthyle ; **EAq** : extrait aqueux.

Les résultats ci-dessus montrent que :

- les extraits flavonoïques des différentes localités d'échantillonnage présentent divers aspect : pâteux, huileux et poudreux. Ces extraits présentent diverses couleurs : vert clair, vert foncé, marron clair et marron foncé.
- par rapport aux broyats (feuilles de *M. vulgare*), l'EBr présente toujours le rendement d'extraction le plus élevé. Il est évalué à 29,5 % pour le mont de Tessala (TEBr), 19,25 % pour la forêt domaniale de M'sila (MEBr) et 22,5 % pour Aïn Skhouna (SEBr). Cet extrait est suivi respectivement par : TEHx (9,25 %), TEAc (7,5 %) et TECh (4,5 %) dans le mont de Tessala ; MEAc (4,5 %), MEHx (3,8 %) et MECh (2,1 %) dans la forêt domaniale de M'sila ; SEAc (5,3 %), SECh (4,1 %) et SEHx (3,2 %) à Aïn Skhouna. EAq enregistre constamment le rendement le plus faible en flavonoïdes avec des pourcentages de : 2,6 % (TEAq) 1,4 % (MEAq) et 2,5 % (SEAq),

- par rapport à l'EBr, les rendements des extraits flavonoïques sont de : 31,35 %, 25,42 %, 15,25 % et 8,81 % pour TEHx, TEAc, TECh et TEAq respectivement, 23,37 %, 19,74 %, 10,90 et 7,27 % pour MEAc, MEHx, MECh et MEAq respectivement, 23,55 %, 18,22 %, 14,22 % et 11,11 % pour SEAc, SECh, SEHx et SEAq respectivement,
- la somme des pourcentages des quatre extraits flavonoïques obtenus à partir de l'EBr est de 80,90 %, 51,28 % et 67,1 % dans le mont de Tessala, la forêt domaniale de M'sila et Aïn Skhouna respectivement. Vu le nombre élevé de lavages effectués pour la séparation des trois fractions (EHx, ECh et EAc), le fractionnement de l'extrait brut peut conduire à des pertes substantielles de matière, ces pertes sont de 19,1 %, 48,72 % et 32,9 % dans le mont de Tessala, la forêt domaniale de M'sila et Aïn Skhouna respectivement.

### III.1.2.1.B.2. Screening phytochimique

Le screening phytochimique effectué avait pour objectif d'une part la mise en évidence de diverses classes phénoliques présentes dans nos extraits flavoniques, et d'autre part de tirer d'éventuelles différences existantes entre les trois localités d'échantillonnage. Les résultats sont détaillés dans le tableau 40.

**Tableau 40** : Criblage phytochimique des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage.

Localités d'échantillonnage	Extraits flavonoïques	Composés phénoliques caractérisés								
		POL	FLV	TC	TH	FLA	ANT	FLO	PRO	COUM
Mont de Tessala	TEBR	+++	++	+	±	++	-	+	-	-
	TEHX	++	++	-	-	-	-	++	-	-
	TECH	++	++	-	-	+	-	-	-	-
	TEAC	+++	+++	-	-	+	-	+	-	-
	TEAQ	+	++	-	-	-	-	+	-	-
Forêt domaniale de M'sila	MEBR	+++	++	-	±	++	-	-	-	-
	MEHX	+++	++	-	-	+	-	-	-	-
	MECH	++	++	-	-	-	-	-	-	-
	MEAC	+	+++	-	-	-	±	++	-	-
	MEAQ	+	++	-	-	-	-	-	-	-
Aïn Skhouna	SEBR	+++	++	-	±	-	-	-	-	-
	SEHX	+	++	-	-	+	-	-	-	-
	SECH	++	++	-	-	-	-	-	-	-
	SEAC	+	+++	-	-	+	-	-	-	-
	SEAQ	+	++	-	-	-	-	-	-	-

**T** : mont de Tessala ; **M** : forêt domaniale de M'sila ; **S** : Aïn Skhouna ; **EBr** : extrait brut ; **EHx** : extrait hexanique ; **ECh** : extrait chloroformique ; **EAc** : extrait d'acétate d'éthyle ; **EAq** : extrait aqueux ; **POL** : polyphénols ; **FLV** : flavonoïdes ; **TC** : Tanins condensés ; **TH** : Tanins hydrolysables ; **FLA** : Flavanés ; **ANT** : Anthocyanes ; **FLO** : Flavanols ; **PRO** : Proanthocyanidols ; **COUM** : Coumarines ; **+++** : réaction franchement positive, **+** : réaction positive, **-** : réaction négative ; **±** : réaction louche.

Les tests du screening phytochimique font ressortir les résultats suivants :

- la présence des polyphénols et des flavonoïdes dans tous les extraits flavonoïques,
- TEBr est le seul extrait qui contient les tanins condensés,
- une réaction louche pour les tanins hydrolysables chez TEBr, MEBr et SEBr,
- la présence des flavanes dans TEBr, TECh, TEAc, MEBr, MEHx, SEHx et SEAc,
- une réaction louche pour les anthocyanes dans MEAc,
- la présence des flavanols dans TEBr, TEHx, TEAc, TEAq et MEAc,
- l'absence totale des proanthocyanidols et des coumarines dans tous les extraits flavonoïques.

### III.1.2.1.B.3. Activités antibactériennes et antifongiques

#### III.1.2.1.B.3.1. AntibioGramme et antifongogramme

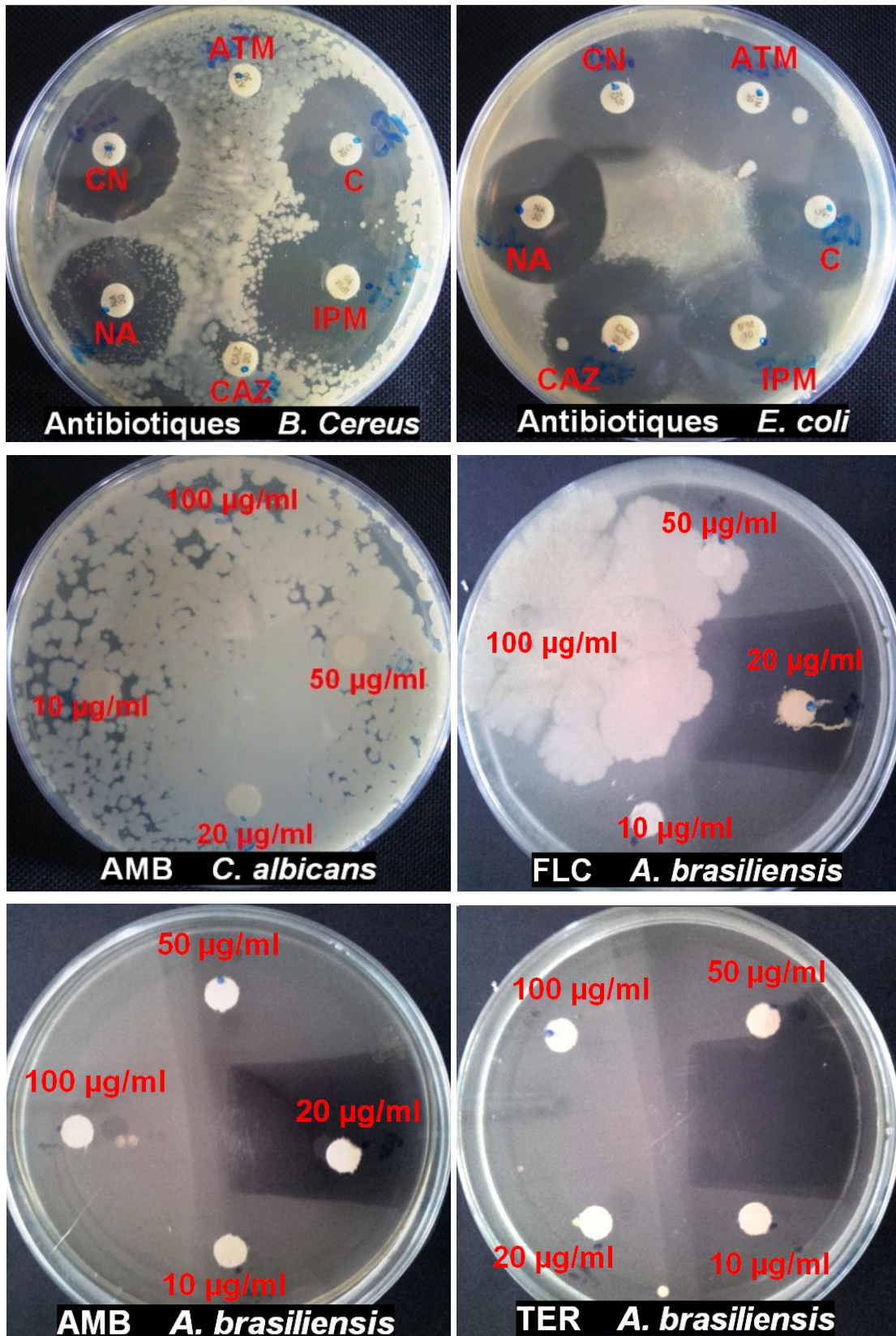
Les diamètres d'inhibition résultant des tests de sensibilité des souches microbiennes testées vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques commercialisés sont mentionnés dans le tableau 41 et illustrés par la planche VIII.

**Tableau 41** : Diamètres des zones d'inhibition(en mm) de l'antibioGramme et de l'antifongogramme et sensibilités des souches microbiennes.

Antibiotiques	µg/ml	Diamètres des zones d'inhibition et sensibilité					
		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>	
		D	S	D	S	D	S
CN	10	25	+	25	+	IT	++
ATM	30	0	-	30	+	IT	++
NA	30	25	+	25	+	IT	++
CAZ	30	0	-	27	+	IT	++
C	30	25	+	30	+	IT	++
IPM	10	30	+	30	+	IT	++
Antifongiques	µg/ml	<i>A. brasiliensis</i>		<i>C. albicans</i>			
		D	S	D	S		
AMB	100	IT	++	0	-		
	50	IT	++	0	-		
	20	IT	++	0	-		
	10	IT	++	0	-		
FLC	100	0	-	0	-		
	50	0	-	0	-		
	20	35	+	0	-		
	10	25	+	0	-		
TER	100	IT	++	0	-		
	50	IT	++	0	-		
	20	IT	++	0	-		
	10	IT	++	0	-		

**C:** chloramphenicol ; **CN:** gentamicine ; **ATM:** aztréonam ; **NA:** acide nalidixique ; **CAZ:** ceftazidime ; **IPM:** imipénème ; **AMB:** amphotéricine B ; **FLC:** fluconazole ; **TER:** terbinafine ; **IT:** inhibition totale ; **D :** diamètre ; **S :** sensibilité ; **+** : sensible ; **-** : résistante ; **±** : intermédiaire ; **++** : hyper sensible.

Planche VIII : Photos de l'activité antimicrobienne des antibiotiques et des antifongiques commercialisés.



Les résultats des antibiotiques référenciés montrent que :

- l'imipénème (IPM) est l'antibiotique le plus actif vis-à-vis des souches bactériennes testées. Il a engendré un diamètre d'inhibition de 30 mm contre *B. cereus* et *E. coli*,
- le chloramphénicol (C) a enregistré un remarquable effet bactériostatique donnant deux diamètres d'inhibitions respectifs de 25 mm et 30 mm vis-à-vis de *B. cereus* et *E. coli*,
- l'acide nalidixique (NA) et la gentamicine (CN) ont provoqué un bon effet antibactérien. Ils ont enregistré des diamètres identiques estimés à 25 mm contre *B. cereus* et *E. coli*,
- l'aztréonam (ATM) et la ceftazidime (CAZ) sont les moins actifs parmi les antibiotiques utilisés. En effet, ils présentent des valeurs d'auréoles respectives de 30 mm et 27 mm vis-à-vis de *E. coli*. Par contre ils sont totalement inactifs contre *B. cereus* qui s'est révélée résistante à ces deux antibiotiques,
- tous les antibiotiques testés ont provoqué une inhibition totale de la croissance bactérienne chez *P. mirabilis*.

Pour les antifongiques commercialisés :

- l'amphotéricine B (AMB) et la terbinafine (TER) se sont montrés les antifongiques les plus efficaces en provoquant une inhibition totale de la croissance fongique de *A. brasiliensis*,
- le fluconazole (FLC) est moyennement actif vis-à-vis de *A. brasiliensis* enregistrant deux zones d'inhibition respectives de 25 mm et 30 mm aux concentrations de 10 µg/ml et 30 µg/ml,
- les antifongiques testés sont totalement inactifs sur *C. albicans* qui s'est montrée résistante à tous les tests.

### III.1.2.1.B.3.2. Pouvoir antimicrobien des extraits flavonoïques des trois localité d'échantillonnage

#### III.1.2.1.B.3.2.1. Flavonoïdes extraits des feuilles de *M. vulgare* en provenance du mont de Tessala

L'activité antimicrobienne des extraits flavonoïques des feuilles de *M. vulgare* en provenance du mont de Tessala est estimée en termes de diamètres des zones d'inhibitions autour des disques chargés des extraits flavonoïques à diverses concentrations vis-à-vis de cinq souches microbiennes. Les résultats sont regroupés dans le tableau 42 et représentés par la planche IX.

**Tableau 42** : Diamètres moyens des zones d'inhibition (en mm) et CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits flavonoïques du mont de Tessala

Extraits Flavonoïques	$\mu\text{g/ml}$	Diamètres des zones d'inhibition (en mm), concentrations minimales inhibitrices (en $\mu\text{g/ml}$ ) et sensibilité des souches									
		Bactéries						Champignons			
		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>A. brasiliensis</i>		<i>C. albicans</i>	
		D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
TEBr	100	31,65 $\pm$ 2,33	+	12,5 $\pm$ 2,12	+	0	-	31,16 $\pm$ 1,64	+	0	-
	80	18,5 $\pm$ 2,12	+	0	-	11,5 $\pm$ 2,12	+	26,33 $\pm$ 1,88	+	26 $\pm$ 1,41	+
	60	14,5 $\pm$ 0,7	+	0	-	0	-	24 $\pm$ 7,93	+	0	-
	40	13,8 $\pm$ 3,95	+	0	-	0	-	22,66 $\pm$ 2,51	+	0	-
	20	7,5 $\pm$ 2,12	$\pm$	0	-	0	-	9,66 $\pm$ 1,15	$\pm$	0	-
			CMI = 25					CMI = 25		CMI = 50	
TEHx	100	24,8 $\pm$ 2,54	+	0	-	0	-	18,83 $\pm$ 2,54	+	26,2 $\pm$ 1,05	+
	80	0	-	0	-	13 $\pm$ 1,41	+	0	-	24 $\pm$ 1,41	+
	60	0	-	0	-	0	-	15,75 $\pm$ 1,76	+	19,86 $\pm$ 0,80	+
	40	21 $\pm$ 1,41	+	12,25 $\pm$ 1,06	+	0	-	0	-	9,16 $\pm$ 1,64	$\pm$
	20	9,5 $\pm$ 3,53	$\pm$	0	-	0	-	8,5 $\pm$ 1,7	$\pm$	0	-
			CMI = 25					CMI = 50		CMI = 50	
TECh	100	0	-	13,5 $\pm$ 2,12	+	16,25 $\pm$ 1,76	+	33,5 $\pm$ 2,12	+	28,30 $\pm$ 2,45	+
	80	31,5 $\pm$ 2,12	+	0	-	0	-	26,5 $\pm$ 2,12	+	22,5 $\pm$ 2,12	+
	60	23 $\pm$ 2,82	+	0	-	0	-	0	-	0	-
	40	16,5 $\pm$ 3,53	+	0	-	0	-	22 $\pm$ 1,41	+	0	-
	20	8 $\pm$ 1,41	$\pm$	0	-	0	-	9,49 $\pm$ 1,64	$\pm$	0	-
			CMI = 25			CMI = 100			CMI = 25		CMI = 100
TEAc	100	31,65 $\pm$ 2,33	+	21,5 $\pm$ 4,94	+	0	-	37,5 $\pm$ 3,53	+	36,65 $\pm$ 4,73	+
	80	21,5 $\pm$ 2,12	+	15,8 $\pm$ 2,54	+	11,66 $\pm$ 1,52	+	28,5 $\pm$ 4,95	+	27,5 $\pm$ 3,53	+
	60	17 $\pm$ 2,82	+	0	-	0	-	25,5 $\pm$ 6,36	+	24 $\pm$ 1,41	+
	40	13 $\pm$ 2,82	+	0	-	0	-	22,5 $\pm$ 3,53	+	18 $\pm$ 1,41	+
	20	9,5 $\pm$ 0,70	$\pm$	0	-	0	-	8,99 $\pm$ 0,94	$\pm$	9,83 $\pm$ 1,17	$\pm$
			CMI = 50			CMI = 100			CMI = 25		CMI = 25
TEAq	100	31,5 $\pm$ 3,53	+	21,3 $\pm$ 2,4	+	15,16 $\pm$ 1,64	+	IT	++	0	-
	80	0	-	15,8 $\pm$ 2,54	+	9,83 $\pm$ 1,17	$\pm$	IT	++	25,8 $\pm$ 2,12	+
	60	0	-	0	-	0	-	IT	++	22 $\pm$ 1,41	+
	40	24 $\pm$ 1,41	+	0	-	0	-	IT	++	0	-
	20	9 $\pm$ 2,82	$\pm$	0	-	0	-	IT	++	9,49 $\pm$ 0,23	$\pm$
			CMI = 25			CMI = 100			CMI = 12,5		CMI = 25

IT : inhibition totale ; T : mont de Tessala ; EBr : extrait brut ; EHx : extrait hexanique ; ECh : extrait chloroformique ; EAc : extrait d'acétate d'éthyle ; EAq : extrait aqueux ; D : diamètre ; S : sensibilité ; + : sensible ; - : résistante ;  $\pm$  : intermédiaire ; ++ : hyper sensible.

Planche IX : Photos de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits des feuilles en provenance du mont de Tessala (page 1/2).

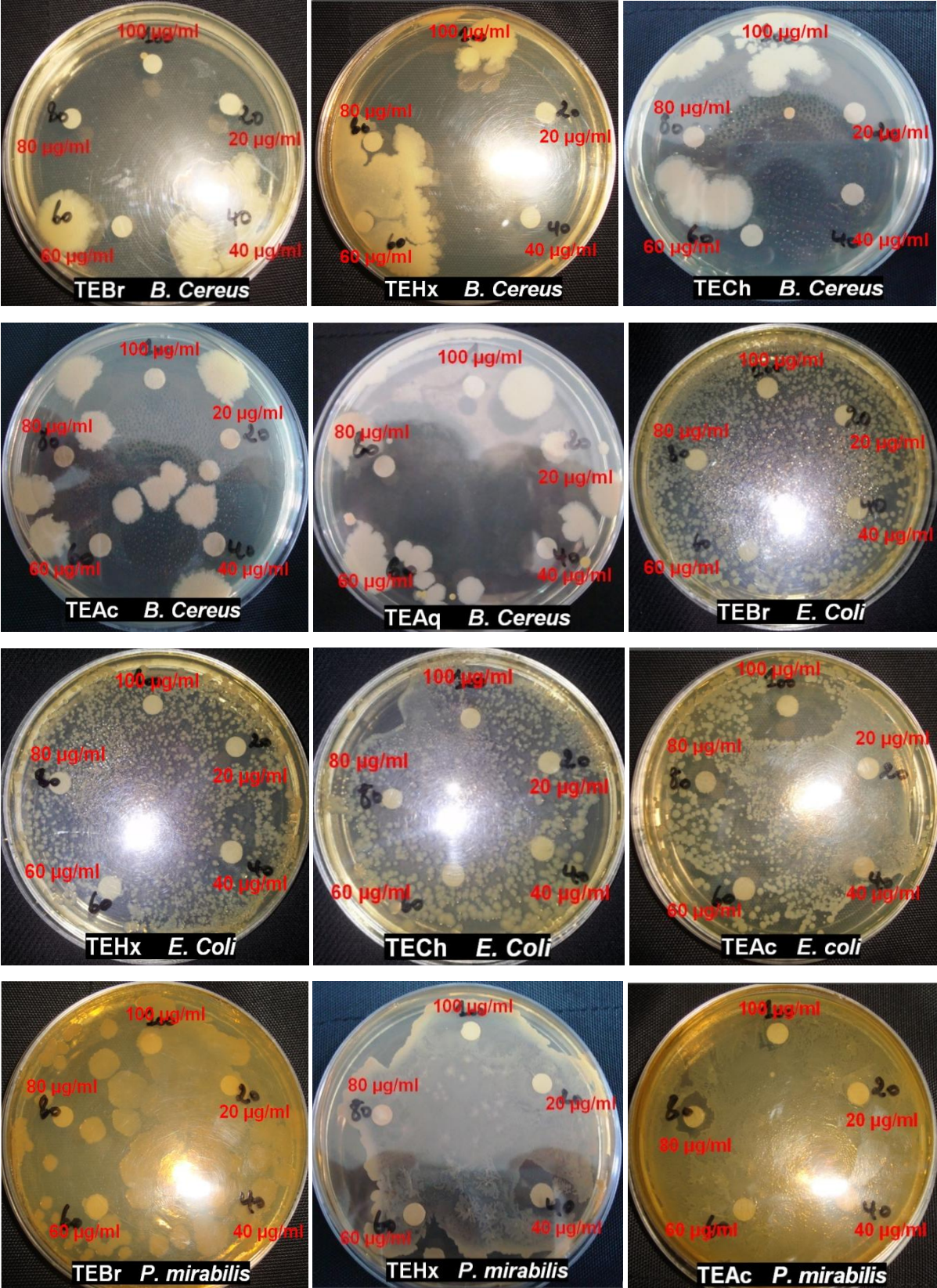
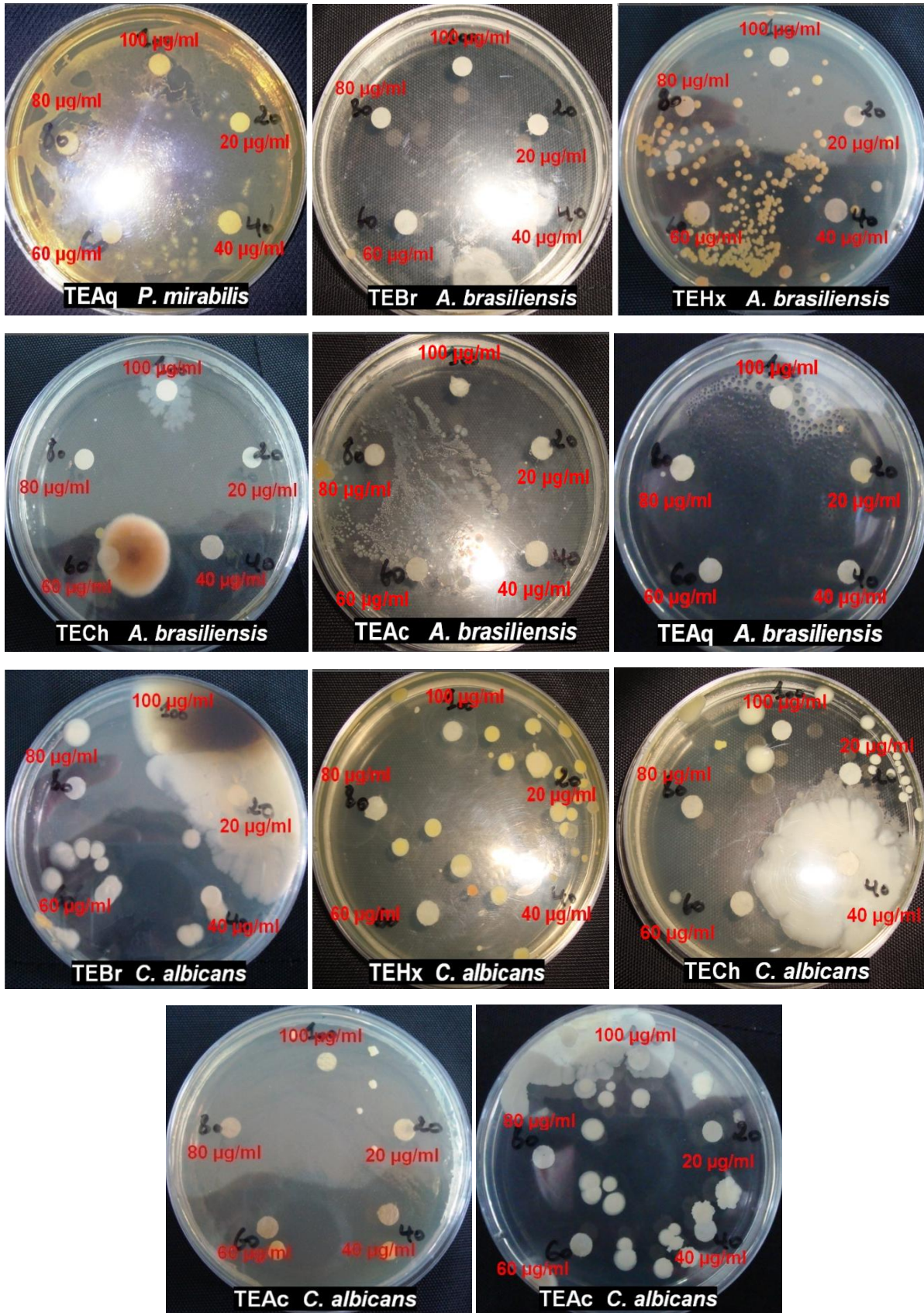


Planche IX : Photos de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits des feuilles en provenance du mont de Tessala (page 2/2).



Les résultats de l'activité antibactérienne montrent que tous les extraits flavonoïques ont un effet bactériostatique vis-à-vis des souches bactériennes testées. En fonction des diamètres d'inhibition enregistrés, nous avons remarqué que :

- TEAc avec ses différentes concentrations, enregistre d'importantes zones d'inhibitions sur *B. cereus* qui s'est avérée le plus souvent sensible enregistrant ainsi des diamètres allant de 9,5 mm à 31,65 mm. Sur *E. coli*, il est beaucoup moins actif donnant deux diamètres de 21,5 mm (le plus grand diamètre enregistré sur *E. coli*) et 15,8 mm avec ses deux concentrations les plus élevées, 100 µg/ml et 80 µg/ml respectivement. *P. mirabilis*, contrairement aux deux souches bactériennes précédentes, s'est montrée résistante à l'exception d'un seul diamètre d'inhibition de 11,66 mm enregistré autour du disque imprégné de la concentration 80 µg/ml,
- avec des diamètres d'inhibition variant entre 7,5 mm et 31,65 mm, TEBr démontre un remarquable effet sur *B. cereus* qui s'est montré le plus souvent sensible. Sur chacune des deux bactéries, *E. coli* et *P. mirabilis*, il présente une seule zone d'inhibition de 12,5 mm sur la première bactérie avec sa concentration de 100 µg/ml et 11,5 mm sur la deuxième bactérie avec sa concentration de 80 µg/ml,
- TECh produit des zones d'inhibition dont le diamètre est compris entre 8 mm et 31,5 mm vis-à-vis de *B. cereus*. *E. coli* et *P. mirabilis* qui se sont montrées le plus souvent sensibles, sauf à la concentration 100 µg/ml où cet extrait a enregistré une importante auréole de 16,25 mm sur *P. mirabilis* et 13,5 mm sur *E. coli*,
- TEAq est beaucoup moins actif sur *B. cereus* qui s'est révélé résistant aux deux concentrations de 60 et 80 µg/ml, enregistrant ainsi des diamètres d'inhibition allant de 9 mm à 31,5 mm. Par contre, vis-à-vis de *P. mirabilis*, il est le seul extrait qui a donné deux zones d'inhibitions de 9,83 mm et 15,16 mm autour des disques chargés des deux concentrations 80 et 100 µg/ml. Aussi, contre *E. coli* et avec ses deux concentrations précédentes, il a enregistré des auréoles respectives de 15,8 mm et 21,3 mm,
- TEHx est l'extrait flavonoïque qui a enregistré les plus faibles zones d'inhibition sur les souches bactériennes testées. Ces diamètres sont compris entre 9,5 mm et 24,8 mm vis-à-vis de *B. cereus*, 12,25 mm sur *E. coli* et 13 mm contre *P. mirabilis*,
- une concentration minimale inhibitrice de 25 µg/ml est enregistrée pour TEBr, TEHx, TECh et TEAq vis-à-vis de *B. cereus*. Une CMI de 50 µg/ml est notée chez TEAc vis-à-vis de *B. cereus*. La CMI de 100 µg/ml est marquée pour TECh sur *P. mirabilis* et TEAc et TEAq contre *E. coli*.

Concernant l'activité antifongique, TEAc et TEAq se sont avérés de très bons fongostatiques :

- Les différentes concentrations de TEAc inhibent fortement la croissance de *A. brasiliensis* engendrant des auréoles de 8,99 mm à 37,5 mm. Aussi, il possède l'activité fongostatique la plus efficace contre *C. albicans* enregistrant à 100 µg/ml le diamètre d'inhibition maximal (36,65 mm),
- TEAq est le seul extrait flavonoïques qui a engendré une inhibition totale de la croissance fongique de *A. brasiliensis* autour des disques imprégnés de ces différentes concentrations. Sur *C. albicans*, il est beaucoup moins actif enregistrant des valeurs d'auréoles allant de 9,59 mm à 25,8 mm,
- TEBr produit d'importantes zones d'inhibitions vis-à-vis de *A. brasiliensis*, ces diamètres sont compris entre 9,66 mm et 31,16 mm. Par contre, il est l'extrait le moins actif sur *C. albicans* qui s'est révélée résistante à la majorité de ses concentrations, à l'exception d'une seule auréole de 26 mm notée à la concentration 80 µg/ml,
- TEHx présente un important effet antifongique vis-à-vis de *C. albicans* enregistrant avec ses quatre concentrations les plus élevées, des diamètres d'inhibitions compris entre 9,16 mm et 26,2 mm. Sur *A. brasiliensis*, il est moyennement actif avec des valeurs d'auréoles ne dépassant pas les 18,83 mm,
- TECh produit des diamètres d'inhibitions compris entre 9,49 mm et 33,5 mm vis-à-vis de *A. brasiliensis* et des valeurs d'auréoles de 22, 5 mm et 28,30 mm enregistrées respectivement avec ses deux concentrations de 80 µg/ml et 100 µg/ml contre *C. albicans*,
- pour les concentrations minimales inhibitrices, une CMI de 25 µg/ml est enregistrée pour TEBr, TECh et TEAc vis-à-vis de *A. brasiliensis*, TEAc et TEAq sur *C. albicans*. Une CMI de 50 µg/ml est notée chez TEBr contre *C. albicans* et pour TEHx sur *A. brasiliensis* et *C. albicans*. La CMI de 100 µg/ml est obtenue avec TECh sur *C. albicans*. La seule CMI de 12,5 µg/ml est enregistrée par TEAq vis-à-vis de *A. brasiliensis*.

### III.1.2.1.B.3.2.2. Flavonoïdes extraits des feuilles de *M. vulgare* en provenance de Aïn Skhouna

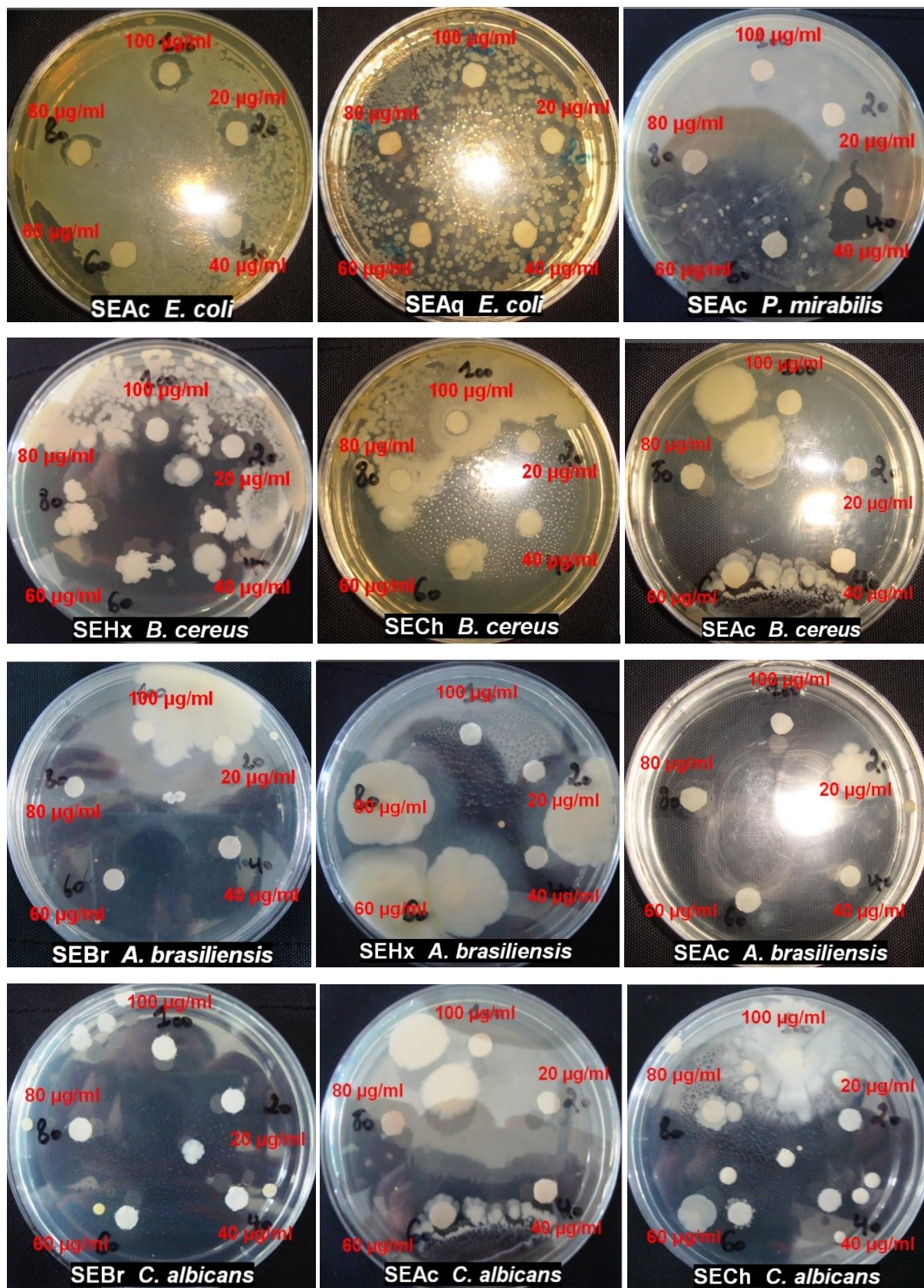
Les résultats des tests de sensibilité des souches microbiennes testées vis-à-vis des extraits flavonoïques extraits des feuilles de *M. vulgare* en provenance de Aïn Skhouna sont regroupés dans le tableau 43 et illustrés par la planche X. Chaque valeur indiquée représente la moyenne de trois mesures (moyenne  $\pm$  écart-type).

**Tableau 43** : Diamètres moyens des zones d'inhibition (en mm) et CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits flavonoïques de Aïn Skhouna

Extraits Flavonoïques	$\mu\text{g/ml}$	Diamètres des zones d'inhibition (en mm), concentrations minimales inhibitrices (en $\mu\text{g/ml}$ ) et sensibilité des souches									
		Bactéries						Champignons			
		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>A. brasiliensis</i>		<i>C. albicans</i>	
		D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
SEBr	100	0	-	0	-	0	-	IT	++	24,45 $\pm$ 1,62	+
	80	0	-	0	-	0	-	IT	++	20,25 $\pm$ 1,06	+
	60	26,98 $\pm$ 1,86	+	0	-	0	-	IT	++	15,5 $\pm$ 2,12	+
	40	0	-	0	-	0	-	IT	++	10,5 $\pm$ 0,7	+
	20	0	-	0	-	0	-	IT	++	8,83 $\pm$ 1,17	$\pm$
			<b>CMI = 50</b>						<b>CMI = 6,25</b>		<b>CMI = 25</b>
SEHx	100	34,3 $\pm$ 1,83	+	0	-	0	-	29,15 $\pm$ 5,86	+	28,36 $\pm$ 2,61	+
	80	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	60	0	-	0	-	0	-	0	-	20,83 $\pm$ 1,65	+
	40	0	-	0	-	0	-	22,3 $\pm$ 2,4	+	8,22 $\pm$ 1,34	$\pm$
	20	22,3 $\pm$ 5,23	+	0	-	0	-	16,5 $\pm$ 2,12	+	0	-
			<b>CMI = 25</b>						<b>CMI = 25</b>		<b>CMI = 50</b>
SECh	100	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	80	0	-	0	-	0	-	0	-	29 $\pm$ 1,41	+
	60	26,5 $\pm$ 2,12	+	0	-	0	-	24 $\pm$ 1,41	+	0	-
	40	20,33 $\pm$ 0,95	+	0	-	0	-	0	-	18,3 $\pm$ 1,83	+
	20	8,66 $\pm$ 0,94	$\pm$	0	-	0	-	8,66 $\pm$ 0,94	$\pm$	0	-
			<b>CMI = 50</b>						<b>CMI = 50</b>		<b>CMI = 50</b>
SEAc	100	33,3 $\pm$ 1,62	+	16,33 $\pm$ 0,94	+	0	-	32 $\pm$ 2,82	+	24,5 $\pm$ 2,12	+
	80	28,65 $\pm$ 0,49	+	0	-	0	-	28 $\pm$ 1,41	+	19,75 $\pm$ 1,76	+
	60	0	-	0	-	0	-	22,25 $\pm$ 1,76	+	0	-
	40	13,5 $\pm$ 2,12	+	11,58 $\pm$ 1,3	+	14,63 $\pm$ 0,35	+	13,83 $\pm$ 1,65	+	16,33 $\pm$ 1,88	+
	20	8,33 $\pm$ 0,94	$\pm$	8,83 $\pm$ 1,17	$\pm$	0	-	0	$\pm$	9,16 $\pm$ 1,18	$\pm$
			<b>CMI = 50</b>			<b>CMI = 50</b>			<b>CMI = 50</b>		<b>CMI = 50</b>
SEAg	100	0	-	17,66 $\pm$ 1,52	+	0	-	29,43 $\pm$ 2,5	+	0	-
	80	0	-	14,66 $\pm$ 0,57	+	0	-	0	-	0	-
	60	0	-	11,5 $\pm$ 0,5	+	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	10,11 $\pm$ 1,16	+	0	-	21,66 $\pm$ 2,08	+	0	-
	20	0	-	9,05 $\pm$ 0,42	$\pm$	0	-	8,83 $\pm$ 2,36	$\pm$	9,05 $\pm$ 1,23	$\pm$
			<b>CMI = 50</b>						<b>CMI = 25</b>		

**S** : Aïn Skhouna ; **EBr** : extrait brut ; **EHx** : extrait hexanique ; **ECh** : extrait chloroformique ; **EAc** : extrait d'acétate d'éthyle ; **EAg** : extrait aqueux ; **IT** : inhibition totale ; **D** : diamètre ; **S** : sensibilité ; **+** : sensible ; **-** : résistante ;  **$\pm$**  : intermédiaire ; **++** : hyper sensible.

Planche X : Photos de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits des feuilles en provenance du mont de Ain Skhouna



Au regard des résultats de l'activité antibactériennes des extraits flavonoïques, nous avons observé que :

- SEAC est celui qui a montré l'activité antibactérienne la plus élevée vis-à-vis de *B. cereus* avec des diamètres de zones d'inhibitions allant de 8,33 mm à 33,3 mm. Sur *E. coli*, il est modérément actif enregistraant des auréoles dont le diamètre est compris entre 8,83 mm et 16,33 mm. À 40 µg/ml, il est le seul extrait flavonoïque ayant inhibé *P. mirabilis* en enregistrant un diamètre d'inhibition de 14,63 mm,
- parmi les extraits flavonoïques testés, SEAc inhibe fortement la croissance de *E. coli* enregistrant des diamètres d'inhibition compris entre 9,05 mm et 17,66 mm. Cependant, il est totalement inactif sur *B. cereus* et *P. mirabilis* qui se sont montrés résistants à toutes ses concentrations,
- SECh manifeste une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de *B. cereus* enregistrant des auréoles dont le diamètre est compris entre 8,66 mm et 26,5 mm. Vis-à-vis de cet extrait, *E. coli* et *P. mirabilis* se sont révélés résistants n'enregistrant aucune zone d'inhibition contre ces deux souches,
- SEBr et SEHx se sont avérés les deux extraits flavonoïques les moins actifs vis-à-vis des souches bactériennes testées. Ces deux extraits sont totalement inactifs sur *E. coli* et *P. mirabilis*. Néanmoins, il est à signaler qu'un seul diamètre d'inhibition de 26,98 mm est noté pour SEBr à 60 µg/ml contre *B. cereus* et deux valeurs d'auréoles de 22,3 mm et 34,3 mm sont enregistrées autour des disques imprégnés de 20 µg/ml et 100 µg/ml de SEHx respectivement,
- une CMI de 50 µg/ml est enregistrée pour SEBr, SECh et SEAc vis-à-vis de *B. cereus*, SEAc et SEAc sur *E. coli*. Une seule CMI de 25 µg/ml est notée chez SEHx contre *B. cereus*.

Contrairement à l'activité antibactérienne, nous avons remarqué que tous les extraits flavonoïques analysés présentent une importante activité antifongique traduite par les diamètres d'inhibitions formés autour des disques :

- en inhibant totalement la croissance de *A. brasiliensis*, SEBr s'est révélé un bon fongistatique. Aussi, il est le seul extrait ayant généré autour de toutes ses concentrations, des diamètres d'inhibition compris entre 8,83 mm et 24,45 mm vis-à-vis de *C. albicans*,
- SEAc présente une bonne activité antifongique sur les deux souches fongiques qui se sont montrées sensibles dans la majorité des tests. En effet, il a produit des diamètres d'inhibition allant de 13,83 mm à 32 mm vis-à-vis de *A. brasiliensis* et des valeurs d'auréoles comprises entre 9,16 et 24,5 mm contre *C. albicans*,

- SEHx est modérément actif produisant des diamètres d'inhibition allant de 16,5 mm à 29,15 mm vis-à-vis de *A. brasiliensis*. Sur *C. albicans*, il a généré la plus forte activité fongistatique enregistrant une auréole maximale de 28,36 mm de diamètre,
- SECh ne présente que deux zones d'inhibition sur chacune des souches fongiques testées. Sur *A. brasiliensis*, il a enregistré deux valeurs d'auréoles de 8,66 mm et 24 mm aux concentrations respectives de 20 µg/ml et 60 µg/ml. Vis-à-vis de *B. cereus*, il est actif à 40 µg/ml et 80 µg/ml donnant ainsi deux zones d'inhibition respectives de 18,3 mm et 29 mm,
- SEaq est l'extrait flavonoïque le moins actif vis-à-vis de *B. cereus* qui s'est montré résistante à la majorité de ses concentrations à l'exception de la concentration 20 µg/ml où cette souche s'est montrée intermédiaire avec une zone d'inhibition de 9,05 mm. A l'opposé, contre *A. brasiliensis*, il induit une inhibition remarquable avec des des auréoles comprises entre 8,83 mm et 29,43 mm,
- en ce qui concerne les concentrations minimales inhibitrices, une seule CMI de 6,25 µg/ml est enregistrée pour SEBr vis-à-vis de *A. brasiliensis*. Une CMI de 25 µg/ml est notée pour SEHx et SEaq contre *A. brasiliensis* et SEBr sur *C. albicans*. La CMI de 50 µg/ml est observée chez SECh et SEAc sur *A. brasiliensis* et SEHx, SECh et SEAc vis-à-vis de *C. albicans*.

### III.1.2.1.B.3.2.3. Flavonoïdes extraits des feuilles de *M. vulgare* en provenance de la forêt domaniale de M'sila

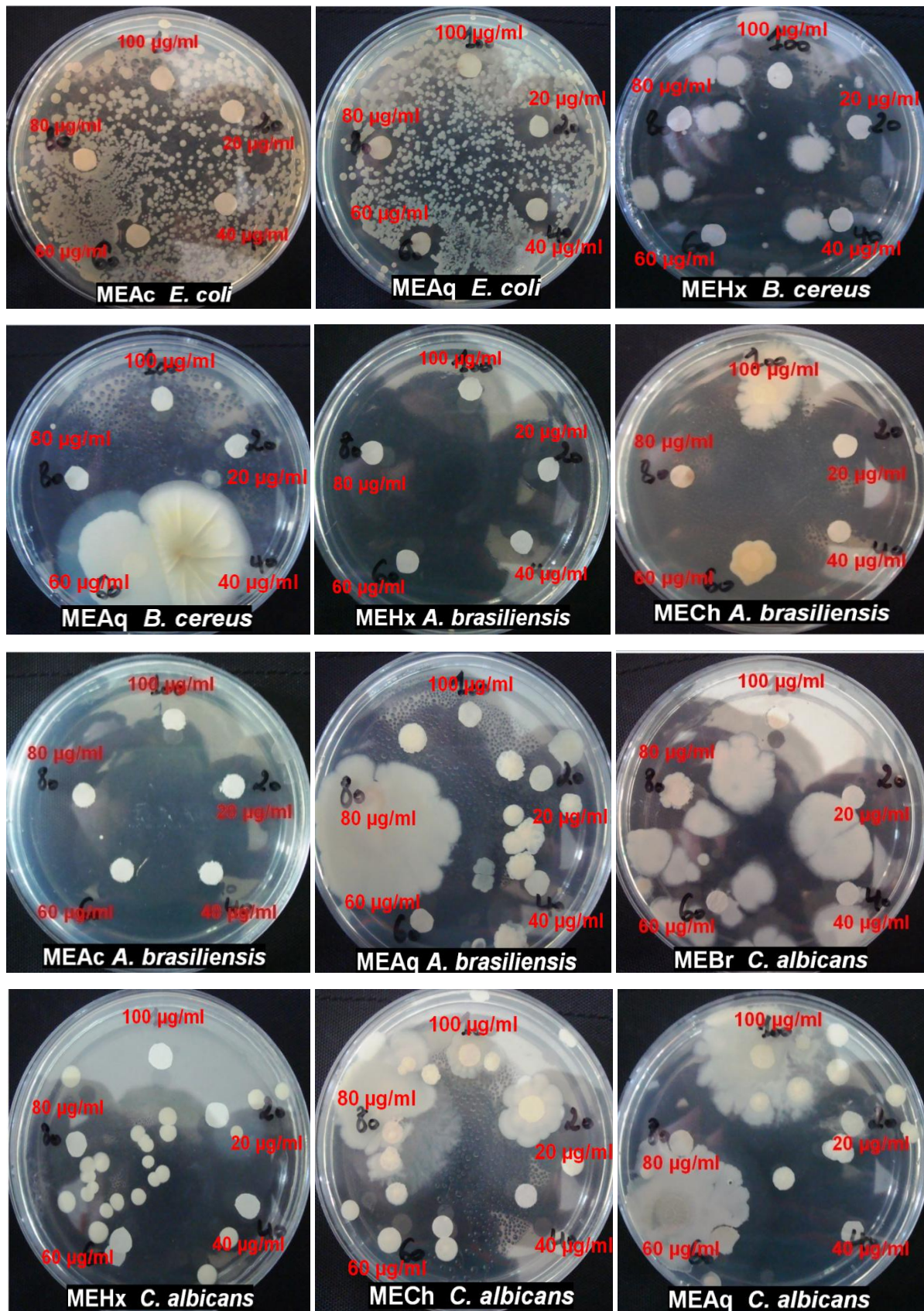
Les diamètres d'inhibition résultants de l'activité antimicrobienne des extraits flavonoïques obtenus à partir des feuilles de *M. vulgare* échantillonnées de la forêt domaniale de M'sila sont résumés dans le tableau 44 et illustrés par la planche XI.

**Tableau 44** : Diamètres moyens des zones d'inhibition (en mm) et CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila

Extraits Flavonoïques	$\mu\text{g/ml}$	Diamètres des zones d'inhibition (en mm), concentrations minimales inhibitrices (en $\mu\text{g/ml}$ ) et sensibilité des souches									
		Bactéries						Champignons			
		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>A. brasiliensis</i>		<i>C. albicans</i>	
		D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
MEBr	100	0	-	0	-	0	-	28,1 $\pm$ 1,01	+	23,05 $\pm$ 1,73	+
	80	25,2 $\pm$ 1,31	+	0	-	0	-	24,5 $\pm$ 1,32	+	15,11 $\pm$ 1,16	+
	60	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
			CMI = 50						CMI = 100		CMI = 100
MEHx	100	27,53 $\pm$ 2,50	+	0	-	0	-	IT	++	28,16 $\pm$ 0,76	+
	80	23,33 $\pm$ 1,52	+	0	-	0	-	IT	++	19,88 $\pm$ 1,17	+
	60	17,66 $\pm$ 1,15	+	0	-	0	-	IT	++	15,10 $\pm$ 1,50	+
	40	13,5 $\pm$ 1,80	+	0	-	0	-	IT	++	11,22 $\pm$ 1,34	+
	20	9,16 $\pm$ 0,76	$\pm$	10,66 $\pm$ 1,52	+	0	-	IT	++	8,38 $\pm$ 1,33	$\pm$
			CMI = 50						CMI = 12,5		CMI = 50
MECh	100	0	-	0	-	0	-	0	-	26,93 $\pm$ 1,40	+
	80	26,10 $\pm$ 1,15	+	0	-	0	-	30,16 $\pm$ 1,60	+	17,72 $\pm$ 1,18	+
	60	19,50 $\pm$ 2,29	+	0	-	0	-	22,26 $\pm$ 1,16	+	0	-
	40	9,22 $\pm$ 0,69	$\pm$	0	-	0	-	16,22 $\pm$ 0,69	+	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	8,5 $\pm$ 1,32	$\pm$	0	-
			CMI = 50						CMI = 25		CMI = 100
MEAc	100	0	-	16,66 $\pm$ 1,52	+	0	-	IT	++	26,22 $\pm$ 1,07	+
	80	24,16 $\pm$ 0,76	+	0	-	0	-	IT	++	0	-
	60	19,55 $\pm$ 1,26	+	0	-	0	-	IT	++	0	-
	40	15,5 $\pm$ 1,50	+	0	-	0	-	IT	++	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	IT	++	15,33 $\pm$ 1,25	+
			CMI = 50		CMI = 100				CMI = 12,5		CMI = 50
MEAq	100	28,33 $\pm$ 2,88	+	18,16 $\pm$ 1,25	+	0	-	23,5 $\pm$ 1,80	+	32,7 $\pm$ 1,66	+
	80	24,83 $\pm$ 2,36	+	14,38 $\pm$ 0,96	+	0	-	18,22 $\pm$ 1,07	+	15,5 $\pm$ 1,32	+
	60	18,22 $\pm$ 1,34	+	11,73 $\pm$ 0,64	+	0	-	14,83 $\pm$ 1,44	+	9,16 $\pm$ 0,76	$\pm$
	40	15,11 $\pm$ 1,01	+	9,16 $\pm$ 0,76	$\pm$	0	-	10,88 $\pm$ 0,83	+	0	-
	20	0	-	7,5 $\pm$ 0,86	$\pm$	0	-	8,16 $\pm$ 0,76	$\pm$	0	-
			CMI = 25		CMI = 50				CMI = 50		CMI = 50

**M** : forêt domaniale de M'sila ; **EBr** : extrait brut ; **EHx** : extrait hénanique ; **ECh** : extrait chloroformique ; **EAc** : extrait d'acétate d'éthyle ; **EAq** : extrait aqueux ; **IT** : inhibition totale ; **D** : diamètre ; **S** : sensibilité ; **+** : sensible ; **-** : résistante ;  **$\pm$**  : intermédiaire ; **++** : hyper sensible.

Planche XI : Photos de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits des feuilles en provenance du mont de la forêt domaniale de M'sila.



Les résultats des tests antibactériens représentés ci-dessus montrent que :

- MEAq est l'extrait flavonoïque qui a présenté le meilleur effet bactériostatique vis-à-vis de *B.cereus* et *E. coli* qui se sont montrés sensibles à la majorité des tests réalisés. En effet, il a enregistré des diamètres d'inhibition allant de 15,11 mm à 28,33 mm (le plus grand diamètre atteint par la souche) sur *B. cereus* et de, 7,5 mm à 18,16 mm (le plus grand diamètre atteint par la souche) sur *E. coli*. En revanche, sur *P. mirabilis*, il est totalement inactif,
- MEHx avec ses différentes concentrations, présente une bonne activité antibactérienne contre *B. cereus*, entraînant la formation d'auréoles comprises entre 9,16 mm et 27,53 mm. Sur *E. coli*, il ne présente qu'un seul diamètre d'inhibition de 10,66 mm à 20 µg/ml. Cet extrait est totalement inactif vis-à-vis de *P. mirabilis*,
- MEAc induit des zones d'inhibition variant entre 15,5 mm et 24,16 mm vis-à-vis *B. cereus*, tandis qu'une seule auréole de 16,66 mm est observée autour du disque à 100 µg/ml. Aucune inhibition n'est enregistrée pour cet extrait contre *P. mirabilis*,
- MECh enregistre une activité moyenne vis-à-vis de *B. cereus* donnant ainsi des zones d'inhibition comprises entre 9,22 mm et 26,1 mm. Cet extrait ne présente aucun effet bactériostatique contre *E. coli* et *P. mirabilis*,
- MEBr s'est montré l'extrait flavonoïque le moins actif vis-à-vis des souches bactériennes testées. Ces dernières se sont avérées résistantes dans la majorité des tests effectués. Néanmoins, une seule zone d'inhibition de 25,2 mm est notée sur *B. cereus* autour du disque imprégné par 80 µg/ml,
- la majorité des concentrations minimales inhibitrices sont estimées à 50 µg/ml, c'est le cas de MEBr, MEHx, MECh et MEAc vis-à-vis de *B. cereus* et MEAq sur *E. coli*. Une seule CMI de 25 µg/ml est notée pour MEAq contre *B. cereus*,

En ce qui concerne l'activité antifongique, il ressort ce qui suit :

- MEHx est l'extrait le plus actif vis-à-vis des deux souches fongiques testées. En effet, il inhibe complètement la croissance de *A. brasiliensis*. Sur *C. albicans*, il a engendré au niveau de toutes ses concentrations des diamètres d'inhibition variant entre 8,38 mm et 28,16 mm,
- MEAq a été remarquablement efficace sur *A. brasiliensis* enregistrant des auréoles comprises entre 8,16 mm et 23,5 mm. A la concentration de 100 µg/ml, il est l'extrait qui a démontré la plus forte inhibition sur *C. albicans* provoquant l'établissement d'une zone d'inhibition estimée à 32,7 mm,
- MEAc a provoqué une inhibition totale de la croissance de *A. brasiliensis*. En revanche, il a été modérément actif vis-à-vis de *C. albicans* qui s'est montré résistant à la plupart des tests. Néanmoins, sur cette souche, deux zones d'inhibition

respectives de 15,33 mm et 15,22 mm sont enregistrées aux concentrations 20 µg/ml et 100 µg/ml vis-à-vis de *E. coli*,

- MECh a engendré des auréoles allant de 8,5 mm à 30,16 mm sur *A. brasiliensis* qualifiant cette dernière de sensible à la majorité des concentrations de cet extrait. A l'inverse, il est beaucoup moins actif vis-à-vis de *C. albicans* qui s'est montré résistant dans la plupart des tests, n'enregistrant que deux zones d'inhibition respectives de 17,72 mm et 26,93 mm aux concentrations 80 µg/ml et 100 µg/ml,
- les plus faibles activités fongistatiques sont enregistrées chez MEBr. Sur chacune des souches fongiques testées, deux zones d'inhibition sont enregistrées à 80 µg/ml et 100 µg/ml respectivement : 24,5 mm et 28,1 mm sur *A. brasiliensis*, 15,11 mm et 23,05 mm sur *C. albicans*.
- une concentration minimale inhibitrice de 100 µg/ml est enregistrée avec MECh sur *C. albicans* et MEBr vis-à-vis de *A. brasiliensis* et *C. albicans*. La CMI de 50 µg/ml est notée chez MEAq sur *A. brasiliensis*, MEHx, MEAc et MEAq contre *C. albicans*. La CMI de 12,5 µg/ml est observée pour MEHx et MEAc sur *A. brasiliensis*.

#### III.1.2.1.B.3.2.4. Analyse de la variance (ANOVA)

Les résultats des analyses de la variance à plusieurs critères de classification sont regroupés dans le Tableau 45.

**Tableau 45** : Analyses de la variance à plusieurs critères de classification : effet de l'extrait flavonoïque, du type de la souche microbienne et la localité d'échantillonnage sur le pouvoir antimicrobien.

Source	DDL	SC	CM	F	p > F
Type d'extrait flavonoïque	4	1602,72	400,68	7,72	< 0,0001***
Concentration de l'extrait flavonoïque	4	3842,43	960,61	18,50	< 0,0001***
Souche microbienne	4	23932,05	5983,01	115,26	< 0,0001***
Localité d'échantillonnage	2	654,89	327,45	6,31	= 0,002***
Concentration*Extrait	16	1294,72	80,92	1,56	= 0,009***
Concentration*Souche	16	1504,04	94,00	1,81	= 0,036*
Concentration*Localité	8	1001,86	125,23	2,41	= 0,019*
Extrait*Souche	16	3196,18	199,76	3,85	< 0,0001***
Extrait*Localité	8	4274,87	534,36	10,29	< 0,0001***
Souche*Localité	8	824,14	103,02	1,98	= 0,044*
Extrait*Concentration*Souche	64	4595,80	71,81	1,38	= 0,032*
Concentration*Souche*Localité	32	2526,08	78,94	1,52	= 0,024*
Extrait*Souche*Localité	32	13962,34	436,32	8,41	< 0,0001***
Extrait*Concentration*Localité	32	1995,36	62,35	1,20	= 0,036*

DDL : degré de liberté ; SC : somme des carrés ; CM : carrés moyens ; F : Fisher ; p : probabilité

Les résultats mentionnés ci-dessus montrent que les paramètres testés et leurs combinaisons à deux et à trois critères de classification présentent des différences :

- très hautement significatives ( $***p < 0,001$ ) : type d'extrait flavonoïque, concentration de l'extrait flavonoïque, souche microbienne, localité d'échantillonnage, concentration\*extrait, extrait\*souche, extrait\*localité et extrait\*souche\*localité,
- significatives ( $*p \leq 0,05$ ) : concentration\*souche, concentration\*localité, souche\*localité, extrait\*concentration\*souche, concentration\*souche\*localité et extrait\*concentration\*localité.

#### **III.1.2.1.B.3.2.5. Catégorisation des souches microbiennes et des extraits flavonoïques**

Dans un but de comparer les effets des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage, ces derniers sont classés selon leurs effets antimicrobiens. De même, les souches bactériennes et fongiques testées sont réparties selon leurs sensibilités. Ces résultats sont exprimés en pourcentages (Tab. 46).

La catégorisation des différents extraits flavonoïques extraits des trois localités selon leurs effets antimicrobiens est comme suit :

- pour les extraits flavonoïques du mont de Tessala, TEAc est l'extrait le plus actif avec 46,66 % des tests sensibles chez les souches bactériennes testées, suivi respectivement par TEBr (40 %), TECh et TEAq (33,33 % chacun) et TEHx (26,66 %). Vis-à-vis des souches fongiques, TEAc provoque le taux le plus élevé des tests sensibles (80 %), suivi respectivement par TEAq (70 %), TEBr, TEHx et TECh (50 % chacun),
- pour les extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila, le pourcentage le plus élevé des tests sensibles contre les souches bactériennes est engendré par MEAq (46,66 %), suivi par MEHx, MEAc, MECh et MEBr avec des taux respectifs de 33,33 %, 26,66 %, 13,33 % et 6,66 %. En ce qui concerne l'activité antifongique, MEHx est l'extrait qui présente le pourcentage le plus élevé de tests sensibles (90 %), suivi par MEAc, MEAq, MECh et MEBr avec des pourcentages respectifs de 70 %, 60 %, 50 % et 40 %,
- en ce qui concerne les extraits flavonoïques de Aïn Skhouna, SEAc est l'extrait le plus actif enregistrant un taux de 40 % de tests antibactériens sensibles, suivi par SEAq (26,66 %), SECh et SEHx (13,33 % chacun) et SEBr (6,66 %). Pour l'activité fongistatique, SEBr a provoqué le taux le plus élevé de tests sensibles avec 90 % des tests, suivi par SEAc, SEHx, SECh et SEAq avec des pourcentages respectifs de 70 %, 50 %, 30 % et 20 % des tests.

**Tableau 46** : Classement des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités.

Type de test et de souche	Localité d'échantillonnage	Extraits flavonoïques	Sensibilité							
			Résistante (-)		Intermédiaire (±)		Sensible (+)		Totaux	
			N	%	N	%	N	%	N	%
Test Antibactérien	Mont de Tessala	TEBr	8	53,33	1	6,66	6	40	15	100
		TEHx	10	66,66	1	6,66	4	26,66	15	100
		TECh	9	60	1	6,66	5	33,33	15	100
		TEAc	7	46,66	1	6,66	7	46,66	15	100
		TEAq	8	53,33	2	13,33	5	33,33	15	100
	Forêt domaniale de M'sila	MEBr	14	93,33	0	0	1	6,66	15	100
		MEHx	9	60	1	6,66	5	33,33	15	100
		MECh	12	80	1	6,66	2	13,33	15	100
		MEAc	11	73,33	0	0	4	26,66	15	100
		MEAq	6	40	2	13,33	7	46,66	15	100
	Aïn Skhouna	SEBr	14	93,33	0	0	1	6,66	15	100
		SEHx	13	86,66	0	0	2	13,33	15	100
		SECh	12	80	1	6,66	2	13,33	15	100
		SEAc	7	46,66	2	13,33	6	40	15	100
		SEAq	10	66,66	1	6,66	4	26,66	15	100
Test Antifongique	Mont de Tessala	TEBr	4	40	1	10	5	50	10	100
		TEHx	3	30	2	20	5	50	10	100
		TECh	4	40	1	10	5	50	10	100
		TEAc	0	0	2	20	8	80	10	100
		TEAq	2	20	1	10	7	70	10	100
	Forêt domaniale de M'sila	MEBr	6	60	0	0	4	40	10	100
		MEHx	0	0	1	10	9	90	10	100
		MECh	4	40	1	10	5	50	10	100
		MEAc	3	30	0	0	7	70	10	100
		MEAq	2	20	2	20	6	60	10	100
	Aïn Skhouna	SEBr	0	0	1	10	9	90	10	100
		SEHx	4	40	1	10	5	50	10	100
		SECh	6	60	1	10	3	30	10	100
		SEAc	1	10	2	20	7	70	10	100
		SEAq	6	60	2	20	2	20	10	100
Bactéries	Mont de Tessala	<i>B. cereus</i>	5	20	5	20	15	60	25	100
		<i>E. coli</i>	18	72	0	0	7	28	25	100
		<i>P. mirabilis</i>	19	76	1	4	5	20	25	100
	Forêt domaniale de M'sila	<i>B. cereus</i>	9	36	2	8	14	56	25	100
		<i>E. coli</i>	18	72	2	8	5	20	25	100
		<i>P. mirabilis</i>	25	100	0	0	0	0	25	100
	Aïn Skhouna	<i>B. cereus</i>	15	60	2	8	8	32	25	100
		<i>E. coli</i>	17	68	2	8	6	24	25	100
		<i>P. mirabilis</i>	24	96	0	0	1	4	25	100
Champignons	Mont de Tessala	<i>A. brasiliensis</i>	3	12	4	16	18	72	25	100
		<i>C. albicans</i>	10	40	3	12	12	48	25	100
	Forêt domaniale de M'sila	<i>A. brasiliensis</i>	4	16	2	8	19	76	25	100
		<i>C. albicans</i>	11	44	2	8	12	48	25	100
	Aïn Skhouna	<i>A. brasiliensis</i>	7	28	3	12	15	60	25	100
		<i>C. albicans</i>	10	40	4	16	11	44	25	100

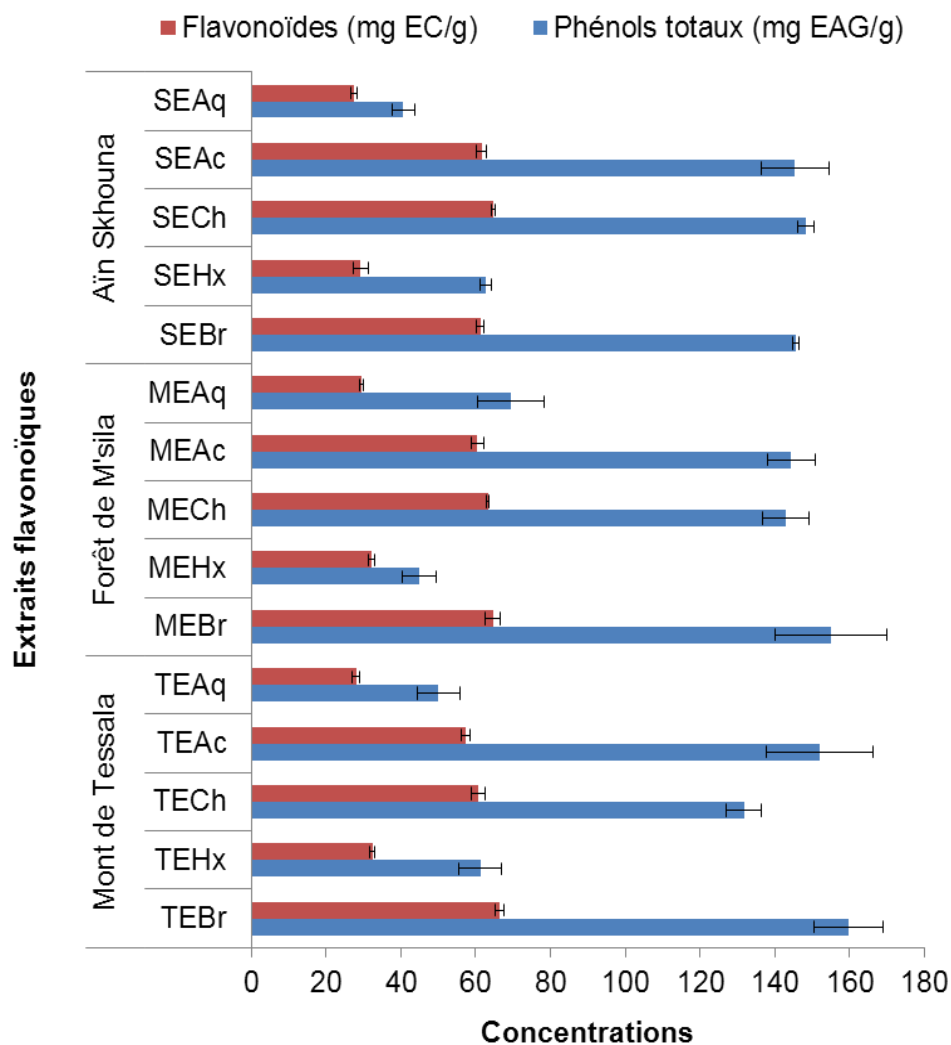
De la catégorisation des souches microbiennes testées en fonction de leurs sensibilités, il découle ce qui suit :

- chez les extraits flavonoïques du mont de Tessala, *B. cereus* est la bactérie la plus sensible avec 60 % des tests, suivie respectivement par *E. coli* et *P. mirabilis* avec des taux de sensibilités respectifs de 28 % et 20 % des tests. Chez les souches fongiques, *A. brasiliensis* est la plus sensible avec un pourcentage de 72 % des tests suivi par *C. albicans* avec 48 % des tests,
- pour les extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila, *B. cereus* est la bactérie qui a présenté le pourcentage le plus élevé de tests sensibles avec 56 % des tests, suivi par *E. coli* (20 %) et *P. mirabilis* qui a été totalement résistante avec un taux nul de tests sensibles. Pour les espèces fongiques, *A. brasiliensis* s'est montrée la plus sensible avec 76 % des tests suivie par *C. albicans* enregistrant un taux de sensibilité de 48 %,
- en ce qui concerne les extraits flavonoïques de Aïn skhouna, *B. cereus* avec un taux de sensibilité de 32 % est la souche bactérienne la plus sensible, suivie respectivement par *E. coli* et *P. mirabilis* avec respectivement 24 % et 4 % de tests sensibles. Vis-à-vis des souches fongiques, *A. brasiliensis* est la plus sensible avec un taux de 60 % des tests, suivi par *C. albicans* qui a été sensible avec un pourcentage de 44 % des tests.

## III.1.2.2. Activités antioxydantes

## III.1.2.2.A. Quantifications des phénols totaux et des flavonoïdes

Les concentrations moyennes relatives aux phénols totaux et en flavonoïdes des extraits flavonoïques des feuilles de *M. vulgare* des trois localités d'échantillonnage sont représentées par la figure 28.



**Figure 28** : Concentrations moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits flavonoïques

La figure ci-dessus montre que :

- pour les extraits flavonoïques du mont de Tessala, TEBr est le mieux représenté en phénols totaux avec une concentration moyenne de  $159,81 \pm 9,17$  mg EAG/g, suivi par TEAc, TECh, TEHx et TEAq avec des concentrations moyennes respectives de  $152,07 \pm 14,28$  mg EAG/g,  $131,72 \pm 4,74$  mg EAG/g,  $61,24 \pm 5,62$  mg EAG/g et  $50,09 \pm 5,61$  mg EAG/g. TEBr est le mieux représenté en flavonoïdes avec une

concentration moyenne de  $66,34 \pm 1,25$  mg EC/g, suivi respectivement par TECh, TEAc, TEHx et TEAq avec  $60,74 \pm 1,85$  mg EC/g,  $57,32 \pm 1,27$  mg EC/g,  $32,47 \pm 0,65$  mg EC/g et  $27,98 \pm 0,99$  mg EC/g ;

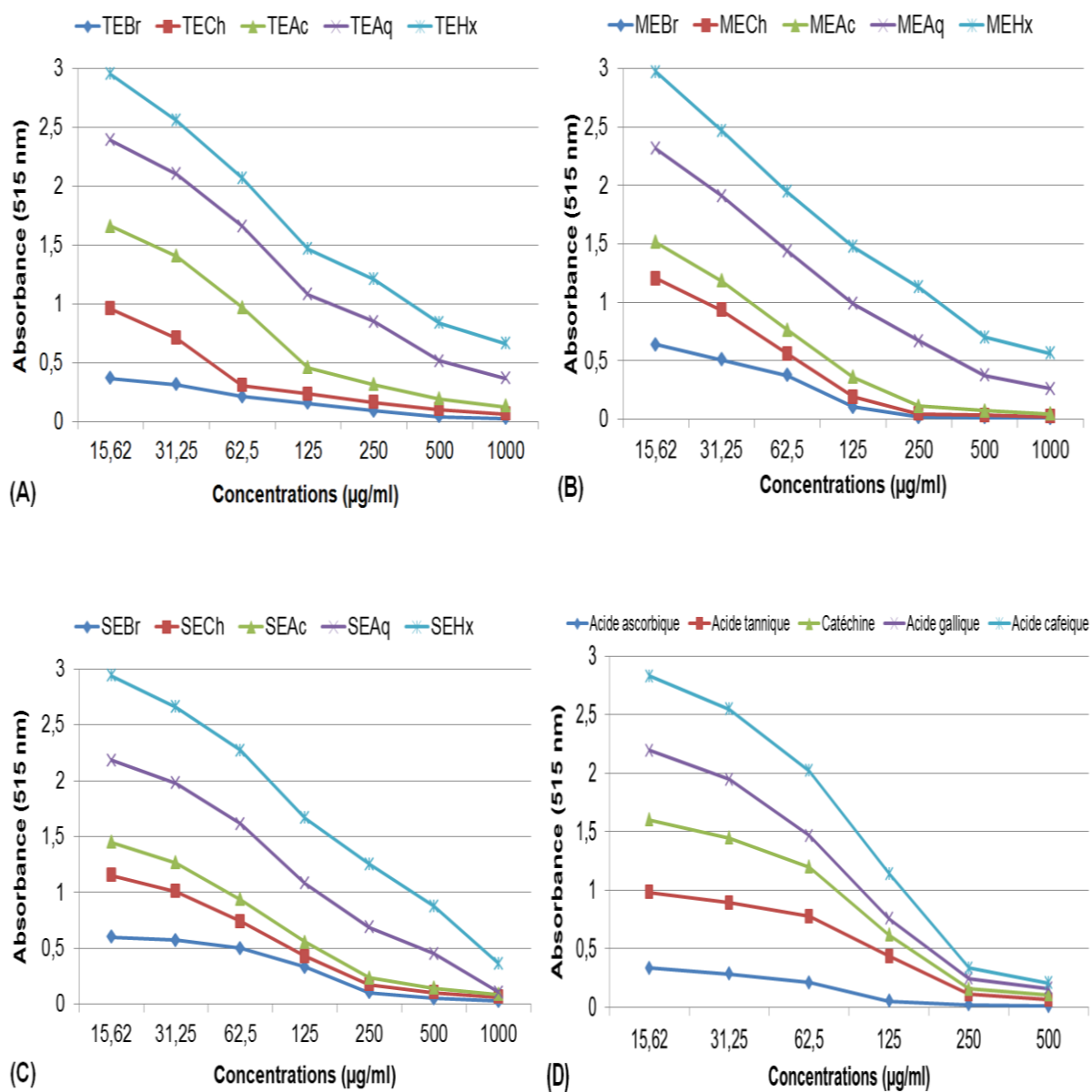
- Parmi les extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila, MEBr est l'extrait flavonoïque qui a enregistré les concentrations moyennes les plus élevées en phénols totaux avec  $155,09 \pm 14,88$  mg EAG/g, suivi respectivement par MEAc, MECh, MEAq et MEHx avec  $144,46 \pm 6,53$  mg EAG/g,  $142,91 \pm 6,15$  mg EAG/g,  $69,57 \pm 8,91$  mg EAG/g et  $44,93 \pm 4,48$  mg EAG/g. MEBr est l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec une concentration moyenne de  $64,65 \pm 1,97$  mg EC/g, suivi par MECh, MEAc, MEHx et MEAq avec des concentrations respectives de  $63,27 \pm 0,23$  mg EC/g,  $60,48 \pm 1,74$  mg EC/g,  $32,12 \pm 0,77$  mg EC/g et  $29,53 \pm 0,44$  mg EC/g ;
- en ce qui concerne les extraits flavonoïques de Aïn Skhouna, SECh est l'extrait flavonoïque le mieux caractérisé en phénols totaux avec une concentration moyenne de  $148,34 \pm 2,19$  mg EAG/g suivi respectivement par SEBr, SEAc, SEHx et SEAq avec  $145,73 \pm 0,81$  mg EAG/g,  $145,33 \pm 9,04$  mg EAG/g,  $62,67 \pm 1,50$  mg EAG/g et  $40,69 \pm 3,14$  mg EAG/g. SECh est l'extrait le mieux représenté en flavonoïdes avec une concentration moyenne de  $64,86 \pm 0,48$  mg EC/g suivi par SEAc, SEBr, SEHx et SEAq avec des concentrations respectives de  $61,57 \pm 1,26$  mg EC/g,  $61,20 \pm 0,23$  mg EC/g,  $29,21 \pm 2,03$  mg EC/g et  $27,45 \pm 0,88$  mg EC/g.

#### III.1.2.2.B. Test de réduction et pourcentages d'inhibition du radical stable (DPPH)

L'activité antioxydante des extraits flavonoïques des feuilles de *M. vulgare* prélevées des trois localités d'échantillonnage ainsi que des standards phénoliques vis-à-vis du radical libre DPPH a été évaluée spectrophotométriquement. L'absorbance du DPPH mesurée à 515 nm montre pour tous les extraits flavonoïques et les standards testés une chute libre rapide de cette dernière en fonction de l'augmentation de la concentration (Fig. 29).

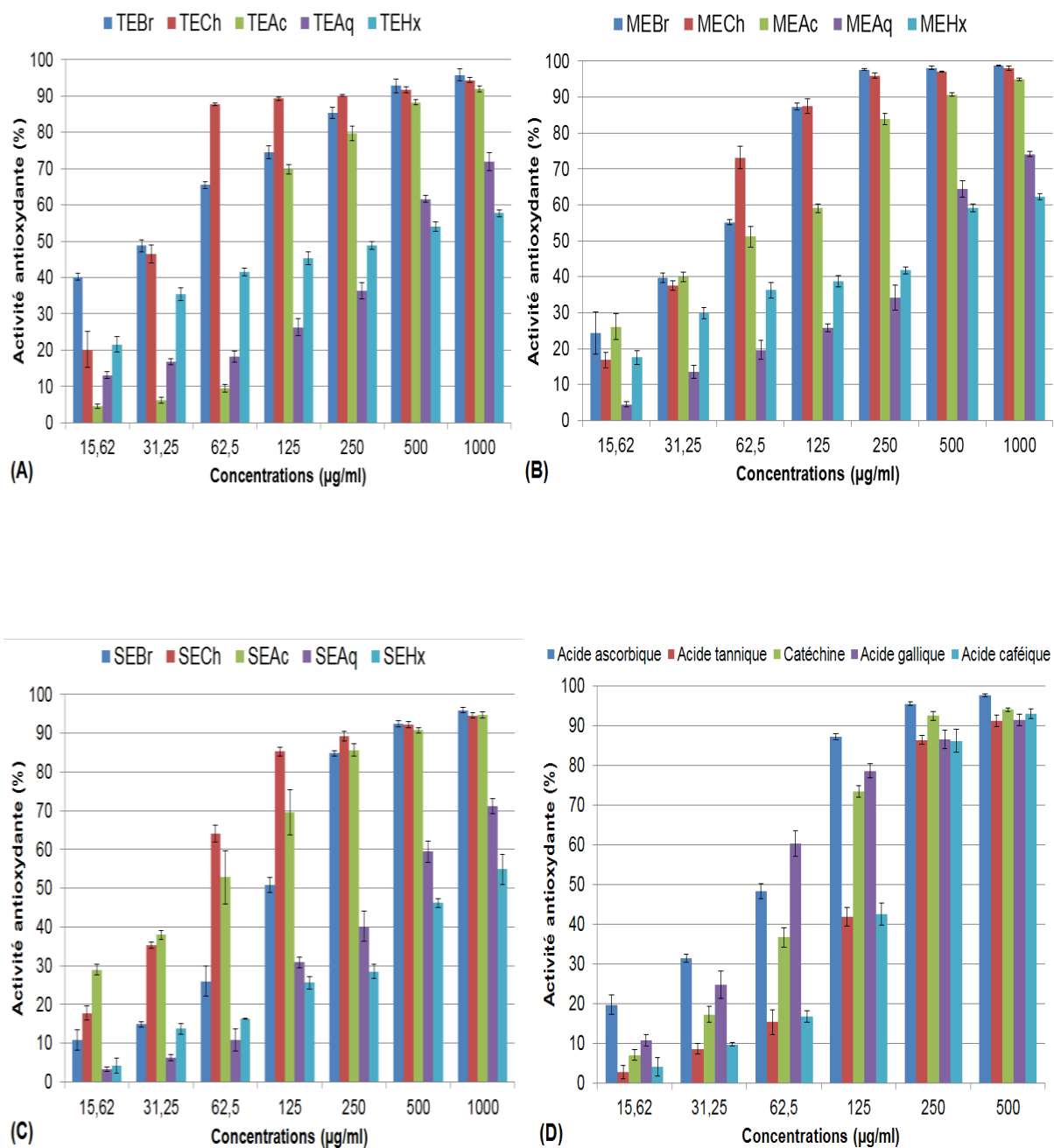
Les pourcentages d'inhibition du radical stable (DPPH) enregistrés par les différents extraits flavonoïques et les standards phénoliques sont portés par la figure 30. La lecture de ces résultats montre que l'effet antiradicalaire des extraits flavonoïques et des standards phénoliques est dose-dépendant. En effet, quel que soit l'extrait flavonoïque ou le standard phénolique testé, les pourcentages d'inhibitions du radical stable (DPPH) augmentent toujours avec l'augmentation des concentrations. Les pourcentages d'inhibition les plus élevés sont obtenus avec les plus fortes concentrations (1000 µg/ml pour les extraits et 500 µg/ml pour les standards phénoliques) :

- pour les extraits flavonoïques du mont de Tessala : TEBr ( $95,74 \pm 1,65$  %), TEHx ( $57,64 \pm 0,90$  %), TECH ( $94,38 \pm 0,74$  %), TEAc ( $91,68 \pm 0,84$  %) et TEAq ( $71,85 \pm 2,5$  %),
- pour les extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila : MEBr ( $98,81 \pm 0,11$  %), MEHx ( $62,30 \pm 0,80$  %), MECh ( $97,99 \pm 0,61$  %), MEAc ( $94,87 \pm 0,36$  %) et MEAq ( $74,10 \pm 0,77$  %),
- pour les extraits flavonoïques de Aïn Skhouna : SEBr ( $95,94 \pm 0,66$  %), SEHx ( $54,83 \pm 3,92$  %), SECh ( $94,55 \pm 0,76$  %), SEAc ( $94,71 \pm 0,86$  %) et SEAq ( $71,10 \pm 1,92$  %),
- pour les standards phénoliques : acide ascorbique ( $97,75 \pm 0,36$  %), acide tannique ( $91,29 \pm 1,43$  %), catéchine ( $94,09 \pm 0,37$  %), acide gallique ( $91,54 \pm 1,44$  %) et acide caféique ( $93,04 \pm 1,14$  %)



**Figure 29 :** Absorbance (à 515 nm) des standards phénoliques et des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage.

**(A) :** extraits flavonoïques du mont de Tessala ; **(B) :** extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila ; **(C) :** extraits flavonoïques de Ain Skhouna ; **(D) :** standards phénoliques.

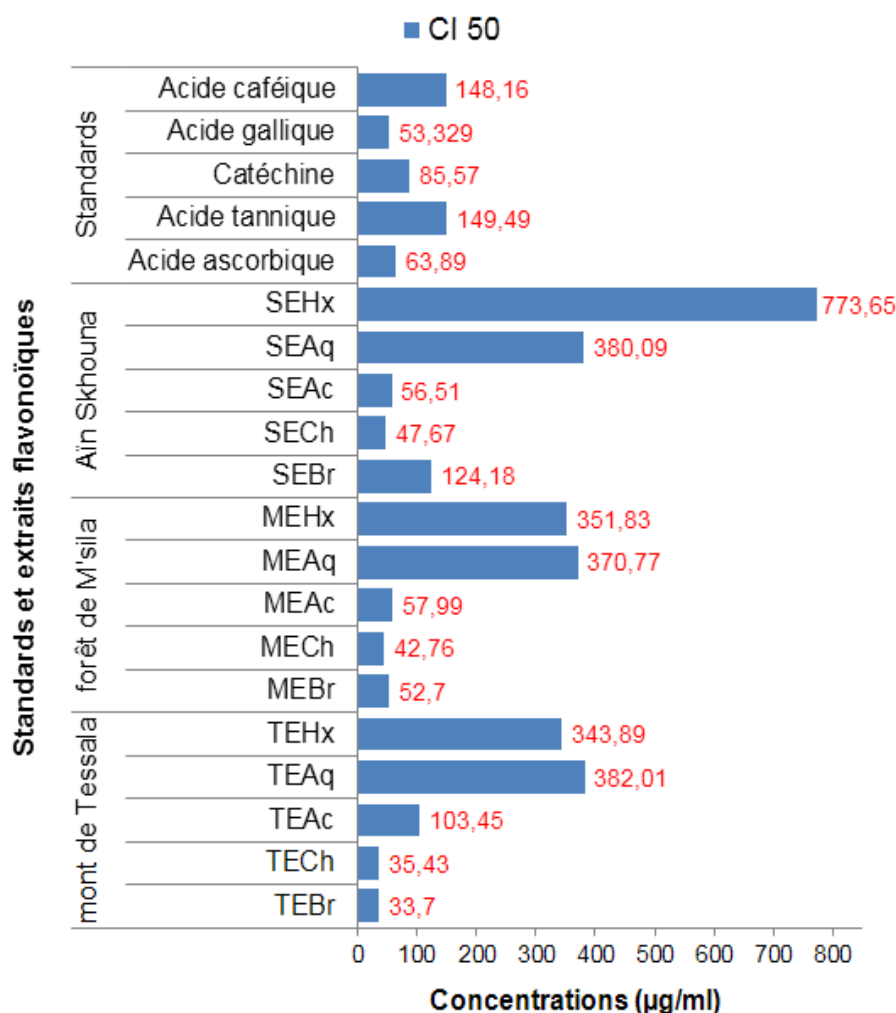


**Figure 30 :** Activité antioxydante (en %) des standards phénoliques et des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage.

**(A) :** extraits flavonoïques du mont de Tessala ; **(B) :** extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila ; **(C) :** extraits flavonoïques de Ain Skhouna ; **(D) :** standards phénoliques.

### III.1.2.2.C. Concentrations minimales inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>)

L'activité antiradicalaire des extraits flavonoïques et des standards phénoliques évaluée par le test DPPH est exprimé par les minimales inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>). La CI<sub>50</sub> est inversement liée à la capacité antioxydante de l'extrait testé, car elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur de la CI<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante est grande. Ces résultats sont regroupés dans la figure 31.



**Figure 31** : Concentrations minimales inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>) des standards phénoliques et des extraits flavonoïques des trois localités d'échantillonnage.

Les résultats mentionnés ci-dessus montrent que les concentrations minimales inhibitrices 50 varient en fonction de l'extrait flavonoïque testé et de la localité d'échantillonnage. Les valeurs des CI<sub>50</sub> sont de :

- pour les extraits flavonoïques du mont de Tessala : TEBr (33,7 µg/ml), TEHx (334,89 µg/ml), TECH (35,43 µg/ml), TEAc (103,45 µg/ml) et TEAg (382,01 µg/ml),

- pour les extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila : MEBr (52,7 µg/ml), MEHx (351,83 µg/ml), MECh (42,76 µg/ml), MEAc (57,99 µg/ml) et MEAq (370,77 µg/ml),
- pour les extraits flavonoïques de Aïn Skhouna : SEBr (124,18 µg/ml), SEHx (773,65 µg/ml), SECh (47,67 µg/ml), SEAc (56,51 µg/ml) et SEAq (380,09 µg/ml),
- pour les standards phénoliques : acide ascorbique (63,89 µg/ml), acide tannique (149,49 µg/ml), catéchine (85,57 µg/ml), acide gallique (53,32 µg/ml) et acide caféique (148,16 µg/ml).

#### III.1.2.2.D. Analyse de la variance (ANOVA)

Les résultats des analyses de la variance à plusieurs critères de classification sont regroupés dans le Tableau 47. Ces résultats montrent que les paramètres testés ainsi que leurs combinaisons à deux et à trois critères de classification ont un effet très hautement significatif ( $p < 0,0001^{***}$ ) sur les pourcentages d'inhibition du radical stable (DPPH).

**Tableau 47** : Analyses de la variance à plusieurs critères de classification : effet de l'extrait flavonoïque et de la localité d'échantillonnage sur l'activité antioxydante.

Source	DDL	SC	CM	F	$p > F$
Type d'extrait flavonoïque	4	74790,7	18697,7	4663,29	< 0,0001 <sup>***</sup>
Concentration de l'extrait flavonoïque	6	174214,0	29035,7	7241,64	< 0,0001 <sup>***</sup>
Localité d'échantillonnage	2	2948,0	1474,0	367,63	< 0,0001 <sup>***</sup>
Concentration*Extrait	24	22003,1	916,8	228,65	< 0,0001 <sup>***</sup>
Concentration*Localité	12	1052,1	87,7	21,87	< 0,0001 <sup>***</sup>
Extrait*Localité	8	8447,5	1055,9	263,36	< 0,0001 <sup>***</sup>
Extrait*Concentration*Localité	48	8587,9	178,9	44,62	< 0,0001 <sup>***</sup>

**DDL** : degré de liberté ; **SC** : somme des carrés ; **CM** : carrés moyens ; **F** : Fisher ; **p** : probabilité

## III.2. Discussion

### III.2.1. Étude quantitative et qualitative des composés phénoliques

#### III.2.1.1. Étude quantitative des composés phénoliques

##### III.2.1.1.A. Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles

###### III.2.1.1.A.1. Effet de la nature du solvant organique

Les solvants alcooliques aqueux notamment l'acétone, l'éthanol et le méthanol sont les plus couramment utilisés dans l'extraction des composés phénoliques à partir des espèces végétales (Naczki et Shahidi, 2004).

Les résultats obtenus montrent que le méthanol ( $137,79 \pm 54,62$  mg EAG/g) enregistre les plus fortes concentrations en phénols totaux dans les feuilles de *M. vulgare* comparé aux autres solvants organiques enregistrant une différence très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ). Le même solvant s'est avéré également idéal pour l'extraction des phénols totaux chez les fruits de la noix verte (Jakopic *et al.*, 2009), les feuilles de *Zingiber officinalis* (Ghasemzadeh *et al.*, 2011), de *Tamarix aphylla* L. (Mohammedi et Atik, 2011) et de *Artemisia annua* L. (Iqbal *et al.*, 2012). Nombreux auteurs ont mis en évidence l'influence de la polarité du solvant organique sur la teneur en phénols totaux (Lapornik *et al.*, 2005 ; Turkmen *et al.*, 2006). Mohammedi et Atik (2011) ont démontré que c'est la polarité élevée du méthanol (estimée à 6,6) par rapport aux autres solvants, qui permet une bonne solubilité des polyphénols qui est à l'origine des fortes teneurs en phénols totaux. Par contre, chez les fruits de *Pouteria campechiana*, les extraits éthanoliques possèdent de 23 % à 45 % plus de phénols totaux par rapport aux extraits méthanoliques et aqueux (Kong *et al.*, 2013).

Le méthanol ( $35,64 \pm 14,61$  mg EC/g) a permis aussi d'extraire la concentration la plus élevée en flavonoïdes chez les feuilles de *M. vulgare*. Aussi, une différence très hautement significative a été notée entre les différents solvants testés ( $***p < 0,0001$ ). Nos résultats sont comparables à ceux de Sultana *et al.* (2009) chez les feuilles de *Moringa oleifera* et *Aloe barbadensis*, et de Ben Mohammed Maoulainine *et al.* (2012) chez les feuilles, les fleurs et les tiges de *Euphorbia helioscopia*. Chez quelques espèces médicinales Thaïlandaises, l'eau s'est avérée le solvant idéale pour l'extraction des flavonoïdes (Settharaksa *et al.*, 2012). Plusieurs travaux ont mis en évidence l'influence du type du solvant d'extraction sur la concentration en flavonoïdes. Dans ce contexte, Ghasemzadeh *et al.* (2011) ont confirmé sur les feuilles de *Zingiber officinale* que les teneurs en flavonoïdes obtenues par le méthanol sont trois fois supérieures à celles obtenues par l'acétone et quatre fois plus que celles enregistrées par l'hexane. Spigno *et al.* (2007) ont suggéré que les teneurs élevées en flavonoïdes obtenues par le méthanol sont expliquées par le fait que ce dernier permet une très bonne solubilité des groupements hydroxyles des flavonoïdes.

Une concentration maximale en tanins condensés ( $17,24 \pm 4,77$  mg EC/g) est enregistrée avec l'acétone comme solvant. Cette concentration est nettement supérieure à celles soutirées par les autres solvants utilisés ( $***p < 0,0001$ ). Ceci est prouvé chez les feuilles de *Limoniastrum monopetalum* (Trabelsi *et al.*, 2010), l'écorce de *Acacia mangium* (Wina *et al.*, 2010) et les racines de *Onosma dichroanthum* (Mazandarani *et al.*, 2012). Selon Antwi-Boasiako et Animapauh (2012), les quatre solvants testés dans notre travail et particulièrement l'acétone et le méthanol sont les meilleurs solvants d'extraction des tanins condensés. Uma *et al.* (2010) ont justifié l'efficacité de l'acétone à extraire les tanins condensés par son poids moléculaire qui est relativement élevé par rapport aux autres solvants.

#### III.2.1.1.A.2. Effet de la concentration du solvant organique

Des mélanges d'alcools avec différentes proportions d'eau sont souvent utilisés dans les protocoles d'extraction des composés phénoliques (Garcia-Salas *et al.*, 2010). En effet, l'addition de petites quantités d'eau au solvant organique conduit généralement à un milieu plus polaire, ce qui facilite l'extraction de ces métabolites secondaires (Spigno *et al.*, 2007).

Il est observé que les concentrations moyennes en phénols totaux atteignent le maximum ( $168,41 \pm 70,60$  mg EAG/g) avec le méthanol à 60 %. Une différence très hautement significative est notée entre les différentes concentrations utilisées ( $***p < 0,0001$ ). Cette constatation a été vérifiée dans les travaux de Chan *et al.* (2009) sur l'écorce de *Citrus hystrix* et de Chew *et al.* (2011a) sur les feuilles de *Centella asiatica*. Les travaux de Nepote *et al.* (2005) et Chan *et al.* (2009) ont fait ressortir que plus le solvant d'extraction est concentré, plus la séparation des phénols totaux est faible d'où l'utilisation des extraits hydro-alcooliques dans la majorité des protocoles d'extraction. En outre, Yilmaz et Toledo (2005) montrent chez les graines de raisin que les solutions aqueuses du méthanol, d'éthanol et d'acétone présentent des teneurs en phénols totaux nettement plus élevées par rapport à celles contenues dans les solvants purs.

La concentration maximale en flavonoïdes ( $42,40 \pm 16,22$  mg EC/g) est obtenue sur les feuilles de *M. vulgare* avec le méthanol 60 %. Une différence très hautement significative est enregistrée entre les différentes concentrations testées ( $***p < 0,0001$ ). Par contre, le méthanol 80 % est la concentration idéale pour les fleurs de *Calendula officinalis* (Butnariu et Coradini, 2012) et l'éthanol 80 % pour les feuilles de quelques plantes médicinales : *Limoniastrum monopetalum* (Trabelsi *et al.*, 2010), *Bauhinia monandra* (Fernandes *et al.*, 2012) et *Callicarpa nudiflora* (Liao *et al.*, 2012). Musa *et al.* (2011) ont confirmé que la combinaison des solvants aqueux (eau distillée) et organiques (méthanol et éthanol) améliore le rendement en flavonoïdes par rapport à l'eau ou le solvant organique utilisés séparément.

60 % d'acétone a permis d'extraire la concentration la plus élevée en tanins condensés ( $17,68 \pm 5,69$  mg EC/g). Cette concentration est nettement supérieure par rapport aux autres

concentrations testés enregistrant une différence très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ). Nos résultats rejoignent ceux de Downey et Hanlin (2010) chez la peau de raisin. Dans certains travaux, il est noté que l'acétone 80 % est la concentration d'extraction idéale chez les jeunes pousses de *Limonium densiflorum* (Medini *et al.*, 2011), le méthanol 60 % chez les feuilles, les tiges, les racines et les graines de *Cichorium intybus* L. (Shad *et al.*, 2012), et l'éthanol 80 % pour *Castanea mollissima* (Zhao *et al.*, 2012).

#### III.2.1.1.A.3. Effet du temps d'extraction

Le temps est un autre paramètre essentiel dans le procédé d'extraction des polyphénols, il peut être aussi court que quelques minutes ou très long jusqu'à 24 heures en fonction de la classe des composés phénoliques présents dans la matrice végétale (Hismath *et al.*, 2011).

Le temps d'extraction a un effet très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) sur les concentrations moyennes en phénols totaux enregistrées sur les feuilles de *M. vulgare*. En effet, les concentrations moyennes en phénols totaux augmentent progressivement pour atteindre une concentration maximale ( $155,16 \pm 69,83$  EAG/g) à 180 min avec le méthanol. Dans d'autres travaux, le temps idéal d'extraction des phénols totaux varie énormément ; il est de 18 heures chez le thé noir (Turkmen *et al.*, 2007), 90 min chez le marc du raisin (Franco *et al.*, 2008), 45 min chez les graines de *Areca catechu* (Sardsaengjun *et al.*, 2010), et les feuilles de *Azadirachta indica* (Hismath *et al.*, 2011). L'allongement du temps d'extraction (270, 360 et 450 min) entraîne des pertes en phénols totaux, ce qui est affirmé par plusieurs chercheurs qui ont attiré l'attention à la possibilité de l'oxydation des composés phénoliques quand le temps d'extraction s'allonge (Nazck et Shahidi, 2006 ; Chirinos *et al.*, 2007). Par ailleurs, Garcia-Marquez *et al.* (2012) confirment que le temps d'extraction ne dépend pas que du temps de macération ou d'agitation mais aussi du temps consacré à la filtration et à l'évaporation du solvant.

La concentration maximale en flavonoïdes ( $35,93 \pm 17,90$  mg EC/g) est obtenue sur les feuilles de *M. vulgare* à 450 min en utilisant le méthanol comme solvant organique. Le temps d'extraction a montré une différence très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) chez les flavonoïdes. Dans autres études, 3 heures est le temps idéal chez les feuilles de *Callicarpa nudiflora* (Liao *et al.*, 2012) et chez quelques variétés du thym (Zhekova et Pavlov, 2012). D'autre part, 30 min a permis d'extraire le maximum de flavonoïdes chez les feuilles de *Gynura medica* (Liu *et al.*, 2010).

La concentration maximale en tanins condensés ( $17,51 \pm 5,18$  EC/g) enregistrée sur les feuilles de *M. vulgare* est obtenue avec l'acétone pendant une durée de 180 min. Une différence très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) est notée entre les différents temps d'extraction testés. Nos résultats concordent avec ceux de Zhekova et Pavlov (2012) sur quelques variétés de thym. Dans d'autres travaux, le temps idéal est de : 120 min chez les fruits du Mangoustanier (Moosophin *et al.*, 2010), 150 min chez les écorces de *Parkia*

*clappertoniana* (Mustapha *et al.*, 2012), 80 min chez différents organes de *Cichorium intybus* L. (Shad *et al.*, 2012), et 20 min chez les écorces de *Punica granatum* (Zam *et al.*, 2012).

#### III.2.1.1.A.4. Effet de la température d'extraction

L'efficacité du processus d'extraction des phénols totaux est largement régulée par les conditions expérimentales et en particulier par la température (Druzynska *et al.*, 2007). Une augmentation de température est due principalement à une augmentation dans le taux de diffusion et la solubilité des substances extraites. D'autre part, il doit être pris en compte, que certaines classes de composés phénoliques sont endommagés à des températures élevées (Jokic *et al.*, 2010).

La concentration maximale en phénols totaux chez les feuilles de *M. vulgare* est obtenue avec le méthanol à une température de 25 °C, enregistrant ainsi une différence très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) entre les différentes températures utilisées. C'est le cas aussi chez les feuilles de *Lawsonia inermis* (Uma *et al.*, 2010) et de *Azadirachta indica* (Hismath *et al.*, 2011). Nos résultats montrent qu'une prolongation de la température d'extraction au-delà de 25 °C entraîne une baisse importante dans les concentrations moyennes en phénols totaux. Plusieurs études confirment que les pertes en phénols totaux sont causées par les extractions faites à des températures élevées, lesquelles entraînent la dégradation des polyphénols (Perva-Uzunalic *et al.*, 2006 ; Akowuah *et al.*, 2009). Ainsi le chauffage à haute température doit être évité autant que possible car dans de nombreux cas il peut affecter la composition polyphénolique (Tsao, 2010), raison pour laquelle, dans la majorité des protocoles, la température ambiante de l'ordre de 20 °C est la température idéale pour l'extraction des polyphénols totaux (Garcia-Salas *et al.*, 2010). Par contre, dans d'autres travaux, la température idéale d'extraction des phénols totaux est beaucoup plus élevée par rapport à la nôtre, elle est de 40 °C chez l'écorce de *Citrus hystrix* (Chan *et al.*, 2009), 100 °C chez les graines de *Areca catechu* (Sardsaengjun *et al.*, 2010), 65 °C chez les feuilles de *Centella asiatica* (Chew *et al.*, 2011a) et les parties aériennes de *Orthosiphon stamineus* L. (Chew *et al.*, 2011b), 90 °C chez les feuilles de *Moringa oleifera* (Naeem *et al.*, 2012).

Le méthanol à 25 °C a permis d'obtenir la concentration maximale en flavonoïdes ( $53,31 \pm 1,35$  EC/g). Une différence très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) est notée entre les différentes températures testées. Dans d'autres études, la température idéale est beaucoup plus élevée, elle est de : 90 °C chez *Callicarpa nudiflora* (Liao *et al.*, 2012) et 60 °C chez quelques variétés du thym (Zhekova et Pavlov, 2012). Certains travaux confirment que les flavonoïdes sont généralement dégradés ou peuvent subir des réactions indésirables telles que l'oxydation enzymatique par des températures d'extraction élevées (Davidov-Pedro *et al.*, 2011 ; Biesaga et Pyrzynska, 2013). En outre, certains auteurs ont constaté qu'un chauffage modéré a la capacité d'adoucir les tissus de la plante, affaiblir l'intégrité de

la paroi cellulaire, et donc de favoriser la libération des composés phénoliques liés (Juntachote *et al.*, 2006 ; Spigno *et al.*, 2007).

La concentration maximale en tanins condensés évaluée à  $22,18 \pm 1,27$  EC/g est obtenue avec l'acétone à une température de 50 °C, enregistrant ainsi une différence très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) entre les différentes températures testées. Nos résultats sont en accord avec ceux de Zam *et al.* (2012) chez les écorces de *Punica granatum*. Dans d'autres travaux, cette température est un peu élevée : 80 °C chez fruits du Mangoustancier (Moosophin *et al.*, 2010), 70 °C pour les écorces de *Parkia clappertoniana* (Mustapha *et al.*, 2012) et 60 °C chez le thym (Zhekova et Pavlov, 2012). Contrairement aux résultats obtenus pour les phénols totaux et les flavonoïdes, l'extension de la température d'extraction au-delà de 25 °C conduit à une augmentation significative des concentrations en tanins condensés. Al-Farsi et Lee (2007) ont indiqué que la température élevée pourrait stimuler l'extraction des tanins condensés et ceci en augmentant à la fois le coefficient de diffusion et la solubilité des tanins condensés dans le solvant d'extraction. En plus, la chaleur intense du solvant a permis la libération des composés phénoliques de la paroi cellulaire par décomposition des constituants cellulaires (Wang *et al.*, 2008a) et par conséquent, elle permet d'augmenter le rendement en polyphénols. En outre, Juntachote *et al.* (2006) ont indiqué que la température d'extraction élevée augmenterait, d'une part, le transfert de masse de tanins condensés, et d'autre part, elle permettrait de réduire la viscosité et la tension superficielle du solvant ce qui favorise l'extraction des composés phénoliques.

L'ACP apporte une forte confirmation statistique aux résultats discutés ci-dessus dans la mesure où les flavonoïdes et les phénols totaux forment un groupe fortement corrélé aux extraits méthanolique, éthanolique et aqueux obtenus aux basses températures (20 °C et 25 °C). Les tanins condensés forment un groupe corrélé avec les extraits éthanolique, acétonique et aqueux obtenus aux fortes températures 50 °C et 60 °C.

### III.2.1.1.B. Effet des paramètres environnementaux sur les concentrations en polyphénols chez différents organes de *M. vulgare*

#### III.2.1.1.B.1. Influence de l'organe analysé

Les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés sur *M. vulgare* varient d'un organe à l'autre de manière très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ). Pour les phénols totaux, c'est dans les feuilles que les concentrations moyennes sont les plus importantes, suivies par les fleurs, les tiges et les racines. Pour les flavonoïdes, les fleurs viennent en première position, suivies par les feuilles, les tiges et les racines. En ce qui concerne les tanins condensés, les fleurs renferment les plus importantes concentrations, suivies par les feuilles, les tiges et les racines. D'une façon générale, les feuilles et les fleurs de *M. vulgare* renferment les concentrations les plus élevées en composés phénoliques, tandis que les tiges et les racines en sont faiblement représentées. Nos résultats sont comparables à ceux de Cardenas-Sandoval *et al.* (2013) qui ont montré que les feuilles de *Cuphea aequipetala* et les fleurs *Cuphea lanceolata* renferment des quantités plus importantes en phénols totaux et en flavonoïdes par rapport aux tiges et aux racines. Aussi, Stankovic *et al.* (2011) ont démontré que les feuilles et les fleurs de *Teucrium montanum* contiennent les concentrations les plus élevées en phénols totaux et en flavonoïdes par rapport aux tiges. Rugna *et al.* (2013) ont enregistré de fortes concentrations en composés phénoliques dans les feuilles de *Smilax campestris* par rapport aux organes souterrains (racines et rhizomes). Egalement, Harzallah-Skhiri et Ben Jannet (2005) ont enregistré des teneurs plus élevées en composés phénoliques dans les feuilles et les fleurs de *Prosopis farcta* par rapport aux branches, péricarpes et racines. D'autre part, Bakzec *et al.* (2012), Tajali et Khazaeipool (2012) et Hu *et al.* (2013) ont démontré que les fleurs de *Filipendula vulgaris*, *Crataegus microphyla* et *Abelmoschus esculentus* respectivement, contiennent beaucoup plus de flavonoïdes que les feuilles. Par contre, Brahmi *et al.* (2014) ont démontré que les fruits et les tiges de *Olea europea* sont plus riches en composés phénoliques par rapport aux feuilles. La plus grande quantité de composés phénoliques dans les feuilles et les fleurs par rapport aux autres parties de la plante peut être attribuée à l'effet de l'intensité de la lumière solaire sur la production des composés phénoliques des plantes (Mole *et al.*, 1988, Kotilainen *et al.*, 2010). En effet, plusieurs auteurs ont confirmé l'existence d'une corrélation positive entre la synthèse des composés phénoliques et l'intensité de la lumière solaire (Van Der Sluis *et al.*, 2001 ; Connor *et al.*, 2002 ; Howard *et al.*, 2003 ; Bolling *et al.*, 2010 ; Kevers *et al.*, 2011 ; Alfaro *et al.*, 2013 ; Mannino *et al.*, 2014). Lorsque la plante est exposée aux fortes lumières solaires, les composés phénoliques sont fabriqués pour empêcher la photo-destruction des tissus exposés (Naghiloo *et al.*, 2012). En effet, les organes aériens (feuilles et fleurs essentiellement) sont plus exposés à ces changements climatiques que les organes souterrains (racines) ce qui explique leurs richesses en polyphénols. Dans un deuxième temps, plusieurs auteurs ont confirmé que l'anatomie de l'organe végétal joue un rôle déterminant dans la synthèse et l'accumulation des composés phénoliques (Grundhöfer et Gross, 2001 ; Thiombiano *et al.*, 2001). Sereme *et al.* (2010) ont

constaté que la concentration en tanins varie selon l'anatomie de l'organe végétal étudié, et elle est en étroite corrélation avec le nombre et la taille des canaux sécréteurs, des cellules glandulaires, des poils sécréteurs et des cellules sécrétrices dispersées dans les tissus (xylème et parenchymes). Les structures spécialisées dans la synthèse et l'accumulation des composés phénoliques sont inégalement réparties entre espèces et familles, et généralement abondants dans les feuilles et dans les organes reproducteurs (fleurs et fruits). Ces constatations confirment la richesse des feuilles de *M. vulgare* en composés phénoliques, ces dernières sont connues pour leurs richesses en poils sécréteurs et en trichomes glandulaires (Belhattab et Larous, 2006 ; Bouterfas, 2011).

#### III.2.1.1.B.2. Influence de la saison de prélèvement

Les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés sur les différents organes de *M. vulgare* varient significativement ( $***p < 0,0001$ ) entre les différentes saisons de prélèvement (Annexes 1 et 2). Généralement, nous avons remarqué pour les trois organes végétatifs (feuilles, tiges et racines) de légères diminutions et augmentations entre l'automne et l'hiver ; une très importante augmentation au printemps, et de légères diminutions et augmentations en été. En ce qui concerne les fleurs, les concentrations moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes diminuent du printemps à l'été et vice-versa pour les tanins condensés. Ceci montre que le printemps est la saison où la synthèse des phénols totaux est optimale aux niveaux foliaire et racinaire, alors que l'été l'est pour les tiges et les fleurs. Pour les flavonoïdes, le printemps et l'été sont les saisons optimales pour tous les organes étudiés. Chez les tanins condensés, l'été est la saison optimale de synthèse pour les organes aériens analysés ; alors que le printemps l'est pour les racines. Pour les trois organes végétatifs (feuilles, tiges et racines), les plus fortes concentrations en composés phénoliques sont obtenues au printemps et en été, tandis que les plus faibles le sont en automne et en hiver. En effet, nos résultats sont similaires à ceux de Ghorbanli *et al.* (2012) qui ont montré que l'été et le printemps enregistrent les plus fortes concentrations en phénols totaux et en flavonoïdes chez *Physcia dubia*. Aussi, Ramah *et al.* (2014) ont enregistré en été des concentrations maximales en phénols totaux chez *Padina gymnospora*. C'est ce qui a été noté également dans les travaux de Rana *et al.* (2006) qui ont révélé des concentrations maximales en phénols totaux et en tanins condensés pendant le printemps et l'été chez douze espèces Indiennes. Siatka et Kasparova (2010) ont trouvé chez les fleurs de *Bellis perennis* des concentrations maximales de phénols totaux et de flavonoïdes durant les mois allant de mai à septembre. Verma et Kasera (2007), Swani *et al.* (2008) et Gehlot *et al.* (2011) ont enregistré des valeurs maximales en phénols totaux pendant la période estivale chez *Sida cordifolia*, *Convolvulus microphyllus* et le genre *Withania* respectivement. Par contre, l'hiver est la saison qui a présenté les plus fortes concentrations en phénols totaux chez *Padina tetrastromatica* et *Sargassum vulgare* par rapport aux autres saisons (Sarojini *et al.*, 2013). La majorité des auteurs expliquent que les fortes températures de l'environnement sont un facteur déterminant dans la synthèse des composés phénoliques (Yamane *et al.*, 2006 ; Jaakola et Hohtola, 2010). L'effet de la

température de l'environnement sur la synthèse des polyphénols est un paramètre difficile à évaluer avec suffisamment de rigueur car il est souvent associé à d'autres paramètres environnementaux tels que l'intensité de la lumière solaire et la durée du jour (McDougall *et al.*, 2011). L'augmentation des concentrations en polyphénols avec l'élévation des températures est un phénomène vérifié chez les fraises (Wang et Zheng, 2001) et les pommes (Bakhshi *et al.*, 2006). Plusieurs auteurs ont confirmé que le stress hydrique due principalement aux températures élevées de la période sèche peut stimuler l'accumulation des composés phénoliques (Deshmukh *et al.*, 2005 ; Sahoo *et al.*, 2012). Selon Sen et Sharma (1996), les composés phénoliques augmentent dans les conditions de stress hydrique par l'hydrolyse des fonctions glycosides. L'augmentation des concentrations phénoliques n'est pas uniquement l'effet du stress hydrique, mais aussi celui de l'intensité de la lumière du soleil et de la longueur de la journée, deux phénomènes qui varient significativement entre les différentes saisons, et qui augmentent d'une manière importante pendant les deux saisons de printemps et d'été (Cosmulescu et Trandafir, 2011). D'autre part, certains auteurs expliquent les différences dans les concentrations moyennes en métabolites phénoliques au cours de l'année par la maturité et la taille des différents organes de la plante (Olmez et Yilmaz, 2009 ; Baatour *et al.*, 2012). Dans la présente étude, le matériel végétal analysé a été échantillonné à partir de plantes de *M. vulgare* poussant dans des conditions naturelles et de façon spontanée. De ce fait, il n'est pas facile de discerner l'effet des deux paramètres précités car ce genre d'étude se fait généralement pour des plantes cultivées sous conditions contrôlées.

#### III.2.1.1.B.3. Influence du mois de prélèvement

A l'intérieur de chaque saison de prélèvement, le mois d'échantillonnage a un effet très hautement significatif ( $***p < 0,0001$ ) sur les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés (Annexes 3 et 4). Pour les trois polyphénols, les concentrations moyennes des feuilles, tiges et racines diminuent et augmentent légèrement d'octobre à mars enregistrant les valeurs les plus basses, ensuite elles s'élèvent d'une manière très importante en avril pour se stabiliser plus au moins durant mai, juin, juillet, août et septembre avec de légères augmentations et diminutions enregistrant ainsi leurs maximums durant cette période. En effet, les feuilles et les racines enregistrent le maximum de phénols totaux en mai, tandis que les tiges en juillet. Une concentration maximale de flavonoïdes caractérisent les feuilles en mai, en avril pour les tiges et en juin pour les racines. Les tanins condensés sont à leur maximum en septembre pour les feuilles et les racines et en juin pour les tiges. Pour les fleurs, les concentrations moyennes en composés phénoliques augmentent et diminuent légèrement durant les quatre mois d'échantillonnage enregistrant leur maximum en juin pour les flavonoïdes, juillet pour les phénols totaux et août pour les tanins condensés. D'une façon générale, les concentrations maximales en polyphénols ont été enregistrées durant les mois allant de la mi-printemps à la fin de l'été. Nos résultats sont en accord avec ceux de Jalili et Sadeghzade (2012) et de Rugna *et al.* (2013) qui notent en mai une concentration maximale en polyphénols respectivement dans les feuilles de *Juglans*

*regia* et les racines de *Smilax campestris*. Egalement, Zhang *et al.* (2013) ont constaté sur les feuilles de *Eucommia ulmoides* que la plus forte concentration en flavonoïdes est obtenue au mois de mai. Par ailleurs, Bauer *et al.* (2009) ont enregistré des valeurs maximales en phénols totaux pendant le mois de mai pour les feuilles et les tiges de *Myriophyllum verticillatum*. D'après Colaric *et al.* (2006) et Cosmulescu et Trandafir (2011), juillet et septembre marquent les concentrations maximales en polyphénols chez les feuilles de *Pyrus communis* et de *Juglans regia* respectivement.

Les concentrations moyennes en phénols totaux varient en fonction du stade phénologique de la plante, dans la mesure où nous avons enregistré une nette différence entre la période de végétation et celle de floraison. Cette constatation a été vérifiée dans nos travaux antérieurs (Bouterfas *et al.*, 2013b). Nos résultats sont en accord avec ceux de Çirac *et al.* (2007), Nikolova *et al.* (2007) et Toker (2009) qui ont remarqué que les concentrations des polyphénols varient significativement avec le stade phénologique de *Artemisia* sp. et *Hypericum* sp., avec de fortes concentrations en période de floraison. Aussi, le pic des concentrations moyennes en composés phénoliques a été observée pendant le stade de floraison pour *Boerhavia diffusa* et *Sida cordifolia* (Verma et Kasera 2007). Naghiloo *et al.* (2012) expliquent l'augmentation de la production de composés phénoliques pendant la période de floraison par le fait que la plante est affaiblie en passant du stade végétatif au stade floraison et que cette production accrue constitue un moyen de protection de la plante contre les stress environnementaux (rayonnements UV, déficit hydrique et agressions des pathogènes). Aussi, nous avons noté chez les différents organes analysés, une sévère augmentation dans les concentrations moyennes en polyphénols au début de la floraison de la plante (avril). Ce constat est vérifié sur les parties aériennes par Males *et al.* (2003) sur *Crithmum maritimum* et Ayan *et al.* (2007) sur *Hypericum* sp. L'écart thermique entre mars et avril (une moyenne de 3,1 °C) dans nos sites d'étude, explique l'importante augmentation des concentrations en polyphénols et confirme davantage le rôle de ce paramètre climatique (élévation des températures) dans la production de ce type de métabolites secondaires.

#### III.2.1.1.B.4. Influence de la localité d'échantillonnage

La localité d'échantillonnage des feuilles de *M. vulgare* influence d'une manière très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) sur les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés (Annexe 5). Pour les phénols totaux, les concentrations maximales sont relevées sur les feuilles du mont de Tessala, les tiges de Béni-Saf, les racines et les fleurs de la forêt de M'sila. Pour les flavonoïdes, les concentrations les plus élevées sont notées sur les feuilles et les tiges de la forêt de M'sila, les racines et les fleurs de Béni-Saf. Pour les tanins condensés, les concentrations maximales sont relevées sur les feuilles de la forêt de M'sila, les tiges et les fleurs du mont de Tessala et les racines de Béni-Saf. L'influence de la localité ou la région d'échantillonnage sur les concentrations des composés phénoliques a été vérifiée par plusieurs auteurs : Males *et al.* (2003) sur les parties aériennes de *Crithmum maritimum* de trois localités géographiques en Croatie, Ghasemi *et al.* (2010) sur les écailles

vertes de *Juglans regia* de onze différentes localités en Iran, Siatka *et al.* (2010) sur les fleurs de *Bellis perennis* de trois localités en République Tchèque, Ismael *et al.* (2012) sur les graines de *Vicia faba* de quatre régions Iraquiennes et Soumaya *et al.* (2013) sur tiges de *Cynara cardunculus* de six provenances Tunisiennes. En plus des stress thermique et hydrique, le stress salin affecte aussi d'une manière significative les concentrations des polyphénols (Baatour *et al.*, 2012). En effet, les deux localités d'échantillonnage du littoral (Béni-Saf et M'sila) exposées aux embruns marins où les concentrations importantes en polyphénols ont été enregistrées, présentent des sols plus ou moins salés (Aboura *et al.*, 2006 ; Bouras *et al.*, 2007), ce qui n'est pas le cas pour ceux du mont de Tessala (Cherifi *et al.*, 2011 ; Bouterfas *et al.*, 2013a) où des concentrations moins importantes ont été notées. Ceci rejoint les travaux de Kennedy et Fillippis (1999), Agastian *et al.* (2000) et Ramah *et al.* (2014) qui soulignent que les concentrations moyennes en composés phénoliques augmentent avec l'augmentation de la salinité du sol chez *Cerriops roxburghiana*, *Crithmum maritimum* et *Aegiceras corniculatum* respectivement. Les variations des concentrations moyennes en polyphénols en fonction de la localité de prélèvement sont dans la majorité des travaux associées aux conditions climatiques (Bruni et Sacchetti, 2009). C'est ce qui a été rapporté dans les travaux de Amaral *et al.* (2008) en notant que les conditions climatiques représentées par les précipitations et les températures sont probablement la cause des variations constatées dans les concentrations moyennes en polyphénols chez les feuilles de *Juglans regia* prélevées de neuf localités différentes.

Les écarts dans les concentrations moyennes en composés phénoliques constatés entre les différentes localités de prélèvement s'explique certainement par l'effet de certaines variantes climatiques caractérisant chacune d'elles. En effet, Béni-Saf et forêt de M'sila appartiennent au semi-aride supérieur à hiver chaud, tandis que le mont de Tessala au semi-aride inférieur à hiver frais. En outre, le littoral est soumis à une brise maritime qui adoucit les températures minimales de l'hiver et de l'automne enregistrant ainsi des températures moyennes élevées par rapport à la montagne, ce qui explique aussi les écarts suscités.

L'effet des conditions climatiques sur les concentrations en polyphénols est un phénomène très difficile à évaluer avec précision, car ces conditions sont variables et se répartissent irrégulièrement toute au long de l'année (Siatka et Kasparova, 2010 ; Cosmulescu et Trandafir, 2011). Certains auteurs justifient la variation des composés phénoliques en fonction de la localité d'échantillonnage par un facteur intrinsèque et génétique propre à l'espèce végétale étudiée (Erturk *et al.*, 2010 ; Ncube *et al.*, 2010 ; Merhabi et Hassanpouraghdam, 2012). En effet, la composition biochimique en métabolites primaires et secondaires de la même espèce végétale n'est pas forcément le même dans de différentes régions (Chaves *et al.*, 2013). De ce fait, la biosynthèse des polyphénols est influencée aussi par le potentiel génétique propre à chaque espèce, ce qui donne des différences quantitatives dans les concentrations moyennes des polyphénols et ce, selon les formes d'adaptation au milieu où elle se trouve (Kallithraka *et al.* 2004). Ces facteurs génétiques varient certainement avec les deux facteurs environnementaux cités

précédemment (édaphiques et climatiques). A leurs tours, les conditions édaphiques de la localité de prélèvement ont un effet significatif sur les concentrations moyennes en polyphénols (Bruni et Sacchetti, 2009 ; Ncube *et al.*, 2012). Dans la plus part des études entreprises dans ce contexte, c'est soit la pollution du sol par les métaux (Chizzola *et al.*, 2003 ; Ayan *et al.*, 2006 ; Ismael *et al.*, 2012 ; Wei *et al.*, 2013) ou la fertilité du sol en éléments minéraux particulièrement l'azote et le potassium (Briskin *et al.*, 2001 ; Sarojini *et al.*, 2013) qui sont traitées. Dans le présent travail, nous ne pouvons pas évaluer correctement l'effet des paramètres pédologiques en raison de l'insuffisance des travaux similaires sur notre région d'étude.

#### III.2.1.1.B.5. Influence de l'altitude de la station de prélèvement

L'altitude de la station de prélèvement a un effet très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) sur les teneurs moyennes en composés phénoliques (Annexe 6). Un taux maximum de phénols totaux est relevé sur les feuilles à 900 m d'altitude, à 357 m pour les tiges et 68 m pour les racines et les fleurs. Les flavonoïdes présentent un pic à 68 m d'altitude pour les feuilles et les tiges, à 357 m pour les racines et les fleurs. Les concentrations optimales en tanins condensés sont enregistrées à 600 m d'altitude pour les tiges et les fleurs ; à 900 m pour les feuilles et 357 m pour les racines. Généralement, nous avons constaté que les feuilles accumulent les concentrations maximales en polyphénols aux altitudes élevées ( $\approx 900$  m) et ce, contrairement aux autres organes (fleurs, tiges et racines) où ces concentrations sont notées aux faibles et moyennes altitudes ( $\approx 68$  m, 357 m et 600 m). Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature. En effet, les effets biotiques et climatiques associés à un gradient altitudinal sont extrêmement difficiles à évaluer en raison de leurs variations continues dans le temps (Alonso-Amelot *et al.*, 2004). Néanmoins, nous pouvons citer à titre d'exemple les travaux de Mateus *et al.* (2001) qui ont trouvé chez le raisin (*Vitis vinifera*) des concentrations importantes de composés phénoliques dans les stations à hautes altitudes (300-350 m) par rapport à celles situées en basses altitudes (100-150 m). Spitaler *et al.* (2006) ont remarqué également chez les fleurs de *Arnica montana* que les concentrations des flavonoïdes augmentent avec l'augmentation de l'altitude. Dans la présente étude, les fortes concentrations en polyphénols enregistrées sur les feuilles poussant à des altitudes élevées ( $\approx 900$  m) peuvent être expliquées par l'intensité de la lumière solaire et par les rayonnements UV qui jouent un rôle déterminant dans la synthèse de ces métabolites secondaires (Wellmann, 1974 ; Vogt *et al.*, 1991 ; Lumthaler *et al.*, 1997 ; Alonso-Amelot *et al.*, 2007). En effet, en hautes altitudes, ces deux paramètres sont considérablement plus importants (Markham *et al.*, 1998). Aussi, il est vérifié que les rayonnements UV augmentent de 14 à 18% avec une augmentation de 1000 m d'altitude (Kishore *et al.*, 2010). L'hypothèse selon laquelle les plantes qui poussent à de fortes altitudes contiennent des quantités plus élevées de composés phénoliques à la suite de leur exposition à de fortes rayonnements UV et aux lumières solaires ne peut pas être confirmée sans la présence de données journalières (Rieger *et al.*, 2008). Albert *et al.* (2009) ont observé chez *Arnica montana* que la variation des composés phénoliques par rapport à

l'altitude est due beaucoup plus à la température de l'air qu'aux rayonnements UV, une constatation vérifiée par plusieurs auteurs (Spitaler *et al.*, 2006 ; Rieger *et al.*, 2008 ; Monschein *et al.*, 2010). Pour les organes restants, les composés phénoliques atteignent leurs maximums à de basses et moyennes altitudes. Cette constatation trouve probablement son explication dans la variation des conditions climatiques où il a été vérifié dans plusieurs travaux réalisés en Algérie nord occidentale, que pour une différence de 100 m d'élévation, les températures annuelles maximales et minimales diminuent de 0,6° C et 0,4° C respectivement, tandis que les précipitations annuelles augmentent de 50 mm (Seltzer, 1946 ; Miara *et al.*, 2013).

Selon l'écologie de *M. vulgare*, c'est une plante qui a une tendance à se développer dans des stations chaudes et ensoleillées à moyennes altitudes comprises entre 500 m et 600 m (Boutefas *et al.*, 2013a). De cet effet, la plante dans les deux stations du littoral (Béni-Saf et M'sila) n'est pas vraiment dans son environnement adéquat par rapport à l'altitude. Cela peut probablement expliquer les fortes concentrations enregistrées dans le littoral caractérisé par de faibles altitudes (68 m et 357 m) et de températures élevées par rapport à la montagne de Tessala. En effet, une espèce végétale poussant dans des conditions climatiques (due à l'altitude) non favorables à son développement, synthétise beaucoup plus de métabolites secondaires par rapport à une plante vivant sous de conditions climatiques convenables (Spitaler *et al.*, 2006). Selon l'AFC, une corrélation entre l'altitude et les concentrations en flavonoïdes ( $R= 0,69$ ) est révélée dans la mesure où nous avons remarqué d'une façon générale que les concentrations en flavonoïdes diminuent selon un gradient altitudinal. Nos résultats sont en accords avec ceux de Malnikova *et al.* (2013) qui ont enregistré une régression des concentrations en flavonoïdes des feuilles de *Fragaria vesca* en fonction de l'élévation de l'altitude.

#### III.2.1.1.B.6. Influence de l'exposition de la station de prélèvement

Comme pour l'altitude de la localité d'échantillonnage, les concentrations moyennes en composés phénoliques dosés sont très hautement influencées ( $***p < 0,0001$ ) par l'exposition (Annexe 7). Généralement pour les phénols totaux, l'exposition nord est la mieux représentée pour les feuilles et les tiges ; tandis que l'exposition sud l'est pour les racines et les fleurs. Pour les flavonoïdes, les feuilles et les tiges atteignent leurs concentrations maximales en exposition sud ; les racines et les fleurs en exposition nord. Pour les tanins condensés, l'exposition sud est idéale pour les feuilles et les fleurs ; par contre, l'exposition nord l'est pour les tiges et les racines. Au niveau du mont de Tessala, nous avons remarqué que les feuilles prélevées sur les stations à exposition nord sont caractérisées par des concentrations optimales en composés phénoliques. Ces concentrations optimales sont décelées sur les fleurs, tiges et racines prélevées dans les stations à exposition sud. Dans le littoral, l'exposition sud présente les plus fortes concentrations en polyphénols pour les feuilles et les fleurs ; contrairement aux racines et aux tiges où l'exposition nord est la mieux caractérisée. Dans le mont de Tessala, les fortes concentrations enregistrées dans

l'exposition sud par rapport à l'exposition nord peut être expliquée par des conditions climatiques (température et ensoleillement) et édaphiques (humidité des sols). En effet, le versant nord est moins ensoleillé et exposé aux vents humides venant de la mer, ce qui favorise l'augmentation de l'humidité des sols ; tandis que le versant sud est exposé à l'ensoleillement et aux vents chauds, ce qui entraîne l'évaporation de l'humidité des sols (Benyahia *et al.* 2001 ; Bouterfas *et al.*, 2013a). Cela explique probablement les fortes concentrations dans le versant sud du mont de Tessala là où la plante se trouve dans un environnement exposé à des conditions climatiques et édaphiques (températures élevées, fort ensoleillement et faible humidité des sols) favorisant davantage la synthèse des composés phénoliques. Les résultats de l'AFC ne révèlent aucune corrélation entre l'exposition de la station d'échantillonnage et les concentrations en composés phénoliques dosés. Aussi les tests de corrélation de Pearson montrent qu'aucune corrélation n'a été enregistrée entre l'exposition et les autres paramètres environnementaux étudiés. D'une façon générale, 60 % des concentrations maximales en composés phénoliques sont enregistrées dans les stations du versant sud (essentiellement S1 et S5) tandis que 70 % des concentrations minimales en polyphénols sont notées dans les stations du versant nord (essentiellement S2, S4 et S6).

D'autre part, les tests de corrélation de Pearson nous ont permis d'enregistrer des corrélations positives entre les différents composés phénoliques dosés entre les saisons d'échantillonnage (PT et FLA :  $R= 0,751$  ; PT et TC :  $R= 0,702$  ; FLA et TC :  $R= 0,750$ ). De même à l'intérieur de chaque saison de prélèvement, des corrélations positives ont été notées sur les polyphénols analysés entre les mois de prélèvement : automne (PT et FLA :  $R= 0,741$  ; PT et TC :  $R= 0,878$  ; FLA et TC :  $R= 0,719$ ), hiver (PT et FLA :  $R= 0,796$  ; PT et TC :  $R= 0,758$  ; FLA et TC :  $R= 0,623$ ), printemps (PT et FLA :  $R= 0,744$  ; PT et TC :  $R= 0,778$  ; FLA et TC :  $R= 0,694$ ) et été (PT et FLA :  $R= 0,788$  ; PT et TC :  $R= 0,728$  ; FLA et TC :  $R= 0,720$ ). Nos résultats confirment qu'en général les concentrations des différents composés phénoliques augmentent dans le même sens. A l'opposé, une corrélation négative ( $R= -0,528$ ) est enregistrée entre l'organe végétatif et les concentrations en phénols totaux et ce, entre les différentes saisons de prélèvement. Aussi, à l'intérieur de chaque saison de prélèvement, nous avons noté des corrélations négatives entre les mois d'échantillonnage en termes de composés phénoliques : automne (ORG et PT=  $-0,908$  ; ORG et FLA=  $-0,749$  ; ORG et TC=  $-0,791$ ), hiver (ORG et PT=  $-0,885$  ; ORG et FLA=  $-0,833$  ; ORG et TC=  $-0,714$ ), printemps (ORG et PT=  $-0,801$  ; ORG et FLA=  $-0,933$  ; ORG et TC=  $-0,736$ ) et été (ORG et PT=  $-0,471$ ). Ces corrélations négatives entre l'organe végétatif et les concentrations en composés phénoliques confirment les résultats obtenus dans la mesure où nous avons remarqué que les concentrations en composés phénoliques évoluent en diminuant progressivement des organes aériens (feuilles, fleurs et tiges) vers les organes souterrains (racines).

### III.2.1.2. Étude qualitative des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée

Les résultats qualitatifs relatifs aux différents profils chromatographiques CLHP des acides phénoliques et des flavonoïdes montrent que le nombre de composés obtenus varie en fonction de la localité d'échantillonnage et de la saison de prélèvement. Pour les acides phénoliques, les extraits phénoliques de Aïn Skhouna sont le mieux représentés avec un total de 120 composés suivis respectivement par ceux de la forêt domaniale de M'sila (114 composés), du mont de Tessala (103 composés) et de Béni Saf (94 composés). Les saisons les mieux représentées en acides phénoliques sont : l'été (29 composés) pour les extraits phénoliques du mont de Tessala, le printemps (31 composés) pour ceux de la forêt domaniale de M'sila, l'automne (27 composés) et le printemps (33 composés) pour les extraits phénoliques de Béni Saf et de Aïn Skhouna respectivement. En ce qui concerne les flavonoïdes, les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila sont les mieux représentés avec un total de 89 composés, suivis respectivement par les extraits phénoliques de Aïn Skhouna (81 composés), du mont de Tessala (74 composés) et de Béni Saf (63 composés). Les saisons optimales en nombre de flavonoïdes sont, le printemps (22 composés) pour les extraits phénoliques du mont de Tessala, l'hiver (27 composés) pour ceux de la forêt domaniale de M'sila, le printemps et l'été (19 composés chacune) pour ceux de Béni Saf et le printemps et l'été (23 composés chacune) pour ceux de Aïn Skhouna.

Pour mieux interpréter les quantités totales en acides phénoliques et en flavonoïdes dégagées par les chromatogrammes CLHP, et pour mettre en évidence l'influence de la saison de prélèvement sur la variation des composés phénoliques analysés, nous avons calculé les pourcentages saisonniers en acides phénoliques et en flavonoïdes à l'intérieur de chaque localité d'échantillonnage (Annexe 8, A). La comparaison de ces pourcentages montrent que les acides phénoliques sont mieux représentés dans les deux saisons de printemps et d'été, et ceci pour les extraits phénoliques du mont de Tessala (été 34,45 % et printemps 34,35 %), de Aïn Skhouna (printemps 32,06 % et été 26,8 %) et de la forêt domaniale de M'sila (été 35,84 % et printemps 27,16 %). Pour les extraits phénoliques de Béni Saf, le printemps et l'automne sont les deux saisons optimales en acides phénoliques avec des taux respectifs de 35,81 % et 24,81 %. Les mêmes constatations sont faites pour les flavonoïdes dans la mesure où les deux saisons d'été et de printemps sont les mieux caractérisées pour les extraits phénoliques du mont de Tessala (printemps 38,77 % et été 33,71 %), de Aïn Skhouna (été 34,68 % et printemps 30,36 %) et de la forêt domaniale de M'sila (été 42,44 % et printemps 26,87 %). Par contre, les deux saisons d'hiver (32,84 %) et de printemps (27,25 %) sont les mieux représentées en flavonoïdes chez les extraits phénoliques de Béni Saf. Ces résultats confirment les dosages effectués dans la deuxième partie de cette thèse (III.2.1.1.2. Effet des paramètres environnementaux sur les concentrations en polyphénols chez différents organes de *M. vulgare*) dans la mesure où nous avons obtenu des différences très hautement significatives entre les différentes saisons

de prélèvement avec des concentrations moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes beaucoup plus importantes dans les deux saisons de printemps et d'été.

Afin de comparer les quantités saisonnières en acides phénoliques et en flavonoïdes entre les différentes localités d'échantillonnage, nous avons calculé les pourcentages saisonniers de chaque localité d'échantillonnage par rapport aux quantités totales en acides phénoliques et en flavonoïdes (Annexe 8, B). Les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila et du mont de Tessala sont les mieux représentés en acides phénoliques et ceci en hiver (8,44 % et 3,83 %), au printemps (9,53 % et 9,13 %) et en été (12,57 % et 9,16 %) ; par contre en automne, les extraits phénoliques de Aïn Skhouna (4,78 %) et de Béni Saf (4,55 %) de sont les plus riches en acides phénoliques. Les mêmes constatations sont remarquées pour les flavonoïdes avec des taux élevés pour les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila et du mont de Tessala au printemps (9,55 % et 9,18 %) et en été (15,08 % et 7,98 %). En hiver, ce sont les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila (8,05 %) et de Béni Saf (6,97 %) qui sont les plus riches en flavonoïdes ; par contre en automne, les extraits phénoliques de Béni Saf (5,78 %) et de Aïn Skhouna (4,60 %) sont les mieux représentés. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment (III.2.1.1.2. Effet des paramètres environnementaux sur les concentrations en polyphénols chez différents organes de *M. vulgare*) où nous avons confirmé l'effet de la localité d'échantillonnage sur les concentrations moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes avec des différences très hautement significatives.

Pour la comparaison des différents profils chromatographiques CLHP relatifs aux acides phénoliques et aux flavonoïdes, entre les différentes saisons de prélèvement et à l'intérieur de chaque localité d'échantillonnage, nous avons superposé les chromatogrammes (Annexes 9 et 10).

Pour les acides phénoliques et pour la majorité des localités d'échantillonnage, le composé majoritaire des différentes saisons de prélèvement présente presque le même temps de rétention. C'est le cas des extraits phénoliques du mont de Tessala (Annexe 9, A) avec des composés majoritaires comparables : en automne (comp. 3 ; 8,37 mn ; 26,89 %), en hiver (comp. 2 ; 8,37 mn ; 20,36 %) et au printemps (comp. 3 ; 8,37 mn ; 34,31 %). De même pour les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila (Annexe 9, B) qui ont donné des composés majoritaires similaires et ceci en automne (comp. 3 ; 8,1 mn ; 32,87 %), en hiver (comp. 3 ; 8,07 mn ; 33,40 %), au printemps (comp. 4 ; 8,27 mn ; 32,33 %) et en été (comp. 3 ; 8,37 mn ; 23,49 %). Egalement, les extraits phénoliques de Béni Saf (Annexe 9, C) ont enregistré des composés majoritaires semblables en automne (comp. 20 ; 26,95 mn ; 37,54 %), en hiver (comp. 12 ; 27,02 mn ; 21,24 %), au printemps (comp. 16 ; 27,03 mn ; 47,67 %) et en été (comp. 18 ; 26,99 mn ; 27,52 %). Néanmoins, nous avons enregistré quelques différences dans les profils chromatographiques des acides phénoliques comme pour les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila (Annexe 9, B) qui ont donné en automne deux composés (comp. 20 ; 28,34 mn ; 6,44 % et comp. 21 ; 28,85 mn ; 5,06 %) dont les pics sont nettement individualisés par rapport aux autres saisons de prélèvement.

Aussi, les extraits phénoliques de Béni Saf (Annexe 9, C) ont enregistré en hiver un composé (comp. 19 ; 32,62 mn ; 9,45 %) présentant un pic bien distingué comparativement aux autres saisons de prélèvement.

Comme pour les acides phénoliques, la comparaison des profils chromatographiques des flavonoïdes montre quelques similarités dans les caractéristiques des composés majoritaires des différentes saisons de prélèvement et à l'intérieur de la même localité d'échantillonnage. Les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila (Annexe 10, B) ont enregistré presque les mêmes composés majoritaires en automne (comp. 2 ; 8,1 mn ; 43,88 %), en hiver (comp. 3 ; 8,07 mn ; 28,43 %), au printemps (comp. 3 ; 8,27 mn ; 25,53 % et en été (comp. 3 ; 9,15 mn ; 25,31 %). Aussi, les extraits phénoliques de Béni Saf (Annexe 10, C) enregistrent des composés majoritaires comparables entre l'automne (comp. 15 ; 32,45 mn ; 31,12 %) et l'hiver (comp. 10 ; 32,6 mn ; 41,66 %) d'une part et entre le printemps (comp. 12 ; 27,05 mn ; 21,73 %) et l'été (comp. 13 ; 27 mn ; 19,96 %) d'autre part. De même pour les extraits phénoliques de Aïn Skhoua (Annexe 10, D) qui donnent des composés majoritaires similaires en automne (comp. 2 ; 8,13 mn ; 26,09 %), en hiver (comp. 2 ; 8,1 mn ; 29,80 %) et au printemps (comp. 3 ; 8,16 mn ; 25,53 %). Nous avons remarqué quelques différences dans les profils chromatographiques saisonniers des flavonoïdes comme pour les extraits phénoliques du mont de Tessala (Annexe 10, A) qui ont enregistré en hiver deux composés (comp. 14 ; 29,73 mn ; 12,53 % et comp. 15 ; 31,84 mn ; 11,53 %) dont les pics sont nettement plus importants aux autres saisons de prélèvement. Egalement, les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila (Annexe 10, B) ont donné un composé en été (comp. 7 ; 12,94 mn ; 4,50 %) et au printemps (comp. 23 ; 33,62 mn ; 1,47 %) dont les pics sont nettement supérieurs par rapport aux autres saisons de prélèvement. C'est le cas aussi des extraits phénoliques de Aïn Skhoua (Annexe 10, D) qui ont donné un composé en été (comp. 22 ; 30,23 mn ; 19,36 %) dont le pic est différent par rapport à ceux des autres saisons de prélèvement.

La superposition des profils chromatographiques CLHP des acides phénoliques et des flavonoïdes des différentes localités d'échantillonnage et de la même saison de prélèvement est représentée par les annexes 11 et 12.

Pour les acides phénoliques, les mêmes composés majoritaires sont notés en automne (Annexe 11, A) pour les extraits phénoliques du mont de Tessala (comp. 3 ; 8,37 mn ; 26,89 %), de la forêt domaniale de M'sila (comp. 3 ; 8,1 mn ; 32,87 %) et de Aïn Skhoua (comp. 4 ; 8,37 mn ; 26,26 %). De même en hiver (Annexe 11, B) où les composés majoritaires sont comparables pour les extraits phénoliques de Tessala (comp. 16 ; 27,13 mn ; 27,31 %), de Béni Saf (comp. 12 ; 27,02 mn ; 21,24 %) et de Aïn Skhoua (comp. 17 ; 27,13 mn ; 19,06 %). Au printemps (Annexe 11, C), les composés majoritaires sont semblables d'une part entre les extraits phénoliques du mont de Tessala (comp. 3 ; 8,37 mn ; 34,41 %) et ceux de la forêt domaniale de M'sila (comp. 4 ; 8,27 mn ; 32,33 %) ; et entre les extraits phénoliques de Béni Saf (comp. 16 ; 27,03 mn ; 47,67 %) et ceux de Aïn Skhoua (comp. 24 ; 27,16 mn ; 23,34 %) d'autre part. Aussi en été (Annexe 11, C), les composés majoritaires sont presque

identiques entre les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila (comp. 3 ; 8,37 mn ; 23,49 %) et ceux de Aïn Skhouna (comp.3 ; 8,37 mn ; 24,72 %) et entre les extraits phénoliques du mont de Tessala (comp. 21 ; 27,08 mn ; 26,9 %) et ceux de Béni Saf (comp. 18 ; 26,99 mn ; 27,52 %). Nous avons enregistré quelques dissimilitudes entre les différents profils chromatographiques dans la mesure où nous avons noté la présence exclusive de composés dans une localité par rapport à une autre. C'est le cas en automne (Annexe 11, A) pour les extraits phénoliques de Béni Saf (comp. 16 ; 22,26 mn ; 5,57 % et comp. 26 ; 32,05 mn ; 2,28 %), les extraits de la forêt domaniale de M'sila (comp. 21 ; 28,85 mn ; 5,06 %) et les extraits de Aïn Skhouna (comp. 16 ; 22,74 mn ; 7,41 %). De même en hiver (Annexe 11, B) pour les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila (comp. 3 ; 8,07 mn ; 33,4 % ; comp. 5 ; 8,82 mn ; 7,2 % et comp.16 ; 22,61 mn ; 6,7 %) et ceux de Béni Saf (comp. 19 ; 32,62 mn ; 9,45 %). Aussi au printemps (Annexe 11, C), pour les extraits phénoliques du mont de Tessala (comp. 15 ; 22,12 mn ; 9,22 %) et en été pour les extraits phénoliques de Aïn Skhouna (comp. 22 ; 30,23 mn ; 19,36 %).

En ce qui concerne les flavonoïdes, nous avons enregistré des composés majoritaires comparables en automne (Annexe 12, A) et ceci pour les extraits phénoliques du mont de Tessala (comp. 2 ; 8,14 mn ; 36,16 %), de la forêt domaniale de M'sila (comp. 2 ; 8,1 mn ; 43,88 %) et de Aïn Skhouna (comp. 2 ; 8,13 mn ; 26,09 %). En hiver (Annexe 12, B), les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila (comp. 3 ; 8,07 mn ; 28,34 %) et ceux de Aïn Skhouna (comp. 2 ; 8,1 mn ; 29,8 %) ont presque les mêmes composés majoritaires. Au printemps (Annexe 12, C), nous avons noté des composés majoritaires semblables entre les extraits phénoliques du mont de Tessala (comp. 3 ; 8,11 mn ; 28,3 %) et ceux de la forêt domaniale de M'sila (comp. 3 ; 8,27 mn ; 25,53 %) et de Aïn Skhouna (comp. 3 ; 8,16 mn ; 25,53 %). Néanmoins, quelques différences entre les profils chromatographiques sont notées dans la mesure où nous avons remarqué l'existence de quelques composés dans une localité par rapport à l'autre. En automne (Annexe 12, A) pour les extraits phénoliques de Béni Saf (comp. 9 ; 22,26 mn ; 5,8 % et comp. 15 ; 32,45 mn ; 31,12 %) et ceux de Aïn Skhouna (comp. 6 ; 12,59 mn ; 5,47 %). En hiver (Annexe 12, B), pour les extraits phénoliques de Béni Saf (comp. 9 ; 21,4 mn ; 31,05 % et comp. 10 ; 32,6 mn ; 41,66 %). Au printemps (Annexe 12, C) pour les extraits phénoliques du mont de Tessala (comp. 15 ; 22,12 mn ; 9,22 %) et en été pour les extraits phénoliques de Aïn Skhouna (comp. 22 ; 30,23 mn ; 19,36 %).

La comparaison des temps de rétention des extraits phénoliques de *M. vulgare* avec ceux des standards phénoliques montre que la probabilité de présence de ces standards diffère en fonction de la localité d'échantillonnage et de la saison de prélèvement. Les extraits du mont de Tessala sont les mieux représentés en acides phénoliques avec la présence probable de quatre acides phénoliques représentés par l'acide chlorogénique (en automne, en hiver et au printemps), la vanilline, l'acide ellagique et l'acide hydrocinnamique (en été). Les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila et de Béni Saf renferment chacun trois acides phénoliques référenciés. L'acide ellagique (automne), l'acide tannique

(au printemps) et l'acide férulique (en été) pour les extraits de la forêt domaniale de M'sila, la vanilline (en été et au printemps), l'acide hydrocinnamique (au printemps) et l'acide ellagique (en été) pour les extraits de Béni Saf. Les extraits phénoliques de Aïn Skhouna sont les moins caractérisés en acides phénoliques enregistrant la présence probable de seulement deux acides phénoliques représentés par l'acide férulique (en automne, au printemps et en été) et l'acide tannique (au printemps). En ce qui les flavonoïdes, les extraits phénoliques du mont de Tessala sont les mieux représentés en standards flavonoïques avec la probabilité de présence de la diosmine (en automne, en hiver et en été), la catéchine et la naringinine (au printemps et en été), la lutéoline, le kaempférol, la diosmétine et la nobilétine (en été). Les extraits phénoliques de la forêt domaniale de M'sila renferment probablement six acides phénoliques représentés par la diosmine (en automne et au printemps), la catéchine (en hiver et au printemps), la nobilétine (au printemps et en été), la naringine (en hiver), la diosmétine et la naringinine (au printemps). Les extraits phénoliques de Béni Saf et de Aïn Skhouna renferment chacun quatre flavonoïdes. La catéchine et la naringine (au printemps), la diosmine et la diosmétine (en été) pour les extraits de Béni Saf ; la nobilétine (en automne, au printemps et en été), la diosmine (en hiver), la naringinine et le kaempférol (en été) pour les extraits de Aïn Skhouna.

Il est très difficile de comparer les résultats obtenus avec ceux de la bibliographie car plusieurs facteurs peuvent influencer sur le profil chromatographique CLHP des composés phénoliques. En effet, les conditions opératoires utilisées pendant l'analyse, à savoir les types de colonnes à utiliser, les solvants, le temps d'analyse, les colonnes de séparation (Merken et Beecher 2000), les systèmes d'élution (binaire, tertiaire ou même quaternaire) et le gradient d'élution sont à l'origine des différences trouvées dans les profils chromatographiques CLHP des composés phénoliques des différentes plantes (Tamura *et al.*, 1994 ; Dalluge *et al.*, 1998 ; De Pascual-Teresa *et al.*, 1998). Aussi, la longueur d'onde utilisée pour la détection des composés phénoliques influence nettement sur le profil chromatographique CHLP des composés phénoliques. C'est le cas pour les flavonoïdes où plusieurs longueurs d'ondes sont employées : 290 nm (Bogdanov, 1989), 280 nm (Krause et Galensa, 1991), 365 nm (Crozier *et al.*, 1997), 270 nm (Brolis *et al.*, 1998), 350 nm (De Cooman *et al.*, 1998), 370 nm (Ewald *et al.*, 1999).

La plupart des chercheurs utilisent la chromatographie liquide à haute performance en phase inversée couplée à la spectrophotométrie de masse pour la détermination quantitative et structurale des composés phénoliques (Tasioula-Margari et Okogeri, 2001 ; Ozkan et Baydar, 2006 ; Trabelsi *et al.*, 2010 ; Rajeshwari et Andallu, 2011 ; Proestos et Komaitis, 2013). Le peu des travaux focalisés sur la variation qualitative des composés phénoliques par rapport aux paramètres environnementaux tels que la saison de prélèvement où la localité d'échantillonnage affirme que ces variations qualitatives sont dues essentiellement aux paramètres climatiques, édaphiques et aux différents stress environnementaux (Stefkov *et al.*, 2009 ; Ni *et al.*, 2012 ; Acikara *et al.*, 2013).

### III.2.2. Activités biologiques des flavonoïdes

#### III.2.2.1. Activités antimicrobiennes

##### III.2.2.1.A. Test préliminaire : pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *M. vulgare* en provenance du mont de Tessala

L'extrait brut représente le meilleur rendement en flavonoïdes, il est suivi respectivement par l'extrait hexanique, l'extrait d'acétate d'éthyle, l'extrait chloroformique et l'extrait aqueux. Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement d'extraction n'est que relatif et semble être lié aux méthodes d'extraction appliquées (Markham, 1982), aux propriétés génétiques de l'espèce utilisée, à la nature des organes pour une même espèce (Bruneton, 1999c), à l'origine géographique (Narayana *et al.*, 2001) et aux conditions de récolte de la matière végétale (Lin et Weng, 2006).

Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait en préservant la bio-activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leurs dénaturations ou modifications probables dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction (Poirot, 2007 ; Besombes, 2008).

L'extrait méthanolique (brut) est le seul extrait qui contient des composés autres que les flavonoïdes, à savoir les tanins condensés et hydrolysables. Ceci peut être expliqué par le solvant utilisé pour l'extraction, qu'est le méthanol. Ce dernier étant le plus polaire par rapport aux autres solvants utilisés et caractérisés par une bonne solubilité pour les composés, permet ainsi d'extraire en plus des flavonoïdes hétérosides, de nombreux principes actifs appartenant à plusieurs classes chimiques (alcaloïdes, tanins, acides aminés, etc.) (Snyder et Kirkl, 1979). Des résultats ont prouvé que le méthanol était le meilleur solvant utilisé pour extraire les composés phénoliques, suivi par l'éthanol et finalement par l'eau (Mohsen et Ammar, 2009). Les autres solvants organiques étant moyennement polaires (chloroforme et acétate d'éthyle) et apolaire (hexane) permettent de séparer les composés de l'extrait brut selon leurs structures chimiques. Ces solvants permettent d'extraire des composés tels que les flavonoïdes aglycones et quelques hétérosides (flavanes, flavanols et anthocyanes) (Snyder et Kirkl 1979).

L'antibiogramme a montré que les souches bactériennes testées sont toutes sensibles à la pipéracilline. Cette sensibilité est due au fait que cet antibiotique a un large spectre d'action, agissant préférentiellement sur les bactéries Gram+ que sur les bactéries Gram- (Peyret, 1991). Ceci est étayé par les diamètres d'inhibition constatés sur *S. aureus* (30,3 mm) et *B. cereus* (37,6 mm) par rapport à *E. coli* (25 mm) et *P. aeruginosa* (24,3 mm). Les bactéries testées se sont montrées sensibles à la kanamycine, exceptée *Pseudomonas aeruginosa* qui s'en est révélée intermédiaire. Ceci trouve probablement son explication

dans le fait que cette bactérie possède une résistance naturelle à cet antibactérien (Véron, 1989 ; Auajjar *et al.*, 2006). En plus les *pseudomonas* possèdent des éléments génétiques susceptibles d'acquérir des gènes de résistance aux différents antibiotiques (Poirel *et al.*, 2001) et une capacité de développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, d'où leur implication fréquente dans les infections hospitalières (Mann *et al.*, 2000). L'ampicilline a généralement un spectre élargi sur les bactéries Gram- et limité sur les bactéries Gram+ (Le Minor *et al.*, 1989), raison pour laquelle la sensibilité de *S. aureus* et *B. cereus* vis-à-vis de cet antibiotique est intermédiaire. La plupart des *staphylocoques* sont résistants à l'ampicilline. Des études faites ont montré que 70 à 90 % des *staphylocoques* résistent vis-à-vis de cet antibactérien (Leclercq, 2002). *E. coli* est sensible à l'égard de l'ampicilline, alors que *P. aeruginosa* présente une sensibilité intermédiaire due à sa résistance naturelle à l'ampicilline (Naas *et al.*, 1998).

L'antifongogramme a révélé que les deux souches fongiques *A. niger* et *P. digitatum* sont sensibles au nitrate d'éconazole, ce qui est vérifié dans les travaux de Guibaud (1975). Elles sont également sensibles à l'amphotéricine B2 (50 µg/ml) dont le spectre d'activité s'étend à la plupart des champignons saprophytes et pathogènes. La sensibilité des deux champignons testés est intermédiaire vis-à-vis de l'amphotéricine B1 (100 µg/ml) et de l'amphotéricine B3 (20 µg/ml). Cette différence de sensibilité s'explique par la concentration de l'amphotéricine B.

L'activité antibactérienne des extraits flavonoïques et les tests de sensibilité réalisés permettent de classer les extraits flavonoïques selon leurs effets. EHx et EBr sont les extraits les plus actifs puisqu'ils induisent chez les souches bactériennes des taux de sensibilité respectivement de 60 % et 50 %. EBr a entraîné des zones d'inhibition importantes sur *B. cereus* (15,6 mm ; 20 mm et 31,6 mm), *S. aureus* (18 mm et 27 mm) et à un degré moindre sur *E. coli* (11,6 mm et 16 mm). EHx est actif sur *B. cereus* et *S. aureus*, donnant des diamètres compris entre 5,3 mm et 29,6 mm, tandis qu'il est moins actif sur *E. coli* avec un diamètre d'inhibition maximum de 18 mm. Cependant, ces deux extraits sont beaucoup moins actifs sur *P. aeruginosa* enregistrant des diamètres d'inhibition ne dépassant pas les 16 mm.

EAq ayant induit un pourcentage de sensibilité de 40 % chez les bactéries testées, présente un effet modéré ou acceptable sur *B. cereus* et *S. aureus* se traduisant par des diamètres d'inhibition situés entre 8 mm et 17,6 mm.

EAc est moyennement actif par rapport aux extraits précédents en procurant un taux de sensibilité de 35 % chez les souches bactériennes utilisées, se traduisant par des auréoles ne dépassant pas les 17,3 mm. Cependant, ECh est le moins actif parmi les extraits flavonoïques avec un taux de sensibilité de 30 % et des diamètres d'inhibition ne dépassant pas les 14,3 mm.

Par ailleurs, sur l'ensemble des extraits flavonoïques, les bactéries à Gram+ sont plus sensibles que les bactéries Gram-. En effet, *B. cereus* et *S. aureus* présentent des taux de

sensibilité respectivement de 64 % et 40 % par rapport à *E. coli* (40 %) et *P. aeruginosa* (28 %). Plusieurs travaux mettent en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram+ par rapport aux bactéries Gram- (Koné *et al.*, 2004; Hayouni *et al.*, 2007 ; Shan *et al.*, 2007 ; Turkmen *et al.*, 2007). Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram- par rapport aux bactéries Gram+. En effet, les bactéries Gram- possèdent une couche additionnelle à la membrane externe, composée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides, formant une barrière imperméable à la plupart des molécules hydrophobes (Georgantelis *et al.*, 2007).

En comparant les résultats de l'activité antibactérienne des extraits testés avec ceux de l'antibiogramme, il ressort que les diamètres des zones d'inhibition fournis par les extraits flavonoïques vis-à-vis des souches bactériennes Gram+ sont plus ou moins comparables à ceux engendrés par les antibiotiques utilisés. À titre d'exemple, l'effet de la pipéraciline (100 µg/ml) est presque identique à celui de l'EBr (100 µg/ml) contre *B. cereus*, donnant des diamètres d'inhibition respectifs de 37,6 mm et 31,6 mm. Par contre, chez les bactéries Gram-, les diamètres induits par les différents extraits flavonoïques restent inférieurs à ceux donnés par les antibiotiques.

Les extraits flavonoïques de *M. vulgare* sont plus efficaces sur les bactéries que sur les champignons testés. En effet, vis-à-vis de ces extraits, *A. niger* et *P. digitatum* manifestent des taux de résistance de 72 % et 56 %. Néanmoins, quelques zones d'inhibition modérées dont les diamètres sont compris entre 7,6 mm et 19,3 mm sont enregistrées par EBr et EHx sur *P. digitatum*. Ces diamètres restent toutefois moins importants par rapport à ceux fournis par l'antifongogramme.

Globalement, les diamètres des zones d'inhibition enregistrés par les extraits flavonoïques sont proportionnels à leurs concentrations. Nous avons remarqué que la majorité des extraits flavonoïques testés sont inactifs à de faibles concentrations (20 et 40 µg/ml) excepté l'effet de l'EBr et l'EHx vis-à-vis de *B. cereus*, et l'effet de l'EHx chez *S. aureus*.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) enregistrées par tous les extraits flavonoïques (excepté l'ECh) vis-à-vis de toutes les souches microbiennes testées (sauf *A. niger*) varient entre 6,25 et 50 µg/ml. Selon la classification faite par Aligiannis *et al.* (2001), cette inhibition est forte (CMI < 500 µg/ml).

Enfin, il est à noter que les différences trouvées dans l'évaluation du pouvoir antibactérien et antifongique des différents extraits, peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que la nature de l'espèce, les conditions ambiantes, les facteurs écologiques, les variations saisonnières, les méthodes d'extraction (Sagdic et Ozcan, 2003 ; Moreira *et al.*, 2005 ; Celiktas *et al.*, 2007 ; Turkmen *et al.*, 2007), la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, la sensibilité des bactéries, la concentration de l'extrait (Loziene *et al.*, 2007 ; Ulukan et Akkaya, 2011), et l'organe de la plante utilisé (Natarajan *et al.*, 2005).

### III.2.2.1.B. Variation du pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extrait des feuilles de *M. vulgare* en fonction de la localité d'échantillonnage

Les rendements d'extraction des différents extraits flavonoïques dépendent du type de solvant utilisé pour l'extraction et de la localité d'échantillonnage. En effet, les meilleurs taux d'extraction sont obtenus chez les feuilles prélevées du mont de Tessala suivis respectivement par celles de Aïn Skhouna et de la forêt domaniale de M'sila. En ce qui concerne la nature du solvant d'extraction, l'extrait méthanolique (l'extrait brut) renferme toujours les taux de rendements les plus élevés et ceci chez les feuilles des trois localités d'échantillonnage, suivi respectivement par l'extrait hénanique et d'acétate d'éthyle, tandis que les rendements d'extraction les plus faibles sont enregistrés dans les extraits chloroformique et aqueux.

Comme pour les rendements d'extraction, les différentes caractéristiques des extraits flavonoïques diffèrent aussi en fonction du type du solvant d'extraction et de la localité de prélèvement des feuilles. À titre d'exemple, l'extrait chloroformique a un aspect pâteux de couleur marron clair pour les extraits flavonoïques du mont de Tessala, par contre, il a un aspect poudreux de couleur marron clair pour les extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila, et un aspect huileux de couleur marron foncé pour les extraits flavonoïques de Aïn Skhouna. De même pour l'extrait d'acétate d'éthyle qui a un aspect pâteux de couleur vert jaunâtre dans le mont de Tessala, tandis qu'il est poudreux de couleur vert foncé dans la forêt domaniale de M'sila et huileux avec une couleur vert foncé à Aïn Skhouna.

Les résultats du criblage phytochimique montrent que les polyphénols et les flavonoïdes sont présents dans tous les extraits flavonoïques obtenus ce qui témoigne de la fiabilité de la méthode utilisée pour l'extraction des flavonoïdes. Pour les tanins, TEBr est le seul extrait contenant des tanins condensés. Aussi, nous avons noté une réaction louche pour les tanins hydrolysables et ceci chez les extraits méthanoliques des trois localités de prélèvement. Pour les autres classes flavonoïques mises en évidence, des différences sont enregistrées en fonction du solvant d'extraction et de la localité d'échantillonnage. C'est le cas par exemple des flavanols, présents dans les extraits méthanoliques du mont de Tessala et de la forêt domaniale de M'sila, et absents dans celui de Aïn Skhouna ; présents dans les extraits hénaniques de la forêt domaniale de M'sila et Aïn skhouna, et absents dans celui du mont de Tessala ; présents dans l'extrait d'acétate d'éthyle du mont de Tessala et de Aïn Skhouna, et absents dans celui de la forêt domaniale de la forêt domaniale de M'sila.

Les diamètres d'inhibition enregistrés par les antibiotiques commercialisés vis-à-vis des souches microbiennes testées montrent que *P. mirabilis* est totalement sensible aux antibiotiques qui ont induit une inhibition totale de la croissance de cette bactérie. *E. coli* est sensible à tous les antibiotiques testés, enregistrant des diamètres d'inhibitions maximums de 30 mm par l'aztréonam, le chloramphénicol et l'imipénème. Les diamètres d'inhibition importants provoqués par les antibiotiques vis-à-vis de *P. mirabilis* et de *E. coli* ne sont pas

surprenant car tous les antibiotiques testés ont un large spectre d'action sur les bactéries à gram négatif (Pechère et Vladoianu, 1992 ; Cometta *et al.*, 1994 ; Auajjar *et al.*, 2006). *B. cereus* est la souche la plus résistante aux antibiotiques parmi les espèces bactériennes testées ; elle est résistante à l'aztréonam et la ceftazidime, sensible à la gentamicine et à l'acide nalidixique avec un diamètre d'inhibition de 25 mm, et à l'imipénème avec une auréole de 30 mm. La résistance de *B. cereus* aux différents antibiotiques varie largement entre les souches (Bernhard *et al.*, 1978 ; Weber *et al.*, 1988). La plupart des souches de *B. cereus* produisent de la bêta-lactamase et sont par conséquent considérées résistantes à la majorité des agents antimicrobiens (Coonrod *et al.*, 1971). Mols *et al.* (2007) ont rapporté que *B. cereus* était résistant aux antibiotiques ciblant les parois cellulaires ; cette souche présentait donc une résistance élevée à l'aztréonam, une sensibilité intermédiaire à l'acide nalidixique, mais elle est sensible à la gentamicine.

Pour l'antifongigamme, *C. albicans* est totalement résistant aux antifongiques référenciés qui n'ont induit aucune zone d'inhibition vis-à-vis de cette souche fongique. Plusieurs auteurs ont confirmé la résistance de *C. albicans* au fluconazole (Albertson *et al.*, 1996 ; White, 1997 ; Franz *et al.*, 1998 ; Lopez-Ribot *et al.*, 1999), à la terbinafine (Ryder *et al.*, 1998 ; Rathod *et al.*, 2012) et à l'amphotéricine B (Kumar *et al.*, 2006 ; Mendiratta *et al.*, 2006). *A. brasiliensis* est beaucoup plus sensible à l'amphotéricine B et à la terbinafine qui ont causé une inhibition totale de la croissance fongique, par contre le fluconazole a induit deux zones d'inhibition de 25 mm et 35 mm avec aux concentrations de 10 µg/ml et 20 µg/ml. En effet, les constatations de Szigeti *et al.* (2012) confirment nos résultats dans la mesure où ils ont démontré que la majorité des espèces bactériennes appartenant au genre *Aspergillus* sont résistantes au fluconazole et très sensibles à la terbinafine. Ellis (2002) a confirmé chez les aspergillus que l'amphotéricine B agit de manière très hétérogène et selon les concentrations utilisées.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits flavonoïques obtenus des feuilles de *M. vulgare* en provenance de trois localités d'échantillonnage vis-à-vis de trois souches bactériennes et deux souches fongiques, montre que les diamètres d'inhibition enregistrés varient d'une manière très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) en fonction de la localité d'échantillonnage. En effet, les extraits flavonoïques des feuilles prélevées du mont de Tessala présentent le meilleur effet antimicrobien, suivis par ceux du littoral (forêt domaniale de M'sila) et enfin par ceux de la steppe (Aïn Skhouna). Aussi la nature du solvant d'extraction influence significativement ( $***p < 0,0001$ ) sur l'activité antimicrobienne. Pour les extraits flavonoïques des feuilles du mont de Tessala, les deux extraits d'acétate d'éthyle (TEAc) et méthanolique (TEBr) sont les antibactériens les plus actifs enregistrant des taux de sensibilités respectifs de 46,66 % et 40 %. Ces deux extraits ont enregistré le diamètre d'inhibition le plus élevé contre *B. cereus* (31,65 mm chacun) ; en plus, TEAc a induit le plus important diamètre d'inhibition vis-à-vis de *E. coli* (21,5 mm). Les extraits flavonoïques restants étaient beaucoup moins actifs donnant des taux de sensibilité ne dépassant pas les

33 %. En revanche, TECh a donné le plus grand diamètre d'inhibition enregistré sur *P. mirabilis* (16,25 mm). En ce qui concerne les extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila, l'extrait aqueux (MEAq) et l'extrait hexanique (MEHx) avec des pourcentages de sensibilité respectifs de 46,66 % et 33,33 % sont les plus actifs. En effet, MEAq induit les plus grands diamètres d'inhibition vis-à-vis de *B. cereus* (28,33 mm) et de *E. coli* (18,16 mm). Les extraits restants provoquent des taux de sensibilité ne dépassant pas les 26,66 %. Chez les extraits flavonoïques de Aïn Skhouna, les deux extraits d'acétate d'éthyle (SEAc) et aqueux (SEHx) se sont avérés les plus actifs enregistrant des taux de sensibilité respectifs de 40 % et 26,66 %, donnant ainsi des diamètres maximums de 33,3 mm vis-à-vis de *B. cereus* et 17,66 mm contre *E. coli*.

À son tour, l'activité antifongique varie en fonction du type de l'extrait flavonoïque testé. Pour les extraits flavonoïques du mont de Tessala, les deux extraits d'acétate d'éthyle et aqueux sont les plus actifs avec des taux de sensibilité de 80 % et 70 % respectivement. TEAc donne le plus grand diamètre enregistré sur *C. albicans* (36,65 mm) et TEAq est le seul extrait qui a induit une inhibition totale de la croissance fongique chez *A. brasiliensis*. Les extraits hexanique et acétate d'éthyle de la forêt domaniale de M'sila sont les plus actifs avec des taux de sensibilité respectifs de 90 % et 70 %. Ces deux extraits provoquent une inhibition totale de la croissance fongique de *A. brasiliensis*. Il est à noter le remarquable effet antifongique de l'extrait aqueux sur *C. albicans* (32,7 mm). Les extraits méthanolique et acétate d'éthyle de Aïn Skhouna sont les plus actifs enregistrant des taux de sensibilité de 90 % et 70 %. Ces deux extraits provoquent une bonne activité vis-à-vis de *A. brasiliensis* induisant une inhibition totale de la croissance fongique pour le premier, et un diamètre d'inhibition de 32 mm pour le deuxième. Il est à noter aussi les importants diamètres d'inhibition de 28,36 mm et 29 mm enregistrés respectivement par l'extrait hexanique et chloroformique contre *C. albicans*.

Les différences notées dans les rendements d'extraction, dans la composition phytochimiques des différents extraits flavonoïques et dans les activités antimicrobiennes des extraits flavonoïques obtenus des trois localités d'échantillonnage sont dues probablement à l'effet combiné de plusieurs facteurs. Certains auteurs ont prouvé qu'une même plante poussant dans des conditions écologiques hétérogènes accumule des métabolites secondaires avec différentes caractéristiques (Huang et Guo, 2007 ; Guo *et al.*, 2013). En effet, les variations géographiques surtout l'altitude et l'exposition (Aherne *et al.*, 2009 ; Sudatti *et al.*, 2011), les facteurs climatiques résumés dans la température, les précipitations (Connam *et al.*, 2007), la teneur en éléments nutritifs des sols (Lumpkin *et al.*, 2005) ainsi que les divers stress environnementaux tels que le stress hydrique, salin et thermique (Zobayed *et al.*, 2005) sont à l'origine des variations quantitatives et qualitatives enregistrées dans les différents métabolites secondaires. Ces facteurs influencent sur les voies de biosynthèse des composés phénoliques de la plante (détaillé dans le chapitre II de la synthèse bibliographique) et par conséquent sur la proportion quantitative et qualitative

des polyphénols en général et des flavonoïdes en particulier (ceci a été confirmé par les résultats présentés dans la première partie de cette thèse) et peuvent induire par conséquent à des différences significatives en terme de diamètres d'inhibition enregistrées dans les tests antimicrobiens. Cela conduit donc à l'existence de différents chémotypes représentatifs de différentes localités d'échantillonnage. Aussi, c'est la nature du solvant organique utilisé pour l'extraction des flavonoïdes qui est à l'origine des différences trouvées en termes de rendement d'extraction, de composition chimique et du potentiel antimicrobien. Une influence expliquée par la majorité des auteurs par la polarité des différents solvants d'extraction. L'effet du solvant d'extraction sur le rendement d'extraction et sur le pouvoir antimicrobien a déjà été prouvé chez les parties aériennes de *Melia azedarach* (Sen et Batra, 2012) et de *Hibiscus sabdariffa* (Morales-Cabrera *et al.*, 2013) et chez les galles de *Quercus infectoria* (Syukriah *et al.*, 2014).

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est due aux différents principes chimiques présents dans ces extraits (Marjorie, 1999). Ainsi, l'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait (Essawi et Srour, 2000). Sur cela, Il n'est pas possible d'expliquer la cause précise des inhibitions des croissances microbiennes observées ; en effet, les différents extraits flavonoïques testés contiennent forcément de nombreuses molécules et nous ne pouvons pas savoir si l'inhibition de la croissance fongique et bactérienne est provoquée par une ou par plusieurs molécules. De nombreux groupes de chercheurs ont franchi une étape supplémentaire dans l'isolement et l'identification des composés flavonoïques possédant un véritable effet antimicrobien. Des flavonoïdes tels que l'apigénine (Khanna *et al.*, 1980 ; Sato *et al.*, 2000), la galangine (Nishino *et al.*, 1987 ; Afolayan et Meyer, 1997 ; Pepeljnjak et Kosalec, 2004), naringine et naringénine (Ng *et al.*, 1996 ; Rauha *et al.*, 2000), la lutéoline et (Miski *et al.*, 1983), la quercétine (Waage et Hedin , 1985 ; Arima et Danno , 2002), le kaempférol et ses dérivés (Jit et Nag, 1985 ; El-Gammal et Mansour, 1986 ; Pomilio *et al.*, 1992 ; Sakar *et al.*, 1992) et les chalcones (Gafner *et al.*, 1996 ; Chacha *et al.*, 2005) sont connus pour leurs remarquables activités antimicrobiennes.

D'autre part, la présence des deux classes flavonoïques (flavanes et flavanols) dans les extraits méthanoliques, hexaniques et d'acétate d'éthyle obtenus des trois localités d'échantillonnage peut expliquer le remarquable effet antimicrobien de ces extraits flavonoïques. La plupart des études menées dans ce contexte ont démontré que c'est la structure spéciale de ces deux classes flavonoïques qui est à l'origine de leurs remarquables activités antimicrobiennes. Tsuchiya *et al.* (1996) ont conclu que le type des substituants des flavanols a un rôle déterminant dans la qualité de l'activité antimicrobienne. Ils ont remarqué que les flavanols formés par des groupements hydroxyles en position 2', 4' au niveau du noyau aromatique B et/ou en position 5, 7 sur le noyau aromatique A sont de remarquables antimicrobiens. Aussi, plusieurs auteurs signalent que la remarquable inhibition de la

croissance microbienne induite par les flavanes et les flavanols est due essentiellement à la présence des groupements hydroxyles en positions 2, 4, 5 et 7 (Osawa *et al.*, 1992 ; Alcaraz *et al.*, 2000 ; Stapleton *et al.*, 2004). Bien qu'il y ait relativement peu d'études sur les mécanismes des activités antibactériennes des flavonoïdes, quelques travaux indiquent que les différentes molécules au sein de cette classe de composés phénoliques peuvent cibler différentes fonctions de la cellule bactérienne (Haraguchi *et al.*, 1998 ; Tsuchiya et Linuma , 2000). Certains auteurs ont prouvé que les flavonoïdes peuvent inhiber la synthèse des acides nucléiques. Mori *et al.* (1987) ont signalé que les flavonoïdes inhibent fortement la synthèse de l'ADN chez *Proteus vulgaris* et celle de l'ARN chez *Staphylococcus aureus*. Ohemeng *et al.* (1993) ont remarqué que la quercétine et l'apigénine inhibent la synthèse de l'ADN chez *E. coli*. D'autre part, certaines classes flavonoïques peuvent inhiber les fonctions de la membrane cytoplasmique des souches microbiennes ciblées. La naringénine réduit la fluidité des couches externe et interne des membranes cytoplasmiques (Tsuchiya et Linuma, 2000), alors que la catéchine peut endommager totalement ces membranes (Kono *et al.*, 1994).

Les dimensions des auréoles, obtenues lors de l'évaluation des activités antimicrobiennes des extraits flavonoïques, varient d'une manière très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) en fonction de la souche microbienne testée. Quelle que soit la localité de prélèvement des feuilles, *P. mirabilis* est la souche bactérienne la plus résistante aux extraits flavonoïques enregistrant des taux de résistance de 76 % (mont de Tessala), 96 % (Aïn Skhouna) et 100 % (forêt domaniale de M'sila). La plupart des auteurs associent la résistance de *P. mirabilis* aux extraits végétaux par sa résistance naturelle à une large gamme d'antibiotiques tels que les tétracyclines et les nitrofurantoïnes (Ngoune *et al.*, 2009). D'autres chercheurs expliquent que c'est la l'acquisition des pénicillinases et des B-lactamases qui est la cause principale de cette résistance (Hammer *et al.*, 2010). *E. coli* est moyennement résistante aux extraits flavonoïques parmi les souches bactériennes testées avec des taux de 68 % (Aïn Skhouna) et 72 % (mont de Tessala et forêt domaniale de M'sila). *B. cereus* est beaucoup moins résistant aux extraits flavonoïques induisant des taux de 20 % (mont de Tessala), 36 % (forêt domaniale de M'sila) et 60 % (Aïn Skhouna). Nous avons remarqué que les extraits flavonoïques testés sont moins actifs sur les bactéries à gram négatif (*P. mirabilis* et *E. coli*) que sur celles à gram positif (*B. cereus*). Ceci est du probablement aux différences structurales existantes entre les deux classes bactériennes, en relation surtout avec la nature et la structure des membranes bactériennes (Poole, 2001). Pour les deux souches fongiques testées, *A. brasiliensis* est la moins résistante à l'égard des extraits flavonoïques avec des pourcentages de 12 % (mont de Tessala), 16 % (forêt domaniale de M'sila) et 28 % (Aïn Skhouna). *C. albicans* est beaucoup plus résistant vis-à-vis des extraits flavonoïques enregistrant ainsi des taux de 40 % (mont de Tessala et Aïn Skhouna) et 44 % (forêt domaniale de M'sila). Plusieurs auteurs attribuent la forte résistance de *C. albicans* aux antifongiques à sa composition génétique (Yesland et Fonzi, 2000 ;

Cowen *et al.*, 2001 ; Goldman *et al.*, 2004). Les *Candidas* peuvent résister aux différents antifongiques soit par modification de la perméabilité de la cellule fongique aux agents antifongiques (Vanden Bosshe, 1992) ou par altération du transport de l'antifongique dans et/ou hors de la cellule (Rex *et al.*, 1995).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) diffèrent en fonction de l'extrait flavonoïque, de la localité d'échantillonnage et du type de la souche microbienne. À titre d'exemple, vis-à-vis de *A. brasiliensis*, l'extrait hénanique est caractérisé par des CMI de 12,5 µg/ml, 25 µg/ml et 50 µg/ml enregistrées respectivement par TEHx, SEHx et MEHx. Les plus fortes CMI sont enregistrées sur *A. brasiliensis*, elles sont évaluées à 6,25 µg/ml induit par SEBr et 12,5 µg/ml enregistré par TEAq, MEHx et MEAc. Sur les souches bactériennes testées, la plus forte CMI de 25 µg/ml est enregistrée vis-à-vis de *B. cereus* et ce, par tous les extraits flavonoïques du mont de Tessala (excepté TEAc), MEAq et SEHx. Les CMI restantes varient entre 50 µg/ml et 100 µg/ml. Aligiannis *et al.* (2001) ont proposé une classification des extraits végétaux sur la base des résultats des concentrations minimales inhibitrices, comme suit : forte inhibition (CMI inférieure à 500 µg/ml), inhibition modérée (CMI varie de 500 à 1 500 µg/ml) et faible inhibition (CMI supérieure à 1 600 µg/ml). Ainsi, selon cette classification, nous constatons une très forte inhibition (CMI ≤ 100 µg/ml) pour tous les tests réalisés.

Les diamètres d'inhibitions enregistrés par les extraits flavonoïques varient significativement (\*\*\*)  $p < 0,0001$  en fonction de la période d'échantillonnage. Une constatation vérifiée lors de la comparaison des diamètres d'inhibitions enregistrés vis-à-vis de la même souche bactérienne (*Escherichia coli* ATCC 25922) par les extraits flavonoïques obtenus des feuilles prélevées de la même localité d'échantillonnage (mont de Tessala) pendant deux différentes périodes de prélèvement, automne (novembre 2012 pour le test préliminaire) et printemps (mai 2013 pour l'étude de l'influence de la localité d'échantillonnage). En effet, *E. coli* était plus sensible aux extraits flavonoïques printaniers qui ont enregistré un diamètre d'inhibition maximum de 21,5 mm, qu'aux extraits flavonoïques automnaux qui ont donné des auréoles ne dépassant pas les 18 mm de diamètre. Cette variation est due probablement à la quantité des flavonoïdes dans les feuilles de *M. vulgare* prélevées du mont de Tessala dans la mesure où nous avons enregistré des concentrations moyennes en flavonoïdes beaucoup plus importantes au printemps qu'en automne. Aussi qualitativement, l'analyse des flavonoïdes des feuilles de *M. vulgare* par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inversée a révélé l'existence de 22 flavonoïdes au printemps contre 16 seulement en automne. La variation saisonnière de l'activité antimicrobienne des différents métabolites secondaires a été vérifiée par plusieurs chercheurs (Chokoe *et al.*, 2008 ; Hussain *et al.*, 2010 ; Ranwan et Yadav, 2012 ; Chaves *et al.*, 2013 ; Sartor *et al.*, 2013, De Souza *et al.*, 2014). La majorité de ces études expliquent que les variations quantitatives et qualitatives du principe actif testé en fonction des saisons de prélèvement, dues essentiellement aux paramètres climatiques

(température et précipitations), sont à l'origine des fluctuations saisonnières enregistrées en termes d'activité antimicrobienne

Les diamètres d'inhibitions enregistrés par les extraits flavonoïques des différentes localités d'échantillonnage sont comparables à ceux obtenus par l'antifongigramme et l'antibiogramme. C'est le cas chez *B. cereus* où les antibiotiques commercialisés ont donné des zones d'inhibitions ne dépassant pas les 30 mm de diamètre. En effet, tous les extraits flavonoïques du mont de Tessala (sauf l'extrait hénanique) et les deux extraits hénanique et d'acétate d'éthyle de Aïn Skhouna ont été plus actifs vis-à-vis de *B. cereus* donnant des diamètres d'inhibitions de 34,3 mm. *C. albicans* était totalement résistant aux trois antifongiques testés, par contre tous les extraits flavonoïques analysés ont enregistré au moins une auréole vis-à-vis de cette levure, avec un diamètre d'inhibition maximum de 36,65 mm noté avec l'extrait d'acétate d'éthyle du mont de Tessala. L'amphotéricine B et la terbinafine ont inhibé totalement de la croissance de *A. brasiliensis*, une inhibition est induite également par TEAq, SEBr, MEHx et MEAc. Le contraire a été remarqué chez *E. coli* et *P. mirabilis* où les antibiotiques testés ont donné un diamètre d'inhibition maximum de 30 mm vis-à-vis de *E. coli* et une inhibition totale de la croissance chez *P. mirabilis*. Sur ces deux souches bactériennes, les extraits flavonoïques analysés étaient beaucoup moins actifs avec des diamètres maximums respectifs de 21,5 mm (TEAc) et 15,16 mm (TEAq) vis-à-vis de *E. coli* et *P. mirabilis*.

Il est très difficile de comparer nos résultats avec ceux obtenus dans les études antérieures car plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer le pouvoir antimicrobien des flavonoïdes et qui sont à l'origine des écarts trouvés dans la bibliographie. À titre d'exemple, Basile *et al.* (2000) ont démontré que l'apigénine n'avait aucune activité contre *Staphylococcus aureus* à des concentrations allant jusqu'à 128 µg/ml, tandis que Sato *et al.* (2000) ont prouvé que l'apigénine inhibe la croissance de cinq différentes souches de *Staphylococcus aureus* à des concentrations comprises entre 3,9 µg/ml et 15,6 µg/ml. Aussi, la méthode utilisée dans la présente étude, la méthode de diffusion en milieu solide, bien qu'elle soit le plus souvent utilisée car elle assure une bonne croissance des souches microbiennes testées et donne des résultats clairs et facilement interprétables (Horikawa *et al.*, 1999 ; Woo *et al.*, 2002), par contre, elle ne peut pas donner le véritable effet antimicrobien, car un puissant flavonoïde peut avoir un taux faible de diffusion (Osawa *et al.*, 1992 ; Zheng *et al.*, 1996). D'autres méthodes sont plus fiables y compris la technique de dilution d'agar (Tsuchiya *et al.*, 1996), la méthode des plaques (Tereschuk *et al.*, 1997), la méthode des cylindres (Rauha *et al.*, 2000) et la technique de micro et de macrodilution (Liu *et al.*, 2000). Aussi, d'autres facteurs sont impliqués dans les différences enregistrées dans l'évaluation du pouvoir antimicrobien. Nous pouvons citer la taille de l'inoculum bactérien (Ng *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 1999), le type de bouillon ou de l'agar (Yee *et al.*, 2000), le volume de bouillon ou de l'agar (Sakanaka *et al.*, 1989), la taille des puits (Al-Saleh *et al.*, 1997), la taille des disques de papier (Khanna *et al.*, 1980), le type de la souche microbienne (Bashir

*et al.*, 1994), la période d'incubation (Li *et al.*, 1989 ; Silver *et al.*, 1990) et le solvant utilisé pour dissoudre le principe actif testé (Faizi et Ali, 1999).

Néanmoins, nous pouvons citer à titre indicatif, quelques travaux réalisés pour l'évaluation des activités antimicrobiennes des extraits flavonoïques de quelques plantes médicinales. Alka et Padma (2013) ont prouvé que le pouvoir antimicrobien des extraits flavonoïques de *Tridax procumbens* L. varie significativement en fonction de l'organe végétal analysé (pédicules et bourgeons) ; ils ont enregistré des diamètres maximums de 13,5 vis-à-vis de *E. coli*, 9,6 mm sur *P. mirabilis* et 10 mm contre *C. albicans*. Alca *et al.* (2012) ont prouvé chez *C. albicans* que les extraits flavonoïques des tiges ayant induit un diamètre d'inhibition maximum de 14 mm par rapport à celui enregistré par les extraits des feuilles et des racines (12 mm chacun). Vis-à-vis de *E. coli*, les extraits flavonoïques des tiges de *Antiaris africana* de *Antiaris africana* enregistrent de faibles diamètres d'inhibition ne dépassant pas les 9,5 mm (Banso et Mann, 2008). Chebouat *et al.* (2014) ont remarqué que les différentes fractions flavonoïques des feuilles et des fleurs de *Ephedra alata* présentent une activité antibactérienne modérée avec des diamètres d'inhibition maximums de 13 mm vis-à-vis de *E. coli* et 15 mm sur *B. cereus*. Chye et Hoh (2007) ont prouvé que les flavonoïdes extraits des feuilles de *Camellia sinensis* enregistrent un diamètre d'inhibition maximum de 16 mm vis-à-vis de *E. coli*. Les flavonoïdes extraits des feuilles de *Pelargonium radula* enregistrent des diamètres d'inhibitions maximums respectifs de 9 mm et 11 mm vis-à-vis de *C. albicans* et de *E. coli* (Pepeljnjak *et al.*, 2005). Mamadalieva *et al.* (2011) ont évalué les concentrations minimales inhibitrices de quelques standards flavonoïques vis-à-vis de *E. coli* ; elles sont de 50 µg/ml pour l'apéginine et le cynaroside. Akroum *et al.* (2009) ont enregistré des CMI's respectives de 80 µg/ml, 90 µg/ml et 95 µg/ml avec la quercétine, l'apéginine et le kaempférol vis-à-vis de *E. coli*, et des CMI's respectives de 50 µg/ml, 80 µg/ml, 90 µg/ml et 95 µg/ml avec la quercétine, l'apéginine, le kaempférol et le lutéolin sur *B. cereus*. L'extrait flavonoïque des feuilles de *Marrubium globosum* a enregistré une CMI de 32 µg/ml vis-à-vis de *E. coli* et de *P. mirabilis* (Rigano *et al.*, 2007) et celui des feuilles de *Mentha longifolia* a donné une CMI de 180 µg/ml sur *B. cereus* (Akroum *et al.*, 2009). Les extraits flavonoïques des pédicules *Tridax procumbens* ont enregistré une CMI de 31,2 µg/ml vis-à-vis de *E. coli* et de *C. albicans* et une CMI de 62,5 µg/ml sur *P. mirabilis* (Alka et Padma, 2013).

### III.2.2.2. Activités antioxydantes

L'activité antioxydante des extraits flavonoïques des feuilles de *M. vulgare* des trois localités d'échantillonnage est exprimée en pourcentages d'inhibition et en concentrations inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>). Ces deux paramètres ont été employés par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter l'activité antioxydante de différents métabolites secondaires extraits de diverses plantes (Atoui *et al.*, 2005 ; Canadanovic-Brunet *et al.*, 2005 ; Chatha *et al.*, 2006 ; Bertoncej *et al.*, 2007 ; Kumaran et Joel Karunakaran, 2007 ; Wang *et al.*, 2008b).

Plusieurs auteurs ont rapporté que l'activité antioxydante de *M. vulgare* est due essentiellement aux huiles essentielles qui ont une capacité importante d'agir comme donateurs d'atomes d'hydrogènes ou d'électrons, et par conséquent la formation de la coloration jaune était attribuée à la présence de nombreuses molécules bioactives telles que : les monoterpènes oxygénés, le mélange de mono et sesquiterpènes hydrocarbures,  $\beta$ -citronellol, thujones, camphre,  $\beta$ -bisabolène et l'eugénol (Orhan *et al.*, 2010 ; Kadri *et al.*, 2011). D'autre part, les groupements ortho-diphénoliques des phénylpropanoïdes présents dans les parties aériennes de *M. vulgare* leur confèrent une remarquable activité antioxydante (Wojdylo *et al.*, 2007 ; Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014). En outre, *M. vulgare* contient un autre phénylpropanoïde non glycosylé, l'acide (+) (E)-caffeoyle-L-malique, qui peut participer activement dans l'activité antioxydante de la plante (Sahpaz *et al.*, 2002). Par contre l'effet de la localité d'échantillonnage sur le pouvoir antioxydant des extraits flavonoïques de *M. vulgare* n'a jamais été entrepris.

L'activité antioxydante des extraits flavonoïques de *M. vulgare* varie significativement (\*\**p* < 0,0001) selon la nature de l'extrait flavonoïque. Les forts pourcentages d'inhibition du radical stable (DPPH) sont obtenus par les extraits méthanoliques (extraits bruts), avec des pourcentages respectifs de 95,74 %, 95,94 % et 98,81 % pour TEBr, SEBr et MEBr. Les deux extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyle ont enregistré à leurs tours des pourcentages d'inhibition élevés variant entre 91,68 % et 97,99 %. Par contre, les plus faibles pourcentages d'inhibition, ne dépassant pas les 74,10 %, sont toujours enregistrés par les extraits hexaniques et aqueux. Aussi, les concentrations minimales inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>) qui expriment les concentrations des extraits flavonoïques exigées pour réduire 50 % de DPPH en solution, varient en fonction du type d'extrait flavonoïque. Selon Kadri *et al.* (2011), une valeur faible de CI<sub>50</sub> implique une forte activité antioxydante. En effet, les plus fortes CI<sub>50</sub> sont notées chez les extraits méthanolique (33,7  $\mu$ g/ml pour TEBr, 52,7  $\mu$ g/ml pour MEBr et 124,18  $\mu$ g/ml pour SEBr), chloroformique (35,43  $\mu$ g/ml pour TECh, 42,67  $\mu$ g/ml pour MECh et 47,67  $\mu$ g/ml pour SECh) et d'acétate d'éthyle (56,61  $\mu$ g/ml pour SEAc, 57,99  $\mu$ g/ml pour MEAc et 103,45  $\mu$ g/ml pour TEAc), tandis que les plus faibles caractérisent les extraits hexanique (343,89  $\mu$ g/ml pour TEHx, 351,83  $\mu$ g/ml pour MEHx et 773,65  $\mu$ g/ml pour SEHx) et aqueux (370,77  $\mu$ g/ml pour MEAq, 380,09  $\mu$ g/ml pour SEaq et 382,01  $\mu$ g/ml pour TEaq).

Il est impossible de sélectionner un solvant organique standard destiné à l'extraction des antioxydants végétaux (Addai *et al.*, 2013). Plusieurs solvants organiques, à de différentes concentrations, tels que l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le propanol et l'acétate d'éthyle ont été utilisés pour l'extraction des substances antioxydantes à partir de fruits, des légumes et des plantes médicinales et aromatiques (Mahattanatawee *et al.*, 2006 ; Alothman *et al.*, 2009b). Ghedadba *et al.* (2014) ont prouvé que l'extrait méthanolique des sommités fleuries de *M. vulgare* présente une forte activité antioxydante par rapport aux extraits aqueux, d'éther de pétrole et du dichlorométhane. Aussi, Pukalskas *et al.* (2012) ont démontré que l'extrait méthanolique des parties aériennes de *M. vulgare* présente une importante activité antioxydante par rapport aux extraits hexanique et butanolique. Yumrutas et Saygideger, (2010) ont noté que l'extrait hexanique a donné une très faible activité antioxydante par rapport à celle retrouvée en présence de l'extrait méthanolique de *Marrubium parviflorum*. Edziri *et al.* (2012) soulignent que l'extrait méthanolique des feuilles de *Marrubium deserti* est l'extrait qui a enregistré la plus forte activité antioxydante par rapport aux extraits chloroformique, butanolique, d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle. Par contre, Orhan *et al.* (2010) affirment que l'extrait acétonique de *M. vulgare* est beaucoup plus actif que l'extrait méthanolique. Vermerris et Nicholson (2006) révèlent que c'est la complexité des extraits méthanoliques en substances phénoliques en général et en classes flavonoïques en particulier ainsi que la synergie de ces molécules qui est probablement à l'origine de leurs remarquable effet antioxydant. Une complexité prouvée par les screening phytochimiques dans la mesure où les extraits méthanoliques des différentes localités d'échantillonnage étaient les mieux représentés en composés phénoliques par rapport aux autres extraits flavonoïques. La plupart des études menées dans ce contexte expliquent la variation de l'activité antioxydante en fonction des solvants d'extraction par la polarité de ces derniers qui influe sur les rendements d'extraction et par conséquent sur la composition phytochimique et sur le potentiel antioxydant (Barwick, 1997 ; Kolar *et al.*, 2002 ; Tiwari *et al.*, 2011 ; Zubair *et al.*, 2012 ; Mijanor *et al.*, 2013 ; Syukriah *et al.*, 2014 ; Teh *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2014). Certains auteurs ont suggéré que la variation de l'activité antioxydante en fonction des solvants d'extraction est due essentiellement à la variabilité dans leurs profils d'absorbance de DPPH (Shizuka et Kawabata, 2005 ; Sharma et Bhat, 2009). Autres chercheurs ont démontré qu'il existe une corrélation linéaire entre l'activité antioxydante et l'intensité de la couleur de l'extrait ; ils ont remarqué qu'un extrait de couleur foncée a une teneur élevée en polyphénols et par conséquent une forte activité antioxydante (Frankel *et al.*, 1998 ; Beretta *et al.*, 2005). Une constatation révélée dans notre étude dans la mesure où les extraits (bruts, chloroformiques et d'acétate d'éthyle) qui ont enregistré une forte activité antioxydante sont dotés de couleurs foncées par rapport aux extraits (hexaniques et aqueux) caractérisés par des couleurs beaucoup plus claires et de faibles activités antioxydantes.

Les extraits flavonoïques testés présentent une activité antioxydante dose-dépendante présentant des courbes de même allure et qui implique la même interprétation. Plus nous

augmentons la concentration de l'extrait flavonoïque, plus l'activité antioxydante augmente jusqu'à atteindre un palier. Ghedadba *et al.* (2014) expliquent ce phénomène par le transfert de(s) électron(s) célibataire(s) qui sont localisés dans l'orbitale externe du DPPH, et après avoir atteint une concentration donnée, l'antioxydant va réagir complètement avec le radical, et quand nous augmentons la concentration, l'activité antioxydante reste constante puisque cela s'accompagne par la saturation des couches électroniques du radical. Ces résultats sont confirmés par les tests de corrélation de Pearson ayant donné des corrélations négatives entre les concentrations moyennes en phénols totaux et les  $CI_{50}$  ( $R = -0,840$ ) et entre les concentrations moyennes en flavonoïdes et les  $CI_{50}$  ( $R = -0,884$ ). Ces corrélations confirment que les  $CI_{50}$  diminuent avec l'augmentation des concentrations en phénols totaux et en flavonoïdes, ce qui donne une bonne activité antioxydante. Ces données sont conformes aux résultats de certaines recherches ayant rapportées une telle corrélation entre les concentrations en composés phénoliques et le piégeage du radical stable DPPH sur plusieurs espèces végétales (Cai *et al.*, 2004 ; Dorman *et al.*, 2004 ; Surveswaran *et al.*, 2007 ; Tatiya *et al.*, 2011 ; Heleno *et al.*, 2012 ; Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014 ; Bakchiche et Gherib, 2014).

La localité d'échantillonnage influe d'une manière très hautement significative ( $***p < 0,0001$ ) sur les pourcentages d'inhibition du radical stable DPPH. En général, les extraits flavonoïques de M'sila ont enregistré les pourcentages d'inhibition les plus élevés, suivis par ceux de Ain Skhouna et du mont de Tessala. C'est le cas par exemple des extraits méthanoliques, chloroformiques et d'acétate d'éthyle. D'autre part, les concentrations minimales inhibitrices 50 ( $CI_{50}$ ) diffèrent en fonction de la localité d'échantillonnage. En général, les  $CI_{50}$  les plus importantes sont notées pour les extraits flavonoïques du mont de Tessala suivies respectivement par celles enregistrées pour les extraits flavonoïques de la forêt domaniale de M'sila et de Ain Skhouna. Cette constatation a été vérifiée pour les extraits méthanoliques, hexanique et d'acétate d'éthyle. La variation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques en fonction de la localité d'échantillonnage des parties aériennes de *M. vulgare* a été vérifiée dans les travaux de Chouaieb *et al.* (2012) réalisés sur trois localités tunisiennes (Matmata, Thoujene et Melloulech). En plus, beaucoup d'autres travaux ont confirmé l'influence de la localité d'échantillonnage sur l'activité antioxydante, c'est le cas chez *Helicteres isora* (Jain *et al.*, 2014), *Musa acuminata* (Babu *et al.*, 2012), *Vitis vinifera* (Genova *et al.*, 2012), *Prunus armeniaca* (Vinha *et al.*, 2012) et *Cucuma longa* (Green et Mitchell, 2014). Plusieurs auteurs expliquent que l'influence de la localité d'échantillonnage sur l'activité antioxydante est due essentiellement aux variations édaphiques et climatiques qui conduisent à des différences dans la composition chimique des métabolites bioactifs et éventuellement d'autres composants mineurs, qui peuvent agir en synergie et d'accroître l'action antioxydante (Ghedolf *et al.*, 2002 ; Bhojar *et al.*, 2011 ; Pineli *et al.*, 2012). D'autres chercheurs affirment que ces variations peuvent être liées à différents facteurs, tels que l'humidité et l'altitude (Perna *et al.*, 2014) le rayonnement solaire

et la température (Yu *et al.*, 2003 ; Yu *et al.*, 2004 ; Zhou *et al.*, 2004) qui affectent l'état physiologique de la plante, et ainsi la biosynthèse phénolique et par conséquent la production des antioxydants.

Les standards phénoliques testés ont enregistré de très bonnes concentrations inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>). L'acide gallique est l'antioxydant le plus puissant avec une CI<sub>50</sub> = 53,32 µg/ml, suivi respectivement par l'acide ascorbique, la catéchine, l'acide caféique et l'acide tannique avec des CI<sub>50</sub> de 63,89 µg/ml, 85,57 µg/ml, 148,16 µg/ml et 149,49 µg/ml. En comparant ces CI<sub>50</sub> avec celles enregistrées par les extraits flavonoïques, nous remarquons que TEBr, TECh, MEBr, MECh et SECh avec des C<sub>150</sub> respectives de 33,7 µg/ml, 35,43 µg/ml, 52,7 µg/ml, 42,76 µg/ml et 47,67 µg/ml sont plus puissants que les standards phénoliques analysés. Ces résultats approuvent l'efficacité antioxydante des extraits flavonoïques de *M. vulgare* ; ces derniers peuvent être valorisés dans le domaine thérapeutique comme antioxydants naturels.

Il est très difficile de comparer les résultats obtenus avec ceux de la bibliographie. En effet, l'activité antioxydante des extraits végétaux est influencée par plusieurs facteurs tels que la méthode d'extraction (Heimler *et al.*, 2006 ; Parente *et al.*, 2013), les solvants d'extraction (Tiwari *et al.*, 2011), les conditions de séchage (Hossain *et al.*, 2010), l'organe végétal analysé (Dominguez-Avila *et al.*, 2013 ; Jain *et al.*, 2014), le stade végétatif (Chouaieb *et al.*, 2012), la saison de prélèvement (Howard *et al.*, 2003 ; Ni *et al.*, 2012) et les stress environnementaux (Alexieva *et al.*, 2001 ; Herbingner *et al.*, 2002). D'autre part, en raison du manque de travaux se rapportant à l'évaluation de l'activité antioxydante des flavonoïdes extraits à partir des plantes du même genre (*Marrubium*) ou de la même famille (Lamiacées) de l'espèce ici étudiée, nous nous sommes contentés de donner à titre informatif quelques résultats des activités antioxydantes des flavonoïdes obtenus à partir d'autres espèces végétales, et quelques travaux réalisés sur des extraits bruts ou autres principes actifs du genre *Marrubium* et de la famille des Lamiacées.

Vladimir-Knezevic *et al.* (2014) ont étudié l'activité antioxydante des extraits éthanoliques de 26 plantes appartenant à la famille des lamiacées, ils ont enregistré des CI<sub>50</sub> respectives de 17,50 µg/ml, 18,61 µg/ml, 31,62 µg/ml, 11,82 µg/ml, 4,81 µg/ml, 7,25 µg/ml et 15,67 µg/ml chez les parties aériennes de *Acinos arvensis*, les parties aériennes de *Calamintha sylvatica*, les fleurs de *Lavandula angustifolia*, les parties aériennes de *Marrubium incanum*, les feuilles de *Salvia officinalis*, les parties aériennes de *Thymus vulgaris* et les parties aériennes de *Teucrium polium*. Chouaieb *et al.* (2012) ont enregistré chez les extraits éthanoliques de *M. vulgare* des CI<sub>50</sub> allant de 0,25 mg/ml à 0,68 mg/ml. Cigremis *et al.* (2009) ont comptabilisé une CI<sub>50</sub> de 263 µg/ml chez l'extrait méthanolique de *Marrubium cordatum*. Stankovic (2011) a évalué chez l'extrait méthanolique de *Marrubium peregrinum* une CI<sub>50</sub> de 187,41 µg/ml. Alimpic *et al.* (2014) ont analysé l'activité antioxydante des extraits éthanoliques et méthanoliques des différentes parties de *Salvia amplexicaulis*, ils ont enregistré des CI<sub>50</sub> de 23,27 µg/ml, 26,08 µg/ml et 28,42 µg/ml respectivement chez les extraits méthanoliques des

feuilles, des tiges et des fleurs et des  $CI_{50}$  de 16,06  $\mu\text{g/ml}$ , 22,53  $\mu\text{g/ml}$ , 32,29  $\mu\text{g/ml}$  pour les extraits éthanoliques des feuilles, des tiges et des fleurs. Barros *et al.* (2010) ont enregistré des  $CI_{50}$  de 0,39 mg/ml, 0,16 mg/ml et 0,69 mg/ml respectivement chez les extraits méthanoliques des feuilles de *Glechoma hederacea*, *Origanum vulgare* et *Thymus mastichina*. Khomdram et Singh (2011) ont enregistré des  $CI_{50}$  respectives de 17,69  $\mu\text{g/ml}$ , 38,29  $\mu\text{g/ml}$ , 20,73  $\mu\text{g/ml}$ , 11,67  $\mu\text{g/ml}$ , 23,16  $\mu\text{g/ml}$ , 14,32  $\mu\text{g/ml}$  et 28,63  $\mu\text{g/ml}$  chez les extraits méthanoliques des parties aériennes de *Elsholtzia blanda*, *Elsholtzia communis*, *Elsholtzia stachyodes*, *Hyptis suaveolens*, *Ocimum americanum*, *Ocimum basilicum* et *Perilla frutescens*.

Sasikumar *et al.* (2010) ont enregistré une  $CI_{50}$  de 61,90  $\mu\text{g/ml}$  chez les extraits flavonoïques des feuilles de *Nyctanthes arbortristis*. Sun *et al.* (2011) ont noté une  $CI_{50}$  de 41,58  $\mu\text{g/ml}$  chez les extraits flavonoïques des feuilles de *Diospyros kaki*. Ru *et al.* (2012) ont comptabilisé sur les extraits flavonoïques des feuilles de *Nicotiana tabacum* une  $CI_{50}$  de 235  $\mu\text{g/ml}$ . L'effet antioxydant des flavonoïdes n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (Rodriguez-Bernaldo *et al.*, 2009). Il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols (Javanovic *et al.*, 1994). De nombreuses études ont établi la relation entre la structure et l'activité antiradicalaire des flavonoïdes (Van Acker *et al.*, 1996 ; Cos *et al.*, 1998 ; Cotelle, 2001 ; Seyoum *et al.*, 2006). Toutefois, il est bien admis que l'activité antioxydante des flavonoïdes est nettement influencée par le nombre et la position des groupements hydroxyles sur les cycles aromatiques A et B (Firuzi *et al.*, 2004). Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (Heim, *et al.*, 2002) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (De Pinedo *et al.*, 2007), ce qui peut expliquer en partie la faible activité antioxydante du tyrosol qui ne possède qu'un seul groupement hydroxyle dans sa structure. L'effet antioxydant des flavonoïdes est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyles (Siddhuraju et Becker, 2007). En outre, dans le but d'identifier les sites potentiels au sein des flavonoïdes qui sont responsables de l'effet antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH, plusieurs travaux ont étudié la cinétique et le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ce radical stable. Amic *et al.* (2003) ont mis en évidence la relation structure fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements hydroxyles sur le cycle B.

## **Conclusions et perspectives**

La présente thèse a pour objectif une étude écobiochimique de *Marrubium vulgare* L. en provenance de quatre localités de l'Oranie algérien. Elle a porté essentiellement sur la quantification des composés phénoliques caractérisant le taxon étudié en fonction des conditions d'extraction et des paramètres environnementaux ; la séparation par chromatographie liquide à haute performance des acides phénoliques et des flavonoïdes contenus dans les feuilles et l'évaluation de leur pouvoir antibactérien, antifongique et antioxydant.

L'étude de l'optimisation des conditions d'extractions de quelques composés phénoliques à partir des feuilles de *M. vulgare* montre que les paramètres expérimentaux testés (nature du solvant organique et sa concentration, temps et température d'extraction) influent nettement sur les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés dans les feuilles, avec des différences très hautement significatives ( $***p < 0,001$ ). Aussi, nous avons pu définir les conditions d'extraction optimales permettant l'obtention de meilleurs rendements de quelques polyphénols contenus dans les feuilles. En effet, les teneurs maximales en phénols totaux ( $293 \pm 14,60$  mg EAG/g) sont obtenues par le méthanol 60 % à 25 °C pendant 180 min, en flavonoïdes ( $79,52 \pm 0,55$  mg EC/g) par le méthanol 80 % à 20 °C pendant 450 min et, en tanins condensés ( $28,15 \pm 0,80$  mg EC/g) par l'acétone 60 % à 50 °C pendant 180 min. Ces teneurs mettent en valeur la richesse de *M. vulgare* en ces métabolites secondaires, si bien que cette espèce reste peu étudiée comparativement à d'autres espèces appartenant à la même famille taxinomique (les lamiacées) et moins fréquentes comme le thym et la sauge. Nos résultats apportent une certaine confirmation sur l'effet de la variabilité des protocoles d'extraction et de dosage sur la quantité des composés phénoliques enregistrés, et renforcent les travaux antérieurs réalisés dans ce contexte. Ce travail est loin d'être exhaustif dans la mesure où d'autres paramètres expérimentaux peuvent être testés, comme le rapport solvant-soluté, le nombre des extractions et la nature de la méthode d'extraction.

D'autre part, les paramètres environnementaux résumés dans les variables stationnelles (altitude et exposition) de la localité de prélèvement et la période d'échantillonnage (saison et mois), en plus du critère anatomique (organe végétatif analysé) influencent nettement ( $***p < 0,001$ ) sur les concentrations en composés phénoliques dosés. Les concentrations maximales enregistrées sur les différents organes de *M. vulgare* et particulièrement sur les feuilles et les fleurs, confirment la richesse de la plante ici étudiée en ces métabolites secondaires et certifient l'utilisation de ces différents organes en médecine traditionnelle pour divers problèmes de santé. D'autre part, selon les résultats de cette étude et afin de maximiser les rendements en composés phénoliques analysés, il est conseillé de prélever les différents organes de *M. vulgare* poussant en Oranie algérien pendant les deux saisons les plus chaudes (printemps et été). L'étude de l'influence des paramètres environnementaux telle qu'elle est présentée dans la présente thèse est loin d'être parfaitement exhaustive. En effet, d'autres conditions peuvent être prises en considération

dans nos prochaines investigations telles que le dosage des éléments minéraux dans la plante et dans le sol, les métaux lourds présents dans le sol, la taille et l'âge des organes analysés. Aussi, des prélèvements chaque semaine, pendant un intervalle de temps important (deux ou trois ans) ou l'étude de la plante en provenance d'autres régions sont des paramètres à ne pas négliger.

Les tests de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) montrent que la composition phénolique des feuilles de *M. vulgare* en acides phénoliques et en flavonoïdes est influencée par la localité d'échantillonnage et la saison de prélèvement. Généralement, les extraits de la région de Aïn Skhouna et de la forêt domaniale de M'sila renferment un nombre élevé de composés phénoliques par rapport à ceux du mont de Tessala et Béni Saf. Les deux saisons de printemps et d'été sont les mieux représentées en polyphénols contrairement à l'automne et l'hiver. En se référant aux temps de rétention des standards phénoliques testés, il ressort la présence probable de certains acides phénoliques comme les acides chlorogénique, ellagique, hydrocinnamique, tannique, férulique et la vanilline et, de quelques flavonoïdes représentés par la diosmine, la catéchine, la naringinine, la lutéoline, le kaempférol, la nibilétine et la diosmétine. La présence probable de ces acides phénoliques et flavonoïdes dans les feuilles de *M. vulgare*, nous emmène dans nos futurs travaux à quantifier avec précision ces composés phénoliques et de les séparer afin de tester leurs activités biologiques.

Les tests de l'activité antimicrobienne des extraits flavonoïques des feuilles de *M. vulgare* vis-à-vis de quatre souches bactériennes et deux souches fongiques montre que l'effet antimicrobien des extraits flavonoïques varie en fonction du type d'extrait flavonoïque et de ses concentrations, de la résistance ou la sensibilité des souches utilisées. L'extrait méthanolique et l'extrait hexanique se sont avérés de bons bactériostatiques et fongostatiques enregistrant des diamètres d'inhibition allant de 5,3 mm à 31,6 mm, ce qui a produit des taux de sensibilité variant entre 30 % à 60 % chez les souches microbiennes étudiées. Les concentrations minimales inhibitrices enregistrées justifient d'une part l'importante activité antimicrobienne des flavonoïdes du marrube blanc et d'autre part son efficacité thérapeutique. D'autre part, l'activité antimicrobienne des extraits flavonoïques varie nettement ( $***p < 0,001$ ) en fonction de la localité d'échantillonnage et de la saison de prélèvement dans la mesure où des différences très hautement significatives ont été enregistrées entre les différentes localités d'échantillonnage (mont de Tessala, forêt domaniale de M'sila et Aïn Skhouna) et entre les deux saisons de prélèvement (automne et printemps). Par ailleurs, le screening phytochimique a permis d'apporter un complément sur le profil phytochimique de l'espèce étudiée, marqué par la présence de deux classes flavonoïques, les flavanes et les flavanols, qui seraient responsables du pouvoir antimicrobien du marrube blanc. Ces résultats confortent l'utilisation du marrube blanc en médecine traditionnelle comme antiseptique et offrent à la médecine occidentale un potentiel qui peut être valorisé dans plusieurs domaines tels que les industries pharmacologiques.

Les tests de piégeage du radical stable (DPPH) montrent que l'activité antioxydante des extraits flavonoïques des feuilles de *M. vulgare* varie d'une manière très hautement significative en fonction du type de l'extrait flavonoïque, sa concentration et la localité d'échantillonnage. Les concentrations minimales inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>) varient de 22,7 µg/ml à 773,65 µg/ml et dépassent souvent celles enregistrées par les standards phénoliques. Les résultats obtenus confirment la richesse du marrube blanc en antioxydants naturels qui peuvent être exploités dans l'industrie pharmacologique. Pour la confirmation de ces résultats, d'autres tests *in vitro* tels que le test de blanchiment du β-carotène ou même *in vivo* sur des rats winstar peuvent être entrepris dans nos prochains travaux.

## **Références bibliographiques**

**A**

- Abadi, A., & Hassani, A. (2013). Chemical composition of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Algeria. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 8(3), 210-214.
- Abdelguerfi, A., & Laouar, M. (1999). Autoécologie et variabilité de quelques légumineuses d'intérêt fourrager et/ou pastoral : possibilités de valorisation en région méditerranéenne. *Pastagense Forragens*, 20, 81-112.
- Aboura, R., Benmansour, D., & Benabadji, N. (2006). Comparaison et phytoécologie des Atriplexaies en Oranie (Algérie). *Ecologia mediterranea*, 32, 73-84.
- Acikara, O.B., Citoglu, G.S., & Ozkan, A.M.G. (2013). Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in *Scorzonera tomentosa* L. *Turk J. Pharm. Sci.*, 10(1), 1-8.
- Adams, C., & Brantner, V. (2006). Estimating the cost of new drug development: is it really \$802 million?. *Health Affairs*, 25(2), 420-428.
- Addai, Z.R., Abdullah, A., & Mutalib, S.A. (2013). Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(47), 3354-3359.
- Administration des Eaux et Forêts de la conservation d'Oran « A.E.F.C.O », (1961). Fascicule de gestion de la forêt domaniale de M'sila de 1861 à 1951. Cantonnement d'Oran, 69 p.
- Afolayan, A.J., & Meyer, J.J. (1997). The antimicrobial activity of 3,5,7- trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.*, 57, 177-181.
- Agastian, P., Kingsley, S.J., & Vivekanandan, M. (2003). Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica*, 38(2), 287-290.
- Agrawal, P.K., & Markham, K.R. (1989). Carbon-13 NMR of flavonoids. New York: Edition Elsevier, 507 p.
- Aherne, S.A., Jiwan, M.A., Daly, T., & O'Brien, N.M. (2009). Geographical Location has Greater Impact on Carotenoid Content and Bioaccessibility from Tomatoes than Variety. *Plant Food Hum.Nutr.*, 64(4), 250-256.
- Aime, S. *Etude écologique de la transition entre les bioclimats sub-humide, semi-aride et aride dans l'étage thermo-méditerranéen du Tell Oranais (Algérie Occidentale)*. Thèse de Doctorat. Marseille : Es. Sci. Uni. Aix-Marseille III, 1991, 189 p.
- Akowuah, G.A., Mariam, A., & Chin, J.H. (2009). The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. *Pharmacognosy Magazine*, 5, 81-85.
- Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D., & Lalaoui, K. (2009). Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 4(2), 93-96.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albert, A., Sareedenchai, V., Heller, W., Seidlitz, H.K., & Zidorn, C. (2009). Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. *Oecologia*, *160*, 1-8.
- Albertson, G.D., Niimi, M., Cannon, R.D., & Jenkinson, H.F. (1996). Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, *40*, 2835-2841.
- Alcamo, E.I. (1984). *Fundamentals of Microbiology*. London : Addison-Wesly publishing company, 689 p.
- Alcantara, G.A., Borges, L.L., & De Paula, L.L. (2012). Seasonal variation in the content of phenolic compounds in barks of *Myrcia rostrata* DC. by influence of environmental factors. *Journal of Pharmacy Research*, *5*(3), 1306-1309.
- Alcaraz, L.E., Blanco, S.E., Puig, O.N., Tomas, F., & Ferretti, F.H. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theor. Biol.*, *205*, 231-240.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.*, *24*, 1447-1344.
- Al-Farsi, M.A., & Lee, C.Y. (2007). Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds. *Journal of Food Chemistry*, *108*, 977-985.
- Alfaro, S., Mutis, A., Palma, R., Quiroz, A., Seguel, I., & Scheuermann, E. (2013). Influence of genotype and harvest year on polyphenol content and antioxidant activity in murtilla (*Ugni molinae* Turcz) fruit. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *13*(1), 67-78.
- Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res. Int.*, *41*, 1-15.
- Aliγιannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, *40*, 4168-4170.
- Alimpic, A., Oaldje, M., Matevski, V., Marin, P.D., & Duletic-Lausevic, S. (2014). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Salvia amplexicaulis* Lam. extracts. *Arch. Biol. Sci.*, *66*(1), 307-316.
- Alka, J.I., Padma, K., & Chitra, J. (2012). Antifungal activity of flavonoids of *Sida acuta* Burm f. against *Candida albicans*. *International Journal of Drug Development & Research*, *4*(3), 92-96.
- Alka, J., & Padma, K. (2013). Antimicrobial potential of flavonoids of *Tridax procumbens* L. against pathologic microorganisms. *I.R.J.P.*, *4*(2), 119-121.
- Alonso-Amelot, M.E., Oliveros, A., & Calcagno-Pisarelli, M.P. (2004). Phenolics and condensed tannins in relation to altitude in neotropical *Pteridium* spp. A field study in the Venezuelan Andes. *Biochemical Systematics and Ecology*, *32*, 969-981.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alonso-Amelot, M.E., Oliveros-Bastidas, A., & Calcagno-Pisarelli, M.P. (2007). Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation, and rain regime. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 1-10.
- Allothman, M., Bhat, R., & Karim, A.A. (2009a). UV radiation-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10, 512-516.
- Allothman, M., Bhat, R., & Karim, A.A. (2009b). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem.*, 115, 785-788.
- Al-Saleh, F.S., Gamal El-Din, A.Y., Abbas, J.A., & Saeed, N.A. (1997). Phytochemical and biological studies of medicinal plants in Bahrain: family Chenopodiaceae. *Int. J. Pharmacogn.*, 35, 38-42.
- Amanda, M.H., Bruce, A.K., & Jonathan, M.F. (2011). Assessment of tannin variation in tamarisk foliage across a latitudinal gradient. *The Open Environmental & Biological Monitoring Journal*, 4, 32-35.
- Amaral, J.S., Valentão, P., Andrade, P.B., Martins, R.C., & Seabra, R.M. (2008). Do cultivar, geographical location and crop season influence phenolic profile of walnut leaves? *Molecules*, 13, 1321-1332.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Abu-Reidahb, I.M., Quirantes-Piné, R., Madania, K., & Segura-Carretero, A. (2014). Phytochemical profiling, *in vitro* evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 61, 120-129.
- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., & Trinajstić, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76, 55-61.
- Angiosperm Phylogeny Group II, « A.P.G. II », (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.*, 141, 99-436.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125, 989-1009.
- Antwi-Boasiako, C., & Animapauh, S.O. (2012). Tannin extraction from the barks of three tropical hardwoods for the production of adhesives. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(6), 2959-2965.
- Arima, H., & Danno, G. (2002). Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1727-1730.
- Aruoma, O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 199-212.
- Asano, K., Shinagawa, K., & Hashimoto, N. (1982). Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *Journal of the American Society Brewing Chemists*, 40, 147-154.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aslam, S., Jahan, N., Ali, S., & Rahman, K.U. (2012). An innovative microwave-assisted extraction and antioxidant potential of polyphenols from different parts of *Ocimum basilicum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(11), 2150-2159.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*, 89, 27-36.
- Auajjar, N., Attarassi, B., Elhaloui, N.E., & Badoc, A. (2006). Multirésistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus aureus* et survie sur divers tissus hospitaliers. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 145, 61-76.
- Aurousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim.*, 15(1), 67-82.
- Awad, M.A., & De Jager, A. (2002). Relationship between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in *Elstar* apple skin. *Scientia Horticulturae*, 92, 265-276.
- Ayan, A.K., Kizilkaya, R., Cirak, C., & Kevseroglu, K. (2006). Heavy metal contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) growing in northern Turkey. *J. Plant Sci.*, 1, 182-186.
- Ayan, A.K., Yanar, P., Cirak, C., & Bilgener, M. (2007). Morphogenetic and diurnal variation of total phenols in some *Hypericum* species from Turkey during their phenological cycles. *Bangladesh J. Bot.*, 36, 39-46.
- Ayres, M.P., Clausen, P.H., Maclean, S.F., Redman, A.M., & Reichart, P.B. (1997). Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology*, 78(6), 1696-1712.

## B

- Baatour, O., Tarchoun, I., Nasri, N., Kaddour, R., Harrathi, J., Drawi, E., Ben Nasri-Ayachi, M., Marzouk, B., & Lachaâl, M. (2012). Effect of growth stages on phenolics content and antioxidant activities of shoots in sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) varieties under salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 11(99), 16486-16493.
- Babayi, H., Kolo, I., & Okogum, J.I. (2004). The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biochemistri*, 16(2), 102-105.
- Babu, M.A., Suriyakala, M.A., & Gothandam, K.M. (2012). Varietal impact on phytochemical contents and antioxidant properties of *Musa acuminata* (Banana). *J. Pharm. Sci. & Res.*, 4(10), 1950-1955.
- Baczek, K., Cygan, M., Przybyl, J.L., Kosakowska, O., & Weglarz Z. (2012). Seasonal variation of phenolics content in above and underground organs of dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench). *Herba Polonica*, 58(3), 24-32.
- Bagnouls, F., & Gaussen, H. (1953). Saison sèche et indice xérothermique. *Bull. Soc. Hist. Nat.*, 8, 193-239.

- Bakchiche, B., & Gherib, A. (2014). Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie. *International Journal of Innovation and Applied Studies.*, 9(1), 167-172.
- Bakhshi, D., & Arakawa, O. (2006). Effects of UV-B irradiation on phenolic compound accumulation and antioxidant activity in "Jonathan" apple influenced by bagging, temperature and maturation. *J. Food Agric. Environ.*, 4, 75-77.
- Balandrin, M.F., Kinghorn, A.D. & Farnsworth, N.R. (1993). Plant-derived natural products in drug discovery: An overview. In A.D. Kinghorn, & M.F. Balandrin (Eds.), *Human Medicinal Agents from Plants*, Symposium Series No. 534 (pp. 2-12). Washington DC: American Chemical Society Books.
- Banso, A., & Mann, A. (2008). Evaluation of antibacterial properties of flavonoid fraction from *Antiaris africana* (Engl). *Journal of Applied Biosciences*, 12, 665-670.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., & Ferreira, C.F.R. (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 544-550.
- Barwick, V.J. (1997). Strategies for solvent selection - a literature review. *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 293-309.
- Bashir. A.K., Abdalla, A.A., Wasfi, I.A., Hassan, E.S., Amiri, M.H., & Crabb, T.A. (1994). Flavonoids of *Limonium axillare*. *Int. J. Pharmacogn.*, 32, 366-372.
- Basile, A., Giordano, S., Lopez Saez J.A., & Cobiانchi, B.C. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochem.*, 2(8), 1479-1482.
- Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D., Castaldo Cobiانchi, R., Vuotto, M.L., & Ferrara, L. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, 71, 110-116.
- Batawita, K., Kokon, K., Akpagona, K., Koumaglo, K., & Bouchet, P. (2002). Fungicide activity of a threatened species from Togo flora: *Conyza aegyptiaca* (L.) Ait. var. *lineariloba* (DC.) O. Hoffm. (Asteraceae). *Acta Bot. Gal.*, 149(1), 41-48.
- Bate-Smith, E. (1972). Detection and determination of ellagitannins. *Phytochemistry*, 12, 907-912.
- Batista, R., Junior, A.D.J.S., & Oliveira, A.B.D. (2009). Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicine. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules*, 14, 3038-3072.
- Bauer, N., Blaschke, U., Beutler, E., Gross, E.M., Jenett-Siems, K., Siems, K., & Hilt, S. (2009). Seasonal and interannual dynamics of polyphenols in *Myriophyllum verticillatum* and their allelopathic activity on *Anabaena variabilis*. *Aquatic botany*, 91(2), 110-116.
- Belhattab, R., & Larous, L. (2006). Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria. *J. Essent Oil Res.*, 18, 369-373.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bellakhdar, J. (1997). *Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires : La pharmacopée Marocaine traditionnelle*. Paris: Ibs Press, 172 p.
- Bell-Lelong, D.A., Cusumano, J.C., Meyer, K., & Chapple, C. (1997). Cinnamate-4-hydroxylase expression in arabidopsis. Regulation in response to development and the environment. *Plant Physiology*, 113(3), 729-738.
- Benabdeli, K. *Aspects physionomico-structuraux et dynamique des écosystèmes forestiers face à la pression anthropozoogène dans les Monts de Tlemcen et les Monts de Dhaya. Algérie occidentale*. Thèse de Doctorat. Sidi Bel Abbés : Université Djillali Liabés, 2006, 356 p.
- Ben Ali, A., & Louis, A. (1946). Le Bordj, scènes de la vie sahéenne. *Revue I.B.L.A.*, 11, 14.
- Benhammou, N., Bekkara, F.A., & Panovska, T.K. (2009). Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*, 12, 1259-1266.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 13(2), 184-196.
- Benyahia, M., Benabdelli, K., & Mouaden, K. (2001). Géologie, pédologie et systèmes de production dans les monts de Tessala (Sidi Bel Abbés). *Rev. Sciences de la nature et de l'environnement : Ecosystèmes*, 1, 70-75.
- Benzie, I.F., & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Berambaum, M. (1983). Effects of tannin on growth and digestion in two species of Papilionids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 34, 245-250.
- Berche, P., Gaillard, J.L., & Simonet, M. (1988). *Les salmonelles. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences*. Paris : Flammarion, 591 p.
- Berche, P., Gaillard, J.L., & Simonet, M. (1989). *Bactériologie: bactéries des infections humaines*. France : Médecine-Sciences Flammarion, 660 p.
- Berghe, W.V. (2012). Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: Lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacological Research*, 65, 565-576.
- Bergogne-Berezin, E., & Dellamonica, P. (1995). *Antibiothérapie en pratique clinique*. Paris: Edition Masson, 486 p.
- Bernays, E., Cooper, G., & Bilgener, M. (1989). Herbivores and plant tannins. *Advances in Ecological Research*, 19, 263-302.
- Bernhard, K., Schrempf, H., & Goebel, W. (1978). Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 133, 897-903.
- Beretta, J., Giangiacomo, G., Ferrero, M., Orioli, M., & Maffei Facino, R. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *An. Chimica Acta*, 533, 185-191.
- Berrougui, H., Isabelle, M., Cherki, M., & Khalil, A. (2006). *Marrubium vulgare* L. extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage. *Life Sci.*, 80, 105-112.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.*, 105, 822-828.
- Besombes, C. *Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques : applications généralisées*. Thèse de Doctorat. France : Université de la Rochelle, 2008, 289 p.
- Bhojar, M., Mishra, G., Naik, P., & Srivastava, R. (2011). Estimation of antioxidant activity and total phenolics among natural populations of Caper (*Capparis spinosa*) leaves collected from cold arid desert of trans-Himalayas. *Australian Journal of Crop Science*, 5(2), 912-919.
- Biaye, M. *Actions pharmacologiques des tannins*. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Dakar (Sénégal) : Université Cheikh Anta Diop, 2002, 53 p.
- Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2013). Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry*, 136, 46-54.
- Billerbeck, V.G., Roques, C., Vanière, P., & Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*, 3, 248-251.
- Bloor, S.J. (2002). Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Methods in enzymology*, 335, 3-17.
- Bogdanov, S. (1989). Determination of pinocembrin in honey using HPLC. *J. Apic. Res.*, 28, 55-57.
- Bokaeian, M., Saboori, E., Saeidi, S., Niazi, A.A., Amini-Borojeni, N., Khaje, H., & Bazi, S. (2014). Phytochemical analysis, antibacterial activity of *Marrubium vulgare* L. against *Staphylococcus aureus* *in vitro*. *Zahedan Journal of Research in Medical Science*, 16, 29-33.
- Bonnier, G. (1934). *Flore complète : la végétation de la France, Suisse et Belgique* (Tome 9). Paris : Librairie Générale de l'Enseignement, 124 p.
- Boldi, A.M. (2004). Libraries from natural product-like scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 281-286.
- Bolling, B., Dolnikowski, G., Blumberg, J., & Chen, C.Y. (2010). Polyphenol content and antioxidant activity of *California almonds* depend on cultivar and harvest year. *Food Chemistry*, 122, 819-825.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., & Monks, T.J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem.Res.Toxicol*, 13, 135-160.
- Bonnet, R., Caron, F., Cavallo, J.D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., Drugeon, H., Dubreuil, L., Jarlier, V., Jehl, F., Lambert, T., Leclercq, R., Nicolas-Chanoine, M.H., Plesiat, P., Ploy, M.C., Quentin, C., Soussy, C.J., Varon, E., & Weber, P. (2012). *Communiqué de la Comité Française de l'Antibiogramme*. France : Société Française de Microbiologie, 59 p.
- Botta, B., Menendez, P., Zappia, G., Lima, R.A.D., Torge, R., & Monache, G.D. (2009). Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Current Medicinal Chemistry*, 16, 3414-3468.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boudjelal, A., HENCHIRI, C., SIRACUSA, L., SARI, M., & RUBERTO, G. (2012). Compositional analysis and *in vivo* anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoteparia*, 2, 286-292.
- Boudy, P. (1948). *Economie forestière nord-africaine. Milieu physique et humain*. Paris : Editions Larose, 1955 p.
- Bougatef, A., Hajji, M., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food. Chem.*, 114, 1198-1205.
- Bouhraou, R.T. Situation sanitaire de quelques forêts de chêne-liège de l'ouest Algérien. Etude particulière des problèmes causés par les insectes. Thèse de Doctorat. Tlemcen : Université de Tlemcen, 2003, 267 p.
- Boukef, M.K. (1986). *Médecine traditionnelle et pharmacopée : Les plantes dans la médecine traditionnelle Tunisienne*. Paris : Edition Agence de coopération culturelle et technique, 165 p.
- Boukhari, A. (2012). Antioxidant proprieties of methanolic and ethanolic extracts of *Euphorbia helioscopia* (L.) aerial parts. *International Food Research Journal*, 19, 1125-1130.
- Bouterfas, K. *Étude de Marrubium vulgare* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale) : autoécologie, histologie, quantification de quelques polyphénols et évaluation du pouvoir antimicrobien des flavonoïdes. Mémoire de Magister. Algérie : Université Djillali Liabès de Sidi Bel-Abbès, 2011, 245 p.
- Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Latreche, A., & Cherifi, K. (2013a). Autoécologie du Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) et caractérisation de la biodiversité végétale dans le Djebel de Tessala (Algérie nord-occidentale). *Ecologia mediterranea*, 39(2), 39-57.
- Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Latreche, L., Hazem, Z., & Bouredja, N. (2013b). Quantification of some polyphenols of *Marrubium vulgare* L. of Tessala mount (western Algeria) at the vegetative and the flowering periods. *Les technologies de laboratoire*, 8(31), 34-41.
- Bouras, D., Matallah, A., Mouffok, S., & Boutiba, Z. (2007). Evolution bioclimatique et actions de développement sur le littoral occidental Algérien. *Larhyss Journal*, 6, 91-104.
- Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M., & Hammami, M. (2014). Variation in antioxidant activity and phenolic content in different organs of two Tunisian cultivars of *Olea europaea* L. *Acta Physiol Plant*, 36, 169-178.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
- Brette, J. P. (1985). *Phytothérapie traditionnelle Kabylie*. Paris: Edition Ibis Press, 14 p.
- Briskin, D.P., & Gawienowski, M. (2001). Differential effects of light and nitrogen on production on hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant. Physiol. Biochem.*, 39, 1075-1081.
- Broadsky, T.F., Lewis, C., & Eble, T.E. (1976). Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr.*, 123, 33-44.

- Brolis, M., Gabetta, B., Fuzzati, N., Pace, R., Panzeri, F., & Peterlongo, F. (1998). Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *J. Chromatogr. A.*, 825, 9-16.
- Brown, E.D., & Wright, G.D. (2005). New targets and screening approaches in antimicrobial drug discovery. *Chem. Rev.*, 105, 759-774.
- Bruneton, J. (1999a). Tannins. In J. Bruneton (Eds.), *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (pp. 369-404). Paris : Technique et Documentation.
- Bruneton, J. (1999b). Flavonoïdes. In J. Bruneton (Eds.), *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (pp.10-353). Paris : Technique et Documentation.
- Bruneton, J. (1999c). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (3<sup>ème</sup> Eds.). Paris : Technique et Documentation, 1120 p.
- Bruni, R., & Sacchetti, G. (2009). Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules*, 14, 682-725.
- Bssaibis, F., Gmira, N., & Meziane, M. (2009). Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* L. W. Greuter. *Rev. Microbiol. Ind. San. Environn.*, 3, 44-55.
- Budic-Leto, I., Gracin, L., Lovrić, T., & Vrhovsek, U. (2008). Effects of maceration conditions on the polyphenolic composition of red wine 'Plavac mali'. *Vitis*, 47(4), 245-250.
- Burton, G.W., Traber, M.G., Acuff, R.V., Walters, D.N., Kayden, H., Hughes, L., & Ingold, K. (1998). Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am.J.Clin.Nutr.*, 67, 669-684.
- Butnariu, M., & Coradini, C.Z. (2012). Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. *Chemistry Central Journal*, 6(35), 1-7.

## C

- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 74, 2157-2184.
- Cakatay, U., Telci, A., Kayali, R., Sivas, A., & Akçay, T. (2000). Effect of  $\alpha$ -lipoic acid supplementation on oxidative protein damage in the streptozotocin-diabetic rat. *Res. Exp. Med.*, 199, 243-251.
- Calvo, A., Guarro, J., Suarez, G., & Ramirez, C. (1980). Air-borne fungi in the air of Barcelona (Spain). III. The genus *Aspergillus* Link. *Mycopathologia*, 71(1), 41-43.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Canadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M., & Cetkovic, G.S. (2005). Freeradical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium*) extracts. *J. Sci. Food Agric.*, 85, 265-272.
- Carbon, C., Mariel, C., & Veyssier, P. (1993). Les grandes familles d'antibiotiques. In C., Carbon, C. Mariel, & P. Veyssier (Eds.), *Guide pratique de l'antibiothérapie* (pp. 9-15). Paris : Midy.
- Cardenas-Sandoval, B.A., Lopez-Laredo, A.R., Martinez-Bonfil, B.P., Bermudez-Torres, K., & Trejo-Tapia, G. (2012). Advances in the phytochemistry of *Cuphea aequipetala*, *C. aequipetala* var. *hispida* and *C. lanceolata*: extraction and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 401-413.
- Carty, J.L., Bevan, R., Waller, H., Mistry, N., Cooke, M., Lunec, J., & Griffiths, H.R. (2000). The effects of vitamin C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 273, 729-735.
- Carpena, O., Zornoza, P., & Mataix, J. (1982). Incidence of P, Mn and B deficiencies on the levels of the whole and individual flavonoid groups in tomato leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 5(10), 1197-1208.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Lercker, G., & Fernandez- Gutierrez, A. (2007). Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4771-4780.
- Chaâbane, A. *Etude de la végétation du littoral septentrional de la Tunisie : Typologie, syntaxonomie et éléments d'aménagement*. Thèse de Doctorat. Marseille : Es. Sci. Univ., 1993, 338 p.
- Chacha, M., Bojase-Moleta, G., & Majinda, R.R. (2005). Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. *Phytochemistry*, 66, 99-104.
- Chan, S.W., Lee, C.Y., Yap, C.F., Wan Aida, W.M., & Ho, C.W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16, 203-213.
- Chatha, S.A.S., Anwar, F., Manzoor, M., & Bajwa, J.R. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of rice bran extracts using different antioxidant assays. *Grasas Aceites Sevilla*, 57, 328-335.
- Chavéron, H. (1999). Molécules toxiques : molécules formées au cours des réactions d'antioxydant. In H. Chavéron (Eds.), *Introduction à la toxicologie nutritionnelle* (pp. 176-183). Londres : Tec & Doc.
- Chaves, T.P., Santana, C.P., Vêras, G., Brandao, D.O., Felismino, D.C., Medeiros, A.C.D., & Trovao, B.M. (2013). Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. *African Journal of Biotechnology*, 12(8), 847-853.

- Chebouat, E., Dadamoussa, B., Gharabli, S. Gherraf, N., Allaoui, M., Cheriti, A., Lahham, A., & Zellagui, A. (2014). Assessment of antimicrobial activity of flavonoids extract from *Ephedra alata*. *Der. Pharmacia Lettre*, 6(3), 27-30.
- Chen Lui, K.C.S., Lee, S.S., Chiou, J.F., Ren, S., & Lien E.J. (1999). Antiviral tannins from two *Phyllanthus* species. *Planta Medica.*, 65(1), 43-46.
- Cherifi, K., Mehdadi, Z., Latreche, A., & Bachir Bouiadjara, S.E. (2011). Impact de l'action anthropozoogène sur l'écosystème forestier du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Sécheresse*, 22, 197-206.
- Chew, K.K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan Aida, W.M., & Ho, C.W. (2011a). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal*, 18, 571-578.
- Chew, K.K., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan Aida, W.M., & Ho, C.W. (2011b). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18, 1427-1435.
- Chiapusio, G., Sanchez, A.M., Reigosa, M.J., Gonzalez, L., & Pellissier, F. (1997). Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *J. Chem. Ecol.*, 23(11), 2445-2453.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2007). Optimisation of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Journal of Separation and Purification Technology*, 55, 217-225.
- Chizzola, R., & Lukas, B. (2005). Variability of the cadmium content in Hypericum species collected in eastern Austria. *Water, Air Soil Poll.*, 170, 331-343.
- Choi, H.J., Song, J.H., & Park, K.S. (2009). Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 37(4), 329-333.
- Chokoe, P.K., Masoko, P., Mokgotho, M.P., Howard, R.L., & Mampuru, L.J. (2008). Does seasonal variation influence the phytochemical and antibacterial properties of *Carpobrotus edulis*? *African Journal of Biotechnology*, 7(22), 4164-4171.
- Chye, F.Y., & Hoh, S.N. (2007). Antimicrobial activity of flavonoid extracts from Sabah tea (*Camellia sinensis*) against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.*, 35(2), 245-251.
- Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., & Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, 100, 553-559.
- Ceto, X., Gutiérrez, J.M., Gutiérrez, M., Céspedes, F., Capdevila, J., Manguez, S., Jiménez-Jorquera, C., & Del Valle, M. (2012). Determination of total polyphenol index in wines employing a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 732, 172-179.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Conservation des Forêts de la wilaya d'Oran « C.F.W.O », (1996). Forêt de la wilaya d'Oran : présentation générale. *Dir. Gen. For., Min. Agr.* : 24 p.
- Chouaieb, H., Ayadi, I., Zouari, S., Fakhfakh, N., Zaidi, S., & Zouari, N. (2012). Effect of phenological stage and geographical location on antioxidant activities of Tunisian horehound: *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *JBAPN*, 2(4), 232-238.
- Cigremis, Y., Kart, A., Karaman, M., & Erdag, D. (2009). Attenuation of ischemia–reperfusion injury with *Marrubium cordatum* treatment in ovarian torsion–detorsion model in rabbits. *Fertility and Sterility*, 93(5), 1455-1463.
- Cirak, C., Radisienè, J., & Çamas, N. (2008). Pseudohypericin and hyperforin in two Turkish Hypericum species: Variation among plant parts and phenological stages. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 377-382.
- Clardy, J., & Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature*, 432, 729-837.
- Colaric, M., Stampar, F., & Hudina, M. (2006). Changes in sugars and phenolics concentrations of Williams pear leaves during the growing season. *Canadian Journal of Plant Science*, 86(4), 1203-1206.
- Collingborn, F.M.B., Gowen, S.R., & Mueller-Harvey, I. (2000). Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5297-5301.
- Cometta, A., Baumgartner, J.D., Lew, D., Zimmerli, W., Pittet, D., Chopart, P., Schaad, U., Herter, C., Eggimann, P., & Huber, O. (1994). Prospective randomized comparison of imipenem monotherapy with imipenem plus nelfilmicin for treatment of severe infections in nonneutropenic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38(6), 1309-1313.
- Connam, S., Deslandes, E., & Gall, E.A. (2007). Influence of day-night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 349, 359-369.
- Connor, A.M., Luby, J., Tong, C., Finn, C., & Hancock, J. (2002). Genotype and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content and anthocyanins content among blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127, 89-97.
- Coonrod, J.D., Leadley, P.J., & Eickhoff, T.C. (1971). Antibiotic susceptibility of *Bacillus* species. *J. Infect. Dis.*, 123, 102-105.
- Corre, J.J. (1961). Une zone de terrain salé en bordure de l'étang de Mauguio : Etude du milieu et de la végétation. *Bull. Serv. Carte phytogéog. Montpellier Série B*, 6, 105-151.
- 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.

- Cosmulescu, S., & Trandafir, I. (2011). Seasonal variation of total phenols in leaves of walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(19), 4938-4942.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 569-590.
- Courvalin, P. (1982). Aminocyclitol: Mode d'action et mécanisme de résistance. In M. Jean, & P. Courvalin (Eds.), *Les Aminocyclitols* (pp. 9-21). Paris : Arnettes.
- Cowen, L.E., Kohn, L. M., & Anderson, J.B. (2001). Divergence in fitness and evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, 183, 2971-2978.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., & Snader, K.M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60, 52-60.
- Crichton, R.R., Wilmet, S., Legssyer, R., & Ward, R.J. (2002). Molecular and Cellular Mechanisms of Iron Homeostasis and Toxicity in Mammalian Cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(25), 9-18.
- Cronquist, A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants*. USA: The New York Botanical Garden, 555 p.
- Crosby, K., Jifon J., & Leskovar, D. (2008). *Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products*. Boca Raton : CRC Press, 411 p.
- Crozier, A., Lean, M.E.J., McDonald, M.S., & Black, C. (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 590-595.
- Cserhalmi, Z., Vidács, I., Beczner, J., & Czukor, B. (2002). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed electric fields technology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3(1), 41-45.
- Cushnie, T.P., Hamilthoh, V.E.S., & Lamb, A.J. (2003). Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.*, 158(4), 281-289.
- Cushnie, T.P., & Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26, 343-356.
- Cutler, S.J., & Cutler, H.G. (2000). *Biologically Active Natural Products : Pharmaceuticals*. New-York : CRC Press, 277 p.

## D

- Dadi, P.K., Ahmad, M., & Ahmad, Z. (2009). Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.*, 45(1), 72-79.
- Daget, P.H. (1977). Le bioclimat méditerranéen, caractères généraux, modes de caractérisation. *Végétation*, 34, 1-20.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Daigle, D.J., & Conkerton, E.J. (1983). Analysis of flavonoids by HPLC. *J. Liq. Chromatogr.*, *6*, 105-118.
- Daigle, D.J., & Conkerton, E.J. (1988). Analysis of flavonoids by HPLC: an update. *J. Liq. Chromatogr.*, *11*, 309-325.
- Dalaram, S.I., Timoracká, M., Vollmannová, A., & Árvay, J. (2012). Influence of variety, locality and soil contamination on total polyphenol content and antioxidant activity of fababean grains. *Journal of Microbiology and Food Science*, *1*, 931-941.
- Dalluge, J.J., Nelson, B.C, Brown Thomas, J., & Sander, L.C. (1998). Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, *793*, 265-274.
- Dangles, O., Fargeix, G., & Dufour, C. (1999). One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions*, *2*, 1387-1395.
- D'Archivio, M., Filesì, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, *43*(4), 348-361.
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, M.R.I., & Marin-Arroyo, M.R. (2011). Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments. *Eur. Food. Res. Technol.*, *232*, 211-220.
- Debrach, J. (1959). Notes sur les climats du Maroc occidental. *Maroc méridional*, *32*(342), 1122-1134.
- Decaux, I. (2002). *Phytothérapie : mode d'emploi*. Dijon : Edition Le Bien Public, 7 p.
- De Cooman, L., Everaert, E., & De Keukeleire, D. (1998). Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a due to the identification of hop varieties. *Phytochem. Anal.*, *9*, 145-150.
- Dehkordi, F.R., Roghani, M., & Mojarad, T.B. (2012). The effect of *Marrubium vulgare* on contractile reactivity of aorta in diabetic rats. *ARYA Atherosclerosis Journal*, *7*(5), 1-4.
- Delgado, R., Martín, P., Del Alamo, M., & Gonzales, M.R. (2004). Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*, 623-630.
- De Martonne, E. (1926). Une nouvelle fonction climatologique : L'indice d'aridité. *La météo*, 449-459.
- De Pascual-Teresa, S., Treutter, D., Rivas-Gonzalo, J.C., & Santos-Buelga, C. (1998). Analysis of flavonols in beverages by high performance liquid chromatography with chemical reaction detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4209-4213.
- De Pinedo, T.A., Pen alver, P., & Morales, J.C. (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant: structure-activity relationship. *Food Chemistry*, *103*, 55-61.
- Dervin, C. (1992). *Analyse des correspondances. Comment interpréter les résultats d'une analyse factorielle des correspondances*. Paris : ITCF, 72 p.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Deshpande, S.S., Cheryan, M., & Salukhe, D.K. (1986). Tannin analysis of food products. CRC. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24, 401-449.
- Desjardin, Y. (2008). *Physiological and ecological functions and biosynthesis of healthpromoting compounds in fruit and vegetables. Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products*. Cambridge: Woodhead Publishing, 64 p.
- De Souza, M.M., De Jesus, R.A.P., Cechinel-Filho, V., & Schlemper, V. (1998). Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomed.*, 5(2), 103-107.
- De Souza, E.A., Inoue, H.T., Junior, A.F., Veiga, N., & Orsi, R.O. (2014). Influence of seasonality and production method on the antibacterial activity of propolis. *Acta Scientiarum*, 36(1), 49-53.
- Devriese, L.A., Vancannayt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graf, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawynot, P., Swincs, J., Decostre, A., & Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudodintemedius* sp. ; a coagulase positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1569-1573.
- De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R.S., Jessup, W., & Leake, D.S. (1990). Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem.Pharmacol.*, 39(11), 1743-1750.
- Di carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65, 337-353.
- Didrak, M. (1999). Antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa bark, Gallnut powders, *Salvia* sp and *Phlomis* sp). *J. Biol.*, 23, 241-248.
- Dixon, R.A., & Steele, C.L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4, 394-400.
- Djahra, A.B., Bordjiba, O., & Benkherara, S. (2013). Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.), 11(6), 348-352.
- Djebaïli, S. *Recherches phytoécologiques et phytosociologiques sur la végétation des hautes plaines steppiques et de l'Atlas Saharien Algérien*. Thèse de Doctorat. Montpellier : Université Languedoc, 1978, 229 p.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A., & Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142, 61-78.
- Dominguez-Avila, J., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., Villa-Rodriguez, J., Olivas-Orozco, G., Molina-Corral, J., Gomez-Garcia, M., & Rosa, L. (2013). Influence of growing location on the phytochemical content of pecan (*Carya illinoensis*) oil. *Journal of Food Research*, 2(5), 143-151.
- Doré, J., & Corthier, G. (2010). Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34, 7-16.

- Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M., & Hiltunen, R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agric. Food Chem.*, *52*, 762-770.
- Downey, M.O., & Hanlin, R.L. (2010). Comparison of ethanol and acetone mixtures for extraction of condensed tannin from grape skin. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, *31*, 154-159.
- Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., & Boras, M. (2007). The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chemistry*, *102*(3), 966-975.
- Ducros, A.H. *Essai sur le droguier populaire arabe de l'Inspectorat des pharmacies de Caire*. Mémoire d'Ingénieur. Institut Français d'Archéologie Orientale, 1930, 166 p.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., & Grolier, P. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *83*, 369-382.
- Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey, J.B., Webby, R.F., Mitchell, K.A., Foo, L.Y., & Perry, N.B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures, *Food Chem.*, *101*, 1417-1424.
- Dent, M., Dragovi-Uzelac, V., Peni, M., Brncic, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technol. Biotechnol.*, *51*(1), 84-91.
- Deshmukh, R.N., & Dhumal, K.N. (2005). Enzymatic studies in sorghum cultivars under peg induced water stress. *Indian J. Plant. Physiol.*, *10*, 349-353.
- Druzynska, B., Stepniewska, A., & Wolosiak, R. (2007). The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, *6*(1), 27-36.

## **E**

- Edziri, H., Mastouri, M., Aouni, L., & Verschaeve, M. (2012). Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* growing in Tunisia. *South African Journal of Botany*, *80*, 104-109.
- El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, D.J., Mortensen, V., Phillip, D.M., & Truscott, T.G. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, *430*(1), 37-48.
- El Bardai, S., Morel, N., Wibo, M., Fabre, N., Labres, G., Lyoussi, B., & Quetin-Leclercq, J. (2003). The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Med.*, *69*, 75-77.
- Elberry, A.A., Harraz, F.M., Ghareib, S.A., Gabr, S.A., Nagy, A.A., & Abdel-Sattar, E. (2011). Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in

- streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 12(9), 6135-6145.
- El-Gammal, A.A., & Mansour, R.M. (1986). Antimicrobial activities of some flavonoid compounds. *Zentralbl. Mikrobiol.*, 141, 561-565.
- El Kalamouni, C. *Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées*. Thèse de Doctorat. Toulouse : Institut National Polytechnique de Toulouse, 2010, 107 p.
- Ellis, D. (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 7-10.
- Emberger, L. (1930). La végétation de la région Méditerranéenne. Essai d'une classification des groupements végétaux. *Rev. Gen. Bot.*, 42, 641-662.
- Emberger, L. (1942). Un projet de classification des climats du point de vue phytogéographique. *Bull. Sc. Hist.Nat.Toulouse*, 77, 97-124.
- Emberger, L. (1955). Une classification biogéographique des climats. *Rev. Trav. Lab. Bot. Geo. Zool.*, 7, 1-43 p.
- Emberger, L. (1971). *Travaux de botanique d'écologie*. Paris : Masson, 520 p.
- Erturk, Y., Ercisli, S., Sengul, M., Eser, Z., Haznedar, A., & Turan, M. (2010). Seasonal variation of total phenolic, antioxidant activity and minerals in fresh tea shoots (*Camellia Sinensis* Var. *Sinensis*). *Pak. J. Pharm. Sci.*, 23(1), 69-74.
- Essawi, T., & Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharm.*, 70, 343-349.
- Erturk, Y., Ercisli, S., Sengul, M., Eser, Z., Haznedar, A., & Turan, M. (2010). Seasonal variation of total phenolic, antioxidant activity and minerals in fresh tea shoots (*Camellia sinensis* Var. *Sinensis*). *Pak. J. Pharm. Sci.*, 23(1), 69-74.
- Ewald, C, Fjellkner-Modig, S., Johansson, K., Sjöholm, I., & Akesson, B. (1999). Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, 64, 231-235.

## F

- Faizi, S., & Ali, M. (1999). Shamimin: a new flavonol C-glycoside from leaves of *Bombax ceiba*. *Planta Med.*, 65, 383-385.
- Fajer, E.D., Bowers, M.D., & Bazzaz, F.A. (1992). The effect of nutrients and enriched CO<sub>2</sub> environments on production of carbon-based allelochemicals in *Plantago*: test of the carbon/nutrient balance hypothesis. *American Naturalist*, 140(4), 707-723.
- Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.E., Abdelly, C., & Magné, C. (2012). Ultrasound-assisted extraction: effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- antioxydant activity of *Mesembryanthemum edule* L. *Aizoaceae* Shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 243-249.
- 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.
- Ferka-Zazou, N. (2006). *Impact de l'occupation spatio-temporelle des espaces sur la conservation de l'écosystème forestier : Cas de la commune de Tessala, wilaya de Sidi Bel Abbès, Algérie*. Mémoire de Magister. Tlemcen : Université Abu Bakr Belkaïd, 2006, 154 p.
- Fernandes, A.J.D., Ferreira, M.R.A., Randau, K.P., De Souza, T.P., & Soares, L.A.L. (2012). Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). *The Scientific World Journal*, 1, 2-7.
- Feucht, W., Treutter, D., & Christ, E. (1997). Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest. *Tree Physiol.*, 17, 335-340.
- Feucht, W., & Treutter, D. (1999). The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In S. Inderjit, K.M.M. Dakshinli & C.L. Foy (Eds.), *Principles and practices in chemical ecology* (pp. 307-338). Floride: Boca Raton Press.
- Firuzi, O., Mladenka, P., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2004). Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.*, 56(6), 801-807.
- Flet, C. (1984). *Les substances naturelles sources de médicaments nouveaux*. France : Edition Le Moniteur, 556 p.
- Fleurentin, J., & Pelt, J.M. (1990). Les plantes médicinales. *La Recherche*, 21(222), 811-818.
- Flores, F.B., Oosterhaven, J., Martinez-Madrid, M., & Romojaro, C.F. (2005). Possible regulatory role of phenylalanine ammonia-lyase in the production of anthocyanins in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 925-930.
- Fouché, J.G., Marquet, A., & Hambuckers, A. (2000). Les plantes médicinales de la plante aux médicaments. *Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman*, 89-100.
- Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sanchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., Costoya, N., & José Nunez, M. (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Elect. J. Env. Agri. Food. Chem.*, 7(8), 3210-3216.
- Frankel, S., Robinson, G.E. & Berenbaum, M.R. (1998). Antioxidant capacity correlated to characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37, 27-31.
- Franz, R., Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, E., Ruhnke, M., & Morschhauser, J. (1998). Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42(12), 3065-3072.
- Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., & Stitt, M. (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, 46, 533-548.

From, C., Pukall, R., Schumann, P., Hormazabal, V., & Granum, P.E. (2005). Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1178-1183.

Frutos, P., Hervas, G., Ramos, G., Giraldez, F.J., & Mantecon, A.R. (2002). Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 95, 215-226.

Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sanchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., Costoya, N., & José Nunez, M. (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7(8), 3210-3216.

## **G**

Gafner, S., Wolfender, J.L., Mavi, S., & Hostettmann, K. (1996). Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Med.*, 62, 67-69.

Gallo, M., Ferracane, R., Graziani, G., Ritieni, A., & Fogliano, V. (2010). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. *Molecules*, 15, 6365-6374.

Galvez, J., Zarzuelo, A., Crespo, J., Lorente, M.D., Acete, M.A., & Jimenez, J. (1993). Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med.*, 59, 333-336.

Garcia-Marquez, E., Roman-Guerrero, A., Perez-Alonso, C., & Cruz-Sosa, F. (2012). Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muiltle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11, 1-10.

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples *Molecules*, 15, 8813-8826.

Gauche, E., & Hausswirth, C. (2006). Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité*, 58, 43-66.

Gehlot, M., Kaseera, P.K., & Hussain, S. (2011). Seasonal variations in total alkaloids and phenols in *Withania* species from arid region. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 33, 404-406.

Generalic, I., Skroza, D., Surjaka, J., Mozinab, S.S., Ljubenkovc, I., Katalinic, A., Simate, V., & Katalinic, V. (2012). Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & Biodiversity*, 9, 441-456.

Genova, G., Lacopini, P., Baldi, M., Ranieri, A., Storchi, P. & Sebastiani, L. (2012). Temperature and storage effects on antioxidant activity of juice from red and white grapes. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 13-23.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S.A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Sci. Elsevier*, 76, 172-181.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini Ana, E.C.S., & Fonseca Maria, J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Method. *A.A.P.S. Pharm. Sci.*, 5(2), 1-5.
- Gerber, M., & Berta-Vanrullen, I. (2006). Soja et phytoestrogènes. *Arch. Pédiatrie*, 13(6), 534-536.
- Gertenbach, D.D. (2001). Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals. In J. Shi, G. Mazza, & M. Le Maguer (Eds.), *Functional foods biochemical and processing aspects* (pp. 331-366). Boca Raton : CRC Press.
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Ebrahimzadeh, M.A., & Pourmorad, F. (2011). Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7), 1128-1133.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., & Rahmat, A. (2011). Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 1147-1154.
- Ghedadba, N., Bousselfela, H., Hambaba, L., Benbia, S., & Mouloud, Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12, 15-24.
- Ghedolf, N., Wang, X.H., & Engeseth, N.J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honey from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5870-5877.
- Gherida, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutiques. *Phytothérapie*, 4, 162-169.
- Ghorbanli, M., Tehran, T.A., & Niyakan, M. (2012). Seasonal changes in antioxidant activity, flavonoid, anthocyanin and phenolic compounds in *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale and *Physcia dubia* (Hoffm.) Lettau from Babol forest sites in north of Iran. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 2(3), 461-469.
- Gianmaria, F., Ferrazzano, Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., & Pollio, A. (2011). Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*, 16, 1486-1507.
- Gibbons, S. (2008). Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, 74(6), 594-602.
- Girish Kumar, C.P., Hanafy, A.M., Katsu, M., Mikami, Y., & Menon, T. (2006). Molecular analysis and susceptibility profiling of *Candida albicans* isolates from immunocompromised patients in South India. *Mycopathol.*, 161, 153-159.
- Gironi, F., & Piemonte, V. (2011). Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design*, 89(7), 857-862.
- Gliszczynska-Swiglo, A., & Tyrakowska, B. (2003). Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. *J. Food Sci.*, 68, 1844-1849.
- Goldman, G.H., Ferreira, M.E., Marques, E.R., Savoldi, M., Perlin, D., Park, S., Martinez, P.C.G., Goldman, M.H., & Colombo, A.L. (2004). Evaluation of fluconazole resistance

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 50, 25-32.
- Gomez-Campo, C. (1985). *Plant conservation in the mediterranean area*. W. Boston : Junk Publisher, Dordrecht-Boston-Lancaster, 269 p.
- Goodarzi, M.T., Zal, F., Malakooti, M., Safari, M.R., & Sadeghian, S. (2006). Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Med. Iran.*, 44(1), 41-45.
- Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., & Amiot, M.J. (1999). Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and isolated phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1625-1634.
- Grayer, R.J., & Harborne, J.B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*, 37, 19-42.
- Green, C.E. & Mitchell, S.A. (2014). The effects of blanching, harvest time and location (with a minor look at postharvest blighting) on oleoresin yields, percent curcuminoids and levels of antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes grown in Jamaica. *Mod. Chem. Appl.*, 2(4), 140-149.
- Grundhofer, P., & Gross, G.G. (2001). Immunocytochemical studies on the origin and deposition sites of hydrolyzable tannins. *Plant Science*, 160, 987-995.
- Grusak, M.A., & Della Penna, D. (1999). Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 133-161.
- Guglielminetti, M. (1994). Mycological and ultrastructural studies to evaluate biodeterioration of mural paintings. Detection of fungi and mites in frescoes of monastery of Damian in Assisi. *Int. biodet. and biodeg.*, 33(3), 269-283.
- Guibaud, J.F. (1975). Traitement des candidoses digestives et cutanéomuqueuses par l'ultra-levure à haute dose. *Vie Méd.*, 8, 628-630.
- Guignard, J.L. (1996). *Biochimie végétale*. Paris : Edition Masson, 236 p.
- Guo, L., Wang, S., Zhang, J., Yang, G., Zhao, M., Ma, W., Zhang, X., Li, X., Han, B., Chen, N., & Huang L. (2013). Effects of ecological factors on secondary metabolites and inorganic elements of *Scutellaria baicalensis* and analysis of geoherbism. *Life Sciences.*, 56(11), 1047-1056.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.
- Gutmann, L. (1986). Mécanismes de résistance non enzymatique aux bêta-lactamines : épidémiologie et résistance. *Med. Mal. Infect.*, 11, 655-660.
- Gutierrez, F., & Fernandez, J.L. (2002). Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of "extra" quality. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 571-577.
- GUYOT, G. (1997). *Climatologie de l'environnement de la plante aux écosystèmes*. Paris : Edition Masson, 505 p.

## H

Hagerman, A.E., & Butler, L.G. (1991). Tannins and lignins. In G.A. Rosenthal, & M.R. Berenbaum (Eds.), *Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites, the chemical constituents* (pp. 355-388). California: Academic Press.

Halbwirth, H. (2010). The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 595-621.

Hale, A.L. *Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating russet norkotah strains using aifp and microsatellite marker analysis*. Thèse de Doctorat. Texas (USA): Office of Graduate Studies of Texas A&M University, 2003, 260 p.

Hammer, M.U., Brauser, A.M., Olak, C., Brezesinski, G., Goldmann, T., Gutschmann, T., & Andrä, J. (2010). Lipopolysaccharide interaction is decisive for the activity of the antimicrobial peptide NK-2 against *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.*, 427, 477-488.

Hamza, T. (1993). *Introduction à la biologie moderne*. Alger : Berti Editions, 192 p.

Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., & Kinoshita, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhizainflata*. *Phytochemistry*, 48, 125–129.

Harborn, J.B. (1982). *Introduction to the Ecological Biochemistry*. London : Academic Press, 142 p.

Haribal, M., Alan, J., & Renwick, A. (2011). Seasonal and population variation in flavonoid and alliarinoside content of *Alliaria petiolata*. *Chemical Ecology*, 27(8), 1585-1594.

Harley, J.P., Klein, D.A., Prescott, L.M., Sherwood, L.M., Willey, J.M., & Woolverton, C.J. (2010). *Microbiologie*. Bruxelles: Edition De Boeck Supérieur, 125 p.

Harzallah-Skhiri, F., & Ben Jannet, H. (2005). Flavonoids diversification in organs of two *Prosopis farcta* (Banks & Sol.) Eig. (Leguminosea, Mimosoideae) populations occurring in the northeast and the southeast of Tunisia. *Journal of Applied Sciences Research*, 1(2), 130-136.

Haslam, E. (1989). *Plant polyphenols. Vegetable tannins revised*. Cambridge: Cambridge University Press, 230 p.

Hassani, F. *Etude des Caelifères (Orthoptères) et caractérisation floristique (biodiversité floristique) de leur biotope dans des stations localisées à Tlemcen et Ain Temouchent*. Thèse de Doctorat. Tlemcen : Université Abu Bakr Belkaïd, 2006, 200 p.

Haton, C. Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de Doctorat. France : l'université de Paris VI, 2005, 43 p.

Haukioja, E., Ossipov, V., Koricheva, J., Honkanen, T., Larsson, S., & Lempa, K. (1998). Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization?. *Chemoecology*, 8, 133-139.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.*, 14, 249-261.
- 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.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., Vincieri, F.F., & Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem.*, 99, 464-469.
- Heleno, S.A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2012). Fruiting body, spores and *in vitro* produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Res. Int.*, 46, 135-140.
- Hemingway, R.W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In R.W. Hemingway, & P.E. Laks (Eds.), *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance* (pp. 1021-1031). New York: Plenum Press.
- Hendrich, A.B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica*, 27, 27-40.
- Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A., & Grill, D. (2002). Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defense systems of two wheat cultivars. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 691-696.
- Hismath, I., Wan Aida, W.M., & Ho, C.W. (2011). Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. *International Food Research Journal*, 18, 931-939.
- Holmes, G.J., & Eckert, J.W. (1999). Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology*, 89, 716-721.
- Horikawa, M., Nora, T., & Kamei, Y. (1999). In vitro antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity found in extract of marine algae indigenous to the coastline of Japan. *J. Antibiot.*, 52, 186-189.
- Hossain, M., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A., & Bunton, N. (2010). Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 123(1), 85-91.
- Hostettmann, K., Poterat, O., & Wolfender, J.L. (1998). The potential of higher plants as a source of drugs. *Chimia*, 52, 10-17.
- Howard, L., Clark, J., & Brownmiller, C. (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1238-1247.
- Hu, S., Yuan, C., Zhang, C., Wang, P., Li, Q., Wan, J., Chang, H., Ye, J., & Guo, X. (2013). Comparative study of total flavonoid contents from the different tissues and varieties of

*Abelmoschus esculentus*. *International Journal of Medical Sciences and Biotechnology*, 1(3), 26-30.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.

Huang, L.Q., & Guo, L.P. (2007). Effects of accumulation of secondary metabolites on formation of genuine medicinal materials under environmental stress. *J. Chin. Pharm.*, 32, 277–280.

Hubert, J. *Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines*. Thèse de Doctorat. Toulouse : Institut National Polytechnique de Toulouse, 2006, 174 p.

Hunt, G.M., Baker, E.A. (1980). Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry*, 19(7), 1415-1419.

Hussain, A.I., Anwar, F., Nigam, P.S., Ashraf, M., & Gilanif, A.H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J. Sci. Food Agric.*, 90, 1827-1836.

## I

Ignat, I., Volf, I., Valentin, & Popa, I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.

I.N.P.N., (2010). Inventaire National du Patrimoine Naturel en France. Disponible sur internet : <http://www.inpn.mnhn.fr>. Page consultée le 14-06-2013. Mis à jour le 11-05-2013.

Iqbal, S., Younas, U., Chan, K.W., Zia-Ul-Haq, M., & Ismail, M. (2012). Chemical composition of *Artemisia annua* L. leaves and antioxidant potential of extracts as a function of extraction solvents. *Molecules*, 17, 6020-6032.

Iris, F.F., Benzie, I.F., & Strain, J.J. (1999). Ferric reducing antioxidant power assay. *Methods Enzymol.*, 299, 15-27.

Iserin, P. (2001). *Larousse encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins*. Londres: Dorling Kindersley Limited, 336 p.

Ishii, K., Furuta, T., & Kasuya, Y. (2003). High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*, 749, 49-56.

Ismael, D.S., Timoracka, M., Vollmannová, A., & Árvay, J. (2012). Influence of variety, locality and soil contamination on total polyphenol content and antioxidant activity of fababean grains. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1, 931-941.

## J

- Jain, A., Sinha, P., & Desai, N. (2014). Estimation of flavonoid, phenol content and antioxidant potential of Indian screw tree (*Helicteres isora* L.). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 5(4), 1320-1330.
- Jakopic, J., Veberic, R., & Stampar, F. (2009). Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta agriculturae Slovenica*, 93, 11-15.
- Jean-Blain, C. (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev. Méd. Vét.*, 149, 911-920.
- 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.
- Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M., & Yusuf, S. (1995). The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann. Intern Med.*, 123, 860.
- Jit, S., & Nag, TN. Antimicrobial principles from in vitro tissue culture of *Tribulus alatus*. *Indian J. Pharm. Sci.*, 47, 101-103.
- Joana, S.A., Valentão, P., Paula, B.A., Rui, C.M., & Rosa, M.S. (2008). Do Cultivar, Geographical Location and Crop Season Influence Phenolic Profile of Walnut Leaves?. *Molecules*, 13, 1321-1332.
- Joly, B., & Reynaud, A. (2002). *Entérobactéries, systématique et méthodes de diagnostic*. Paris : Tec & Doc Lavoisier, 365 p.
- Jones, N.P., Arnason, J.T., Abou-Zaid, M., Akpagana, K., Sanchez-Vindas, P., & Smith, M.X. (2000). Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by First Nations Peoples of eastern Canada. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 191-198.
- Jones, J.D., & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
- Jorge A.J., Heliodoro, D.L.G.T., Alejandro, Z.C., Ruth, B.C., & Noé, A.C. (2013). The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface Methodology. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 3(6), 436-442.
- Just, N., Nyunga, M., Lelong, J., & Wallaert, B. (2005). Allergie immédiate aux glucocorticoïdes de synthèse oraux. *La Revue de Médecine Interne*, 26, 331-334.
- Jaakola, L., & Hohtola, A. (2010). Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell. Environ.*, 33, 1239-1247.
- Jalili, A., & Sadeghzade, A. (2012). Comparative phenolic profile of Persian walnut (*Juglans regia* L.) leaves cultivars grown in Iran. *African Journal of Biochemistry Research*, 6(3), 33-38.
- Jokic, S., Velic, D., Bilic, M., Bucic-Kojic, A., Planinic, M., & Tomas, S. (2010). Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech J. Food Sci.*, 28(3), 206-212.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F., & Siebenhandl, S. (2006). The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass,

galangal, holy basil and rosemary. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(2), 121-133.

## K

Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10(19), 3908-3914.

Kahler, W., Kuklinski, B., Rühlmann, C., & Plotz, C. (1993). Diabetes Mellitus-A Free Radical- Associated Disease. Results of Adjuvant Antioxidant Supplementation." *Z. Gesamte Inn Med.*, 48(5), 223-232.

Kallithraka, S., Mohdaly, A.A., Makris, D.P., & Kefalas, P. (2004). Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape cultivars (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *J. Food. Comp. Anal.*, 18(5), 375-386.

Kanimozhi, P., Ilango, K., Anupam, C., Arun, B., Ammar, M.M.A., & Nethaji, A. (2010). Microwave assisted extraction of *artemisia pallens* for tyrosinase inhibitory activity. *Int. J. Pharm. Bio.Sci.*, 6(1), 1-6.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., & Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123-144.

Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., & Jaafar, H.Z.E. (2010). Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*, 15, 6244-6256.

Kazeem, M.I., Akanji, M.A., Rahman, Hafizur, M., & Choudhary, M.I. (2012). Antiglycation, antioxidant and toxicological potential of polyphenol extracts of alligator pepper, ginger and nutmeg from Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9), 727-732.

Kchaou, W., Abbès, F., Blecker, C., Attia, H., & Besbes, S. (2013). Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). *Industrial Crops and Products*, 45, 262-269.

Kelebek, H., Canbas, A., Selli, S., Saucier, C., Jourdes, M., & Glories, Y. (2006). Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis vinifera* L., cvs Bogazkere and Okuzgozu. *J. Food Eng.*, 77, 1012-1017.

Kennedy, B.F., & De Fillippis, L.F. (1999). Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *J. Plant. Physiol.*, 155(6), 746-754.

Kenny, T.P., Keen, C.L., Schmitz, H.H., & Gershwin, M.E. (2007). Immune effects of cocoa procyanidinoligomers on peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Biol. Med.*, 232, 293-300.

Kevers, C., Pincemail, J., Tabart, J., Defraigne, J.O., & Dommès, J. (2011). Influence of cultivar, harvest time, storage conditions and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6165-6171.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Khan, R.A., Khan, M.R., Sahreen, S., & Ahmed, M. (2012). Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill. *Chemistry Central Journal*, 6(12), 1-7.
- Khanna, P., Sharma, O.P., Sehgal, M., Bhargava, C., Jain, M., Goswami, A., Singhvi, S., Gupta, U., Agarwal, R., Sharma, P., & Jain, S.C. (1980). Antimicrobial principles from tissue culture of some plant species. *Indian J. Pharm. Sci.*, 42(4), 113-117.
- Khatun, M., Eguchi, S., Yamaguchi, T., Takamura, H., & Matoba, T. (2006). Effect of the thermal treatment on radical-scavenging activity of some spices. *Food Sci. Technol. Res.*, 12, 178-185.
- Khoddami, A., Wilkes M.A., & Roberts, T.H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.
- Khomdram, S.D., & Singh, P.K. (2011). Polyphenolic compounds and free radical scavenging activity in eight *Lamiaceae* herbs of Manipur. *Not. Sci. Biol.*, 3(2), 108-113.
- Kim, D.H., Bae, E.A., & Han, M.J. (1999). Anti-*Helicobacter pylori* activity of the metabolites of poncirin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 422-444.
- Kinghorn, A.D., & Balandrin, M.F. (1993). *Human medicinal agents from plants*. Washington D.C : ACS Symposium Series No. 534, 48 p.
- Kishore, G., Ranjan, S., Pandey, A., & Guptan, S. (2010). Influence of altitudinal variation on the antioxidant potential of tartar buckwheat of western Himalaya. *Food Sci. Biotechnol.*, 19(5), 1355-1363.
- Koehn, F.E., Carter, G.T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Review Drug Discovery*, 4, 206-220.
- Kolar, P., Shen, J.W., Tsuboi, A., & Ishikawa, T. (2002). Solvent selection for pharmaceuticals. *Fluid Phase Equilibria*, 194(7), 771-782.
- Kolodziej, J., Kayser, O., Latte, K.P., & Ferreira, D. (1999). Evaluation of the antimicrobial potency of tanins and related compounds using in the microdilution both method. *Planta medica*, 65, 444-446.
- Konaté, K., Hilou, A., Mavoungou, J.F., Lepengué, A.N., Souza, A., Barro, N., Datté, J.Y., M'Batchi B., & Nacoulma, O.G. (2012). Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against cotrimoxazol-resistant bacteria strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(5), 1-6.
- Koné, W.M., Kamanzi Atindehou, K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., & Dosso, M. (2004). Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 93, 43-49.
- Kong, K.W., Khoo, H.E., Prasad, N.K., Chew, L.Y., & Amin, I. (2013). Total phenolics and antioxidant activities of *Pouteria campechiana* fruit parts. *Sains Malaysiana*, 42, 123-127.
- Kono, K., Tatara, I., Takeda, S., Arakawa, K., Hara, Y. (1994). Antibacterial activity of epigallocatechin gallate against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kansenshogaku Zasshi*, 68, 1518-1522.

- Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E., & Keinanen, M. (1998). Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of metaanalysis. *Oikos*, 83(2), 212-226.
- Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H., & Chew, W. (2010). Optimization of extraction of polyphenols from Syrian Sumac (*Rhus coriaria* L.) and Chinese Sumac (*Rhus typhina* L.) fruits. *Research Journal of Phytochemistry*, 4, 146-153.
- Kotilainen, T., Tegelberg, R., Julkunen-Tiitto, R., Lindfors, A., O'Hara R.B., & Aphalo P.J. (2010). Seasonal fluctuations in leaf phenolic composition under UV manipulations reflect contrasting strategies of alder and birch trees. *Physiol Plant*, 140, 297-309.
- Krause, M., & Galensa, R. (1991). High-performance liquid chromatography of diastereomeric flavanone glycosides in Citrus on a  $\alpha$ -cyclodextrin-bonded stationary phase (CyclobondI). *J.Chromatogr.*, 588, 41-45.
- Kumar, R., & Vaithyanathan, S. (1990). Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal feed Science and Technology*, 30, 21-28.
- Kumaran, A., & Joel Karunakaran, R. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. *LWT – Food Sci. Technol.*, 40, 344-352.
- Kuster, R.M., Arnold, N., & Wessjohann, L. (2009). Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 37(1), 63-65.

## L

- Lainé, E., Hano, C., & Lamblin, F. (2007). Les lignanes phyto-oestrogènes du lin sont ils des bienfaiteurs méconnus ?. *Phytothér.*, 5, 121-128.
- Lapornik, B., Prosek, M., & Wondra, A.G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Larson, J., Gottfries, J., Bohiin, L., & Backlund, A. (2005). Expanding the ChemGPS chemical space with natural products. *J. Nat. Prod.*, 68(7), 985-991.
- Leclerc, H. (2002). Bactériologie de *Pseudomonas aeruginosa*. *Presse therm. Climat.*, 139, 9-13.
- Latte, L.P., & Kolodziej, H. (2000). Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Naturforsch*, 55, 467-472.
- Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, P.J., Hoult, J., & Robin, S. (1989). Antioxydant and Prooxydant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol.*, 38(17), 2859-2865.
- Leclercq, R. (2002). Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.*, 21, 375-383.
- Lee, Y.J., Erdos, G., Hou, Z., Kim, S.H., Kim, J.H., Cho, J.M., & Corry, P.M. (1994). Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and

- thermotolerance development in HT-29 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 137, 141-154.
- Lee, K.H. (2004). Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *J. of Nat. Prod.*, 67, 273-283.
- Legendre, L., & Legendre, P. (1984). *Ecologie numérique- la structure des données écologiques*. Paris : Edition Masson, 335 p.
- Leitao, D.P., Polizello, A.C., Ito, I.Y., Spadaro, A.C. (2005). Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J. Med. Food*, 8, 36-40.
- Le Minor, L., Sansonetti, P., Richard, C., Grimont, F., Mollaret, H.H., & Bercovier, H. (1989). Entérobactéries. In L. Le Minoir, & M. Veron (Eds.), *Bactériologie médicale* (pp. 389-472). Paris : Flammarion.
- Lemozi, J., Bismuth, R., & Courvalin, P. (1985). Entérobactéries et aminosides. In P. Courvalin (Eds.), *L'antibiogramme* (pp. 111-125). Paris : MPC-Videom.
- Li, W., Asada, Y., & Yoshikawa, T. (1998). Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhizaglabra* hairy root cultures. *Planta Med.*, 64, 746-747.
- Li, C.Y., & Jackson, R.M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxiareoxygenation injury. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol*, 282, 227-241.
- Li, H., Wong, C., Cheng, K., & Chen, F. (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie*, 41, 385-390.
- Liao, L., Yin, X., & Wang, Z. (2012). Optimization of total flavonoid extraction in *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. using response surface methodology. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 5038-5047.
- Lin, J.K., & Weng, M.S. (2006). Flavonoids as Nutraceuticals. In E. Grotewold (Eds.), *The science of flavonoids* (pp. 213-238). New York: Springer Edition.
- Liu, I.X., Durham, D.G., & Richards, R.M.E. (2000). Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam-resistant strains of *S. aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52, 361-366.
- Liu, W., Yu, Y., Yang, R., Wan, C., Xu, B., & Cao, S. (2010). Optimization of total flavonoid compound extraction from *Gynura medica* leaf using response surface methodology and chemical composition analysis. *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 4750-4763.
- Lolayekar, N., & Shanbhag, C. (2012). Polyphenols and oral health. *RSBO*, 9(1), 74-84.
- Lopez-Andreu, F.J., Esteban, R.M., Molla, E., & Carpena, O. (1988). Effect of nutrition on tomato fruit quality.II.Carotenoids, ascorbic acid, pectic substances and flavonoids. *Anales de Edafologia y Agrobiologia*, 47(8), 1191-1198.
- Lopez-Ribot, J.L., Mc Atee, R.K., Perea, S., Kirkpatrick, W.R., Rinaldi, M.G., & Patterson, T.F. (1999). Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* coexist during episodes of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.*, 43, 1621-1630.

- Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailienė, A., & Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem.*, 103, 546-559.
- Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V., & Biro, L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediediensis*, 47, 119-124.
- Lumpkin, H. (2005). A comparison of lycopene and other phytochemicals in tomatoes grown under conventional and organic management systems. *Technical bulletin*, 34(5), 1-48.
- Lumthaler, M.B., Ambach, W., & Ellinger R. (1997). Increase in solar UV radiation with altitude. *J. Photochem. Photobiol.*, 39, 130-134.
- Luo, H.Y., Bin, W., Guang, Y.C., & Feng, X.Y. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Enteromorpha prolifera* by orthogonal test. *Chin. Herb. Med.*, 2, 321-325.
- Luthria, D.L., Mukhopadhyay, S., & Kwansa, A.L. (2006). A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as model substrate. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 86, 1350-1358.

## M

- Ma, Q., Fonseca, A., Liu, W., Fields, A.T., Pimsler, M.L., Spindola, A.F., Tarone, A.M., Crippen, T.L., Tomberlin, J.K., & Wood, T.K. (2012). *Proteus mirabilis* interkingdom swarming signals attract blow flies. *The ISME Journal*, 6(7), 1-11.
- Mac Donald-Wicks, L.K., Wood, L.G., & Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Montréal : Presse polytechnique, 192 p.
- Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., & Lima, J.L. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
- Mahattanatawee, K., Manthey, J.A., Luzio, G., Talcott, S.T., Goodner, K., & Baldwin, E.A. (2006). Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7355-7363.
- Males, Z., Zuntar, I., Nigovic, B., Plazibat, M., & Vundac, V.B. (2003). Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire (*Crithmum maritimum* L.). *Acta Pharm.*, 53, 139-144.
- Malinikova, E., Kukla, J., Kuklova, M., & Balazova, M. (2013). Altitudinal variation of plant traits: morphological characteristics in *Fragaria vesca* L. (Rosaceae). *Ann. For. Res.*, 56(1), 79-89.
- Mamadalieva, N.Z., Herrmann, F., El-Readib, M.Z., Tahrani, A., Hamoud, R., Egamberdieva, D.R., Azimova, S.S., & Wink, M. (2011). Flavonoids in *Scutellaria immaculata* and S.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ramosissima* (Lamiaceae) and their biological activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(10), 1346-1357.
- Mamatas, S. (1984). *La pharmacognosie appliquée : le pharmacien de France*. France : Phytoscience Edition, 286 p.
- Manil, J. (2004). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives (de *E. coli* : IV) souches necrotoxiques. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148, 121-132.
- Mann, C.M., Cox, S.D., & Markham, J.L. (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30, 294-297.
- Mannino, A.M., Vaglica V., & Oddo, E. (2014). Seasonal variation in total phenolic content of *Dictyopteris polypodioides* (Dictyotaceae) and *Cystoseira amentacea* (Sargassaceae) from the Sicilian coast. *Fl. Medit.*, 24, 39-50.
- Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S: Médecine Sciences*, 20(4), 458-463.
- Marfak, A. *Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : Formation des Depsides*. Thèse de Doctorat. Université de Limoges, 2003, 187 p.
- Marjorie, M.C. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4), 564-582.
- Markham, K.R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press, 113 p.
- Markham, K.R., Tanner, G.J., Caasi-Lit, M., Whitecross, M.I., Nayudu, M., & Mitchell, K.A. (1998). Possible protective role for 30, 40-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. *Phytochemistry*, 49, 1913-1919.
- Mateus, N., Proença, S., Ribeiro, P., Machado, J.M., & De Freitas, V. (2001). Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinifera* varieties concerning vineyard altitude. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 3(2), 102-110.
- Martini, A., Katerere, D.R., & Eloff, J.N. (2004). Seven flavonoïds with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharmacol.*, 93(3), 207-212.
- Mattila, P., & Kumpulainen, J. (2002). Détermination offree and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with Diode-Array détection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 3660-3667.
- Mavor, A.L., Thewes, S., & Hube, B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr. Drug. Targets*, 6, 863-874.
- Maydani, M. (2000a). Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am.J.Clin.Nutr.*, 71, 1665-1668.

- Maydani, M. (2000b). Vitamin E and prevention of heart disease in high-risk patients. *Nutr.Rev.*, 58, 278-281, *Phytother. Res.*, 16, 467-473.
- Mazandarani, M., Zarghami Moghaddam, P., Zolfaghari, M.R., Ghaemi, E.A., & Bayat, H. (2012). Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in *Onosma dichroanthum* Boiss. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 4481-4488.
- Mazur, W.M., Duke, J.A., Wahala, K., Rasku, S., & Adlercreutz, H. (1998). Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in Humans. *J. Nutr. Biochem.*, 9, 193-200.
- Mazza, G., & Miniati, E. (1993). "Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains", C. Press, Boca Raton, 362,12-18.
- Mc Allister, T.A., Bae, H.D., Muir, A.D., Jones, G.A., Yanke, L.J., & Cheng, K.J. (1994). Correlations between the chemical properties of condensed tannins isolated from various plants and their effects on the digestion of filter paper by *Fibrobacter succinogenes*. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.*, 3, 159.
- McDougall, G.J., Martinussen, I., Junttila, O., Verrall, S., & Stewart, D. (2011). Assessing the influence of genotype and temperature on polyphenol composition in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) using a novel mass spectrometric method. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 10860-10868.
- Mc Kenzi, B.E., & Peterson, C.A. (1995). Root browning in *Pinus banksiana* Lamb. And *Eucalyptus pilularis* Sm. Anatomy and permeability of the white and tannin zones. *Botanica Acta*, 108, 127-137.
- Medini, F., Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., & Abdelly, C. (2011). Effects of physiological stage and solvent on polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Limonium densiflorum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 6719-6730.
- Mehanso, H., Butler, L.G., & Carlson, D.M. (1987). Dietary tannins and salivary proline rich proteins: Interaction, induction and defense mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, 7, 423-440.
- Mehrabani, L.V., & Hassanpouraghdam, M.B. (2012). Developmental variation of phenolic compounds in fruit tissue of two apple cultivars. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*, 11(3), 259-264.
- Mendiratta, D.K., Rawat, V., Thamke, D., Chaturvedi, P., Chhabra, S., & Narang, P. (2006). *Candida* colonization in preterm babies admitted to neonatal intensive care unit in the rural setting. *Ind. J. Med. Microbiol.*, 24, 263-267.
- Merghem, R., Jay, M., Viricel, M.R., Bayet, C., & Voirin, B. (1995). Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*, 38, 637-640.
- Merken, H.M., & Beecher, G.R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 577-599.
- Miara, M.D., Ait Hammou, M., Hadjadj-Aoul, S., & Hamerlain, A.S. (2013). Bioclimats, étages de végétation et zonation altitudinale des groupements végétaux dans les Monts de Tiaret

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(exemple des groupements forestiers et preforestiers du massif de Guezoul). *Revue Ecologie-Environnement*, 9,1-7.

Mijanur, R., Shahdat, H., Asiqur, R., Nusrat, F., Taslima, N., Borhan, U., & Mafroz, A.B. (2013). Antioxidant activity of *Centella asiatica* (Linn.) urban: impact of extraction solvent polarity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), 27-32.

Milan, S., Stankovic, Niciforovic, N., Topuzovic, M., & Solujic, S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. Var. *Montanum*, F. *Supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 25(1), 2222-2227.

Milane, H. *La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques*. Thèse de Doctorat. Strasbourg : Université Louis Pasteur, 2004, 207 p.

Miski, M., Ulubelen, A., Johansson, C., & Mabry, T.J. (1983). Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. *J. Nat. Prod.*, 46, 874-875.

Mittelstra, K., Treutter, D., Plebi, M., Heller, W., Elstner, E.F., & Heiser, L. (2006). Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Plant Biology*, 8, 653-661.

Moahamad, M., Ali, M.W., & Ahmad, A. (2010). Modelling for extraction of major phytochemical components from *Eurycoma longifolia*. *J. Appl. Sci.*, 21, 2572-2577.

Modak, B. (2001). Actividad antibacteriana de flavonoïdes aislados des exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*. Efecto del tipo de estructura. *Bol. Soc. Quim.*, 47(1), 366-421.

Moerman, D.E., & Estabrook, G.F. (2003). Native Americans' choice of species for medicinal use is dependent on plant family: confirmation with meta-significance analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 51-59.

Mohammedi, Z., & Atik, F. (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix Aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma. and Bio Sciences*, 2, 609-615.

Mohsen, S.M., & Ammar, A.S.M. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem.*, 112, 95-598.

Mole, S., Ross, J.A.M., & Waterman, P.G. (1988). Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain forest plants. *I. Chemical changes*. *J. Chem. Ecol.*, 14, 1-21.

Mols, M., de Been, M., Zwietering, M.H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2007). Metabolic capacity of *Bacillus cereus* strains ATCC 14579 and ATCC 10987 interlinked with comparative genomics. *Environ. Microbiol.*, 9, 2933-2944.

Mondal, K., Sharma, N.S., Malhotra, S.P., Dhawan, K., & Singh, R. (2004). Oxidative stress and antioxidant systems in tomato fruits during storage. *Journal of Food Biochemistry*, 27(6), 515-527.

Monschein, M., Neira, J.I., Kunert, O., & Bucar, F. (2010). Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* L. Hull) and its altitudinal alteration. *Phytochem. Rev.*, 9(2), 205-215.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Moosophin, K., Wetthaisong, T., Seeratchakot, L., & Kokluecha, W. (2010). Tannin extraction from Mangosteen peel for protein precipitation in wine. *KKU Res. J.*, 15(5), 377-385.
- Morales-Cabrera, M., Hernández-Morales, J., Leyva-Rúelas, G., Salinas-Moreno, Y., Soto-Rojas, L., & Castro-Rosas, J. (2013). Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(31), 2319-2322.
- Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., & Roura, S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *L.W.T. Food Sci. Technol.*, 38, 565-570.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., & Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26, 2231-2234.
- Morreel, K., Goeminne, G., Storme, V., Sterck, L., Ralph, J., Coppieters, W., Breyne, P., Steenackers, M., Georges, M., Messens, E., & Boerjan, W. (2006). Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *Plant J.*, 47, 224-237.
- Morris, P., & Robbins, M.P. (1997). Manipulating condensed tannins in forage legumes. In B.D. Mc Kersie, & D.C.W. Brow (Eds.), *biotechnology and the improvement of forage legumes* (pp. 147-173). Wallingford: CAB International.
- Morsli, F., Bouyache, & Lechkab, T. (1998). *Résultats préliminaires sur le comportement de différentes espèces de peupliers : Étude générale de l'impact de la région de Aïn Skhouna*. Document élaboré par l'Institut National de la Recherche Scientifique, 58 p.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., & Truscott, T.G. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 385(1), 13-19.
- Mueller-Harvey, I., & Mc Allan, A.B. (1992). Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol.*, 1, 151-217.
- Mujica, M.V., Granito, M., & Soto, N. (2009). Importance of the extraction method in the quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* L. *Interciencia*, 34(9), 650-654.
- Mukhopadhyay, S., Luthria, D.L., & Robbins, R.J. (2006). Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cumicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 86, 156-162.
- Mullen, W., Stewart, A.J., Lean, M.E., Gardner, P., Duthie, G.G., & Crozier, A. (2002). Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5197-5201.
- Musa, K.H., Abdullah, A., Jusoh, K., & Subramaniam, V. (2011). Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): effect of extraction techniques and solvents. *Food Anal. Method.*, 4, 100-107.
- Mustapha, M.B., Adefisan, H.A., & Olawale, A.S. (2012). Studies of tannin extract yield from *Parkia clappertoniana*'s Husk. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(1), 65-68

## N

- N'guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G.N., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1), 1-15.
- N'Guessan, A.H.O., Déliko, C.E.D., Mamyrbékova-Békro, J.A., & Békro, Y.A. (2011). Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Revue de génie industriel*, 6, 55-61.
- Naas, T., Sougakoff, W., Casetta, A., & Nordmann, P. (1998). Molecular characterization of OXA-20, a novel class D  $\beta$ -lactamase and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 2074-2083.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054, 95-111.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- Naeem, S., Ali, M., & Mahmood, A. (2012). Optimization of extraction conditions for the extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* leaves. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 25(3), 535-541.
- Naghiloo, S., Movafeghi, A., Delazar, A., Nazemiyeh, H., Asnaashari, S., & Dadpour M.R. (2012) Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots, leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). *BiolImpacts*, 2(2), 105-109.
- Nakamura, Y., Ohto, Y., Murakami, A., Osawa, T., & Ohigashi, H. (1998). Inhibitory effects of curcumin and tetrahydrocurcuminoids on the tumor promoter-induced reactive oxygen species generation in leukocytes *in vitro* and *in vivo*. *Japanese Journal of Cancer Research*, 89, 361-370.
- Napolitano, A., Cascone, A., Graziani, G., Ferracane, R., Scalfi, L., Di Vaio, C., Ritieni, A., & Fogliano, V. (2004). Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6526-6531.
- Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., & Krishina, D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.*, 33, 2-16.
- Natarajan, D., John Britto, S., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., & Perumal, G. (2005). Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*: a rare medicinal herb. *J. Ethnopharmacol.*, 102, 123-126.
- Ncube, B., Finnie, J.F., & Van Staden, J. (2010). Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. *South Afr. J. Bot.*, 79, 1-10

- Ncube, B., Finnie, J.F., & Van Staden, J. (2012). Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 82, 11-20.
- Nepote, V., Grosso, N.R., & Guzman, C.A. (2005). Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *J. Sci. Food Agric.*, 85, 33-38.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., & Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037.
- Newmann, D., & Cragg G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 461-477.
- Ng, T.B., Ling, J.M., Wang, Z.T., Cai, J.N., & Xu, G.J. (1996). Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. *Gen. Pharmacol.*, 27, 1237-1240.
- Ngoune, L.T., Tanedjeu, K.S., Mbofung, C.M.F. (2009). Impact de l'utilisation des antibiotiques sur la sensibilité des bactéries pathogènes de poules dans la ville de Ngaoundéré. *Cameroon Journal of Experimental Biology*, 5(2), 52-61.
- Ni, Q., Xu, G., Wang, Z., Gao, Q., Wang, S., & Zhang, Y. (2012). Seasonal variations of the antioxidant composition in ground bamboo *Sasa argenteostriatus* leaves. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 2249-2262.
- Nikaido, H. (1988). Bacterial resistance to antibiotics as a function of outer membrane permeability. *J. Antimicrob. Chemother.*, 22, 17-22.
- Nikolopoulou, D., Grigorakis, K., Stasini, M., & Al. (2007). Differences in chemical composition of field pea (*Pisum sativum*) cultivars: Effects of cultivation area and year. In *Food Chemistry*, 103(3), 847-852.
- Nikolova, M., & Velickovic, D. (2007). Phenological variations in the surface flavonoids of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia absinthium* L. *Turkish Journal of Botany*, 31, 459-462.
- Nilsson, J., Pillai, D., Öning, G., Persson, C., Nilsson, A., & Akesson, B. (2005). Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 239-246.
- Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., Mori, A., Kobayashi, K., & Fukushima, M. (1987). Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 139-143.
- Nouredine, A. (2001) Fiche descriptive sur les Zones humides ramsar : Chott Ech-Chergui, commune de Aïn Skhouna, wilaya de Saïda, 6 p.

## O

- Ohba, H., & Amirouche, R. (2003). Observation of the Flora of Tadmit and Tidikelt, Central Sahara, Algeria. *Journal of Japanese Botany*, 78, 104-111.

- Ohemeng, K.A., Schwender, C.F., Fu, K.P., & Barrett, J.F. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3, 225-230.
- Okigbo, R.N., Mbajinka, C.S., Njoku, C.O. (2005). Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopiya aethopica* and *Occinum gratissimum* L. some pathogenous of man. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.*, 1(4), 392-397.
- Okuda, T., Kimura, Y., Yoshida, T., & Hatanv, T. (1983). Studies on the activities of tannins And Related coumpounds from medicinal plant and drugs. Inhibition effects of lipid peroxidation in mithchordria and microsome of liver. *Chem. pharm .Bull.*, 31, 1625-1631.
- Okuda, T., & Ito, H. (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16, 2191-2217.
- Oliveira, M., Tafuri, W., Afonso, L., Oliveira, M., Nicoli, J., & Vieira, E. (2005). Germ-free mice produce high levels of interferongamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. *Parasitology*, 131, 477-488.
- Olmez, H., & Yilmaz, A. (2009). Changes in chemical constituents and polyphenol oxidase activity of tea leaves with shoot maturity and cold storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 653-665.
- O.N.M. (2013). Organisation National de Météorologie. Recueil des données climatiques de : wilaya de Sidi Bel Abbés, Wilaya d'Oran, wilaya de Saïda et wilaya de Aïn Témouchent. Feuilles de relevées quotidiennes de la période 1980-2013. Alger.
- Ono, E., Hatayama, M., Isono, Y., Sato, T., Watanabe, R., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T., & Nakayama ,T. (2006). Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.*, 45, 133-143.
- Orhan, I.E., Belhattab, R., Senol, F.S., Gulpinar, A.R., Hosbas, S., & Kartal, M. (2010). Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *Artemisia herba-alba*, *Artemisia fragrans*, *Marrubium vulgare*, *Marrubium astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulossum* and essential oil analysis of two Artemisia species. *Ind. Crops. Prod.*, 32, 566-571.
- Ortuno, A., Baidez, A., Gomez, P., Arcas, M.C., Porras, I., Garcia-Lidon, A., & Del Rio, J.A. (2006). *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem.*, 98(2), 351-358.
- Osawa, K., Yasuda, H., Maruyama, T., Morita, H., Takeya, K., & Itokawa, H. (1992). Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 2970-2974.
- Osawa, T., Sugiyama, Y., & Inayoshi, M. (1995). Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 1609-1612.
- Ozenda, P. (1964). *Biogéographie végétale*. Paris : Doni, 374 p.
- Ozenda, P. (1977). *Flore du Sahara*. Paris : C.N.R.S., 622 p.

Ozkan, G., & Baydar, N.G. (2006). A direct rp-hplc determination of phenolic compounds in Turkish red wines. *Akdeniz Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi*, 19(2), 229-234.

## P

Packer, L., Witt, E.H., & Tritschler, H.J. (1995). Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.*, 19(2), 227-250.

Palou, L., Usall, J., Munoz, J.A., Smilanick, J.L., & Vinas, I. (2002). Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 93-96.

Panda, K., Chattopadhyay, R., Fhosh, M. K., & al. (1999). Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. *Free Radicals Biol. Med.*, 27, 1064-1079.

Parente, C.P., Reis Lima, M.J., Teixeira-Lemos, E., Moreira, M.M., Barros, A.A., & Guido, L.F. (2013). Phenolic Content and Antioxidant Activity Determination in Broccoli and Lamb's Lettuce. *Int. J. Biol. Vet. Agric. Food Eng.*, 7(7), 275-278.

Park, S., Jeong, W.Y., Lee, J.H., Kim, Y.H., Jeong, S.W., Kim, G.S., Bae, D.W., Lim, C.S., Jin, J.S., Lee, S.J., & Shin, S.C. (2012). Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 130, 981-985.

Pechère, J.C., & Vladoianu, I.R. (1992).Development of resistance during ceftazidime and cefepime therapy in a murine peritonitis model.*J. Antimicrob. Chemother.*, 29, 563-573.

Peguy, C.H.P. (1970). *Précis de climatologie*. France : Masson et Cie, 468 p.

Penalosa, J.M., Sarro, M.J., Revilla, E., Carpena, R., & Cadahia, C. (1989). Influence of phosphorus supply on tomato plant nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 12(5), 647- 657.

Penuelas, J., & Estiarte, M. (1998). Can elevated CO<sub>2</sub> affect secondary metabolism and ecosystem function?. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(1), 20-24.

Pepeljnjak, S., & Kosalec, I. (2004). Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. And *Pseudomonas aeruginosa*. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.*, 240, 111-116.

Pepeljnjak, S., Kaloera, Z., & Zovko, M. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids from *Pelargonium radula* (Cav.). *Acta Pharm.*, 55, 431-435.

Pérez, M.B., Calderón, N.L., & Croci, C.A. (2007). Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chem.*, 104, 585-592.

Perez-Viscaino, F., Durate, J., & Andriantsitohaina, R. (2006). Endothelial function and cardiovascular disease :effecys of quercetin and wine polyphenols. *Free Radical Res.*, 40, 1054-1065.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., Calbi, P., & Gambacorta, E. (2014). Effect of geographical provenance on the physico-chemical, antioxidant characteristics and sensory evaluation of chestnut honeys. *IJFANS.*, 3(6), 86-96.
- Peronny, S. *La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (Lemur catta)*. Thèse de Doctorat. Paris (France) : Muséum National d'Histoire Naturelle, 2005, 151 p.
- Perret, C. *Analyse de tannins inhibiteurs de la stilbene oxydase produite pour Botrytis cinerea Pers.* Thèse de Doctorat. Neuchâtel (Suisse) : Université de Neuchâtel, 2001, 173 p.
- Perva-Uzunalic, A., Skerget, M., Knez, Z., Weinreich, B., Otto, F., & Grucher, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*), extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, 96, 597-605.
- Peyret, M. (1991). Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. *Lyon Pharmaceutique Elsevier*, 42, 31-41.
- Pieri, F., & Kirkiacharian, S. (1992). *Pharmacologie et Thérapeutique* (2<sup>ème</sup> Eds.). Paris : Edition Marketing, 443 p.
- Pieron, A., Janiak, V., Dürr, C.M., Lüdeke, S., Trachsel, E., & Heinrich, M. (2002). *In vitro* antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic albanians in southern Italy. *Phytother.Res.*, 16, 467-473.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63, 1035-1042.
- Pineli, L.L., Moretti, C.L., Rodrigues, J.S., Ferreira, D.B., & Chiarello, M.D. (2012). Variations in antioxidant properties of strawberries grown in Brazilian savannah and harvested in different seasons. *J. Sci. Food Agric.*, 92(4), 831-838.
- Poirel, L., Girlich, D., Naas, T., & Nordmann, P. (2001). OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 447-453.
- Poirot, R. *Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale*. Thèse de Doctorat. Toulouse : Institut National Polytechnique, 2007, 129 p.
- Pomilio, A.B., Buschi, C.A., Tomes, C.N., & Viale, A.A. (1992). Antimicrobial constituents of *Gomphrena martiana* and *Gomphrena boliviana*. *J. Ethnopharmacol.*, 36, 155-161.
- Poole, K. (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 500-508.
- Pouquet, J. (1952). Les monts du Tessala (chaines sud-telliennes d'Oranais). *Rev. De géogr. Alpine.*, 691-694.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 3273-3279.

Prior, R.L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.

Proestos C. & Komaitis M. (2013). Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC coupled to diode array detector (DAD) and GC-MS after silylation. *Foods*, 2, 90-99.

Pukalskas, A., Venskutonis, P.R., Salido, S., De Waard, P., & Van Beek, T.A. (2012). Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food Chemistry*, 130, 695-701.

Punyasiri, P.A., Abeysinghe, S.B., & Kumar, V. (2005). Performed and induced chemical resistance of tea leaf against *Exobasidium vexans* infections. *J. Chem. Agri.*, 31, 1315-1324.

Puppo, A. (1992). Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by fenton-type reactions; influence of the iron chelator. *Phytochemistry*, 31(1), 85-88.

### Q

Quezel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvel Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales* (Tome II). Paris : CNRS, 605 p.

Quideau, S., & Feldman, K.S. (1996). Ellagitannin chemistry. *Chemical Reviews*, 96, 475-503.

### R

Raadix, P., Bastien, C., Jay-Allemand, C., Charlot, G., & Seigle-Murandi, F. (1998). The influence of soil nature on polyphenols in walnut tissues. A possible explanation of differences in the expression of walnut blight. *Agronomie*, 18, 627-637.

Raal, A., Orav, A., Pussa, T., Valner, C., Malmiste, B., & Arak, E. (2012). Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. *Food Chemistry*, 131, 632-638.

Rahman, I. (2002). Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 1(3), 291-315.

Rajeshwari, C.U., & Andallu, B. (2011). Isolation and simultaneous detection of flavonoids in the methanolic and ethanolic extracts of *Coriandrum sativum* L. seeds by RP-HPLC. *Pak. J. Food Sci.*, 21(4), 13-21.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ramah, S., Etwarysing, L., Auckloo, N., Gopeechund, A., Bhagooli, R., & Bahorun, T. (2014). Prophylactic antioxidants and phenolics of seagrass and seaweed species: a seasonal variation study in a Southern Indian Ocean Island, Mauritius. *Internet Journal of Medical Update*, 9(1), 27-37.
- Ramos-Guerra, M.C., Mata-Cárdenas, B.D., Vargas-Villarreal, J., Sampayo-Reyes, A., González-Salazar, F., Morales-Vallarta, M., & Said-Fernández, S. (2007). *In vitro* activity of organic leaf/stem extracts from *Marrubium vulgare* and *Mentha spicata* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Pharmacologyonline*, 1, 108-112.
- Rana, K.K., Wadhwa, M., & Bakshi, M.P.S. (2006). Seasonal variations in tannin profile of tree leaves. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 8(19), 1134-1138.
- Ranwan, S., & Yadav, J.P. (2012). Seasonal variation in antibacterial activity of different parts of *Achyranthes aspera* against some bacteria. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 2(3), 369-375.
- Rathod, V.S., Raut, J.S., & Karuppayil, S.M. (2012). In vitro antifungal susceptibility reveals occurrence of azole resistance among clinical isolates of *Candida albicans*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 170-173.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., & Iinuma, M. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 56, 3-12.
- Rechner, A.R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G.P., Moore, K.P., & Rice-Evans, C.A. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 220-235.
- Reese, J.C., Chan B.G., & Waiss, A.C. (1982). Effects of cotton condensed tannin, Maysin (corn) and Pinitol (soybeans) on *Heliothis zea* growth and development. *Journal of Chemical Ecology*, 8, 1429-1436.
- Rex, J.H., Rinaldi, M.G., & Pfaller, M.A. (1995). Resistance of *Candida* species to fluconazole (Minireview). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1-8.
- Ribereau, G.P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux. Traité d'œnologie*. Paris : Dunod, 254 p.
- Rice-Evans, C., & Burdon, R. (1993). Free radical interactions and their pathological consequences. *Progress in lipid research*, 32(1), 71-110.
- Richard, S., Steele-Moore, L., & Goodwin, A.C. (2007). *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Boca Raton: CRC Press, 77 p.
- Rieger, G., Muller, M., Guttenberger, H., & Bucar, F. (2008). Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 9080-9086.
- Rigano, D., Formisano, C., Basile, A., Lavitola, A., Senatore, F., Rosselli, S., & Bruno, M. (2007). Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum*. *Phytother. Res.*, 21, 395-397.

- Rigi, M., Shafeghat, M., & Saeidi, S. (2013). Antibacterial activity of hydroalcoholic *Marrubium vulgare* L. extract in experimental condition. *International Research Journal of Applied and Basic Science*, 5(4), 433-435.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Garcia, P.C., Lopez-Lefebvre, L.R., Sanchez, E., & Romero, L. (2001). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160, 315-321.
- Rocha-Guzman, N.E., Gonzalez-Laredo, R.F., Ibarra-Prez, F.J., Nava-Bermen, C.A., & Gallegos-Infante, J.A. (2007). Effect of pressure cooking on the antioxidant activity of extracts from three common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Food Chem.*, 100, 31-35.
- Rollinger, J.M., Haupt, S., Stuppner, H., & Langer, T.J. (2004). Combining ethnopharmacology and virtual screening for lead structure discovery: COX-Inhibitors as application example. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 44, 480-488.
- Roman, R.R., Aharcon, A.F., Lara, L.A., & Flores, S.J.L. (1992). Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch. Med. Res.* 23(1), 59-64.
- Rodriguez-Bernaldo, D.Q.A., Lage-Yusty, M.A., & Lopez-Hernandez, J. (2009). HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, 42, 1018-1022.
- Ru, Q.M., Wang, L.J., Li, W.M., Wang, J.L., & Ding, Y.T (2012). *In vitro* antioxidant properties of flavonoids and polysaccharides extract from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Molecules*, 17, 11281-11291.
- Rugna, A.Z., Gurni, A.A., & Wagner, M.L. (2013). Phenological variations of polyphenols in *Smilax campestris* (Smilacaceae). *Turkish Journal of Botany*, 37, 350-354.
- Ruiz, J.M., Bretones, G., Baghour, M., Ragala, L., Belakbir, A., & Romero, L. (1998). Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochemistry*, 48(2), 269-272.
- Ryder, N.S., Wagner, S., & Leitner, I. (1998). *In vitro* activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 1057-1061.

## **S**

- Sagdic, O., & Ozcan, M. (2003). Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control Elsevier*, 14, 141-143.
- Sahoo, K.P., Kasera, P.K., & Sher M. (2012). Secondary metabolites produced during different seasons in some arid medicinal plants. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2(6), 650-652.

- Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M., & Bailleul, F. (2002). Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoïds esters from *Marrubium vulgare*. *J. Ethnopharmacol.*, 79, 389-392.
- Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., & Yamamoto, T. (1989). Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2307-2311.
- Sakar, M.K., Engelshowe, R., & Tamer, A.U. (1992). Isolation and antimicrobial activity of flavonoids from *Prunus spinosa* L. flowers. *Hacettepe Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 12, 59-63.
- Sampath, M. (2013). Optimization of the extraction process of phenolic antioxidant from *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thawaites. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(2), 148-152.
- Samuagam, L., Sia, C.M., Akowuah, G.A., Okechukwu, P.N., & Yim, H.S. (2013). The effect of extraction conditions on total phenolic content and free radical scavenging capacity of selected tropical fruits' peel. *Health and the Environment Journal*, 4(2), 80-102.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., & Saura-Calixto, F.A. (1998). procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.
- Sardsaengjun, C., & Jutiviboonsuk, A. (2010). Effect of temperature and duration time on polyphenols extract of *Areca catechu* Linn. seeds. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 5(1), 14-17.
- Sarkar, A., Bishayee, M., & Chatterjee, I.B. (1995). Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepato carcinogenesis. *Cancer Biochem. Biophys.*, 15, 111-125.
- Sarojini, Y., Sujatha, B., & Lakshminarayana K. (2013). Total phenol content and antioxidant activities of ethanolic extracts of two marine brown macroalgae. *Int. J. Curr. Sci.*, 8, 43-49.
- Sartor, T., Xavier, V.B., Falcao, M.A., Mondin, C.A., dos Santos, M.A., Cassel, E., Astarita, L.V., & Santarém, E.R. (2013). Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. *Industrial Crops and Products*, 51, 355-359.
- Sasikumar, J.M., Mathew, G.M., & Darsini, D.T.P. (2012). Comparative studies on antioxidant activity of methanol extract and flavonoid fraction of *Nyctanthes arbortristis* leaves. *J. EJEAFChe*, 9(1), 227-233.
- Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata, H., & Higuti, T. (2000). Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.*, 72, 483-488.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sauvage, C. (1960). *Recherches géobotaniques sur le chêne liégé au Maroc. Trav. Inst. Scie. Cherf. Série botanique*, 21, 1-462.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J., Nutr.*, 130, 2073-2085.
- Schewe, T., & Sies, H. (2003). Flavonoids as protectants against prooxidant enzymes. *Biologie médicale*, 34, 243-253.
- Schlemper, V., Ribas, A., Nicolau, M., & Cechinel-Filho, V. (1996). Antispasmodic effects of hydroalcoholic extracts of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedecine*, 7, 103-107.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research*, 36, 177-187.
- Seltzer, P. (1946). *Le climat de l'Algérie*. Alger : Trav.Inst.Météorol. Phys.Globe, 219 p.
- Sen, S., & Sharma, V. (1996). Tonoplast ATPase of peanut seedlings: Properties and interaction with phytohormones and phenolics. *Plant Physiol. Biochem.*, 23, 1-8.
- Sen, A., & Batra, A. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Melia azedarach* L. *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, 4(2), 67-73.
- Sereme, A., Millogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., & Nacro, M. (2010). Anatomy and tannins concentration in tannins producing species of Burkina Faso. *J. Sci.Vol.*, 10(2), 24-32.
- Settharaksa, S., Jongjareonrak, A., Hmadhlu, P., Chansuwan, W., & Siripongvutikorn, S. (2012). Flavonoid, phenolic contents and antioxidant properties of Thai hot curry paste extract and its ingredients as affected of pH, solvent types and high temperature. *International Food Research Journal*, 19, 1581-1587.
- Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F.K. (2006) Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of phytochemistr.*, 67, 2058-2070.
- Shad, M.A., Nawaz, H., Rehman, T., Ahmad, H.B., & Hussain, M. (2012). Optimization of extraction efficiency of tannins from *Cichorium intybus* L.: Application of response surface methodology. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(28), 4467-4474.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. (2007). The *in vitro*antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 112-119.
- Sharifi, A., & Hassani, B. (2012). Extraction methods and stability of color extracted from barberry pigments. *International Journal of AgriScience*, 2(4), 320-327.
- Sharma, O.P., & Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202-1205.
- Shimizu, H. (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke*, 35(9), 2072-2077.
- Shizuka, S., & Kawabata, J.J. (2005). Effects of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents. *Tetrahedron*, 61, 8101-8108.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Siatka, T., & Kasparova, M. (2010). Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and dpph scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. *Molecules*, 15, 9450-9461.
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10-19.
- Silver, L., & Bostian, K. (1990). Screening of natural products for antimicrobial agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9, 455-461.
- Sirof, J. (1989). Résistance enzymatique des bacilles à gram négatif aux céphalosporines de 3ème génération: ceftriaxone et antibiothérapie empirique. *Med. Mal. Infect.*, 19, 24-30.
- Slavica, B., Ilic, S.S.K., & B. Zoran B.T. (2004). Flavonoids from flower of *Linum capitatum* kit. *Phys. Chem. Technol.*, 3, 67-71.
- Slimestad, R., & Verheul, M.J. (2005). Seasonal variation in the level of plant constituents in greenhouse production of cherry tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3114-3119.
- Smith, M.A., Perry, G., Richey, P.L., Sayre, L.M., Anderson, V.E., & Beal, M.F. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*, 382, 120.
- Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M. (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr.Med.Chem.*, 11, 1135-1146.
- Snyder, L.R., & Kirkland, J.J. (1979). *Introduction to modern liquid chromatography* (2<sup>e</sup> Eds.). New York : Wiley J.& Sons Inc., 856 p.
- Soto-Zamora, G., Yahia, E.M., Brecht, J.K., & Gerdena, A. (2004). Effects of the post harvested hot air treatments on the quality and antioxidant levels in tomato fruit". *Scientia Horticulturae*, 84, 284-296.
- Soumaya, K., Chaouachi, F., Ksouri, R., & El Gazzah, M. (2013). Polyphenolic composition in different organs of Tunisia populations of *Cynara Cardunculus*.L and their antioxidant activity. *Journal of Food and Nutrition Research*, 1(1), 1-6.
- Souto, X.C., Chiapusio, G., & Pellissier, F. (2000). Relationships between phenolics and soil microorganisms in spruce forests: Significance for natural regeneration. *J. Chem. Ecol.*, 26, 2025-2034.
- Souto, X.C., Bolano, J.C., Gonzalez, L., & Reigosa, M.J. (2001). Allelopathic effects of tree species on some soil microbial populations and herbaceous plants. *Biol. Planta.*, 44, 269-275.
- Souza, D., Vieira, A., Soares, A., Pinho, V. Nicoli, J., & Vieira, L. (2004). The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *The Journal of Immunology*, 173, 4137-4146.
- Spedding, G., Ratty, A., & Middleton, E.J. (1989). Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antivir. Res.*, 12(2), 99-110.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.*, *81*, 200-208.
- Spitaler, R., Schlorhauser, P.D., Ellmerer, E.P., Merfort, I., Bortenschlager, S., Stuppner, H., & Zidorn, C. (2006). Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana*. *Phytochemistry*, *67*, 409-417.
- Stafford, H.A. (1989). The enzymology of proanthocyanidin biosynthesis. In: R.W. Hemingway and J.J. Kerchesy (Eds.), *Chemistry And Significance Of Condensed Tannins* (pp. 47-70). New York: Plenum press.
- Stafford, H.A. (1990). *Flavonoid metabolism*. USA: CRS Press, Boca Raton, 63-99 p.
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M., & Adelberg, E.A. (1966). *Microbiologie Générale*. Paris : Masson et Cie Editeurs. 638 p.
- Stankovic, M.S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J. Sci.*, *33*, 63-72.
- Stankovic, M.S., Niciforovic, N., Topuzovic, M., & Solujic, S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. Var. *montanum*, f. *Supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnol. & Biotechnol*, *25*(1), 2222-2227.
- Stapleton, P.D., Shah, S., Hamilton-Miller, J.M.T., Hara, Y., Nagaoka, Y., Kumagai, A., Uesato, S., & Taylor, P.W. (2004). Anti- *Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins. *Int. J. Antimicrob. Agents*, *24*, 374-380.
- Stefkov, G., Karapandzova, M., Stefova, M., & Kulevanova, S. (2009). Seasonal variation of flavonoids in *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Macedonian pharmaceutical bulletin*, *55*(2), 33-40.
- Stewart, A.J., Chapman, W., Jenkins, G.I., Graham, I., Martin, T., Crozier, A. (2001). The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant, Cell and Environment*, *24*, 1189-1197.
- Stine Krogh Steffensen, A., Asmund Rinnan, B., Anne, G., Mortensen, G., Bente Laursen, G., Rosa, M., De Troiani, C., Elke, J., Noellemeyer, C., Dagmar Janovska, D., Karel Dusek, D., John Délano-Frier, E., Andreu Taberner, F., Carsten Christophersen, A., Inge, S., & Fomsgaard, G. (2011). Variations in the polyphenol content of seeds of field grown *Amaranthus* genotypes. *Food Chemistry*, *129*, 131-138.
- Stout, M.J., Brovont, R.A., & Duffey, S.S. (1998). Effect of nitrogen availability on expression of constitutive and inducible chemical defenses in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology*, *24*(6), 945-963.
- Sturgill, G., & Rather, P.N. (2004). Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.*, *51*, 437-446.

- Sudatti, D.B., Fujii, M.T., Rodrigues, S.V., Turra, A., & Pereira, R.C. (2011). Effects of abiotic factors on growth and chemical defenses in cultivated clones of *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales, Rhodophyta). *Mar. Biol.*, *10*, 1-8.
- Sugiyama, Y., Kawakishi, S., & Osawa, T. (1996). Involvement of the b-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochemical Pharmacology*, *52*, 519-525.
- Sulaiman, S.F., Sajak, A.A.B., Supriatno, K.L.O., & Seow, E.M. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *J. Food Comp. Anal.*, *24*, 506-515.
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*, *14*, 2167-2180.
- Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., & Zhang, Y. (2011). Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem. Toxicol.*, *49*, 2689-2696.
- Surarit, R., Gopal, P.K., & Shepherd, M.G. (1988). Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, *134*, 1723-1730.
- Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., & Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.*, *102*, 938-953.
- Swain, T. (1979). Tannins and lignins. In G.A. Rosenthal and D.H. Janzen (Eds.), *Herbivores* (pp. 657-682). New York: Academic Press.
- Syukriah, A.R., Liza, M.S., Harisun, Y., & Fadzillah, A.A.M. (2014). Effect of solvent extraction on antioxidant and antibacterial activities from *Quercus infectoria* (Manjakani). *International Food Research Journal*, *21*(3), 1067-1073.
- Szigeti, G., Sedaghati, E., Mahmoudabadi, A.Z., Naseri, A., Kocsubé, S., Vágvölgyi, C., & Varga, J. (2012). Species assignment and antifungal susceptibilities of black aspergilli recovered from otomycosis cases in Iran. *Mycoses*, *55*, 333-338.

## T

- Tajali, A.K., & Khazaeipool, M. (2012). Effects of height and organs on flavonoids of *Crataegus microphylla* C. Koch in Iran. *International Journal of Biosciences*, *2*(7), 54-58.
- Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G.I., & Nishioka, I. (1985). Structure and antiherpetic activity among the tannins. *Phytochemistry*, *24*(10), 2245-2250.
- Tamura, H., Hayashi, Y., Sugisawa, H., & Kondo, T. (1994). Structure determination of acylated anthocyanins in Muscat Bailey A grapes by homonuclear Hartmann-Hahn (HOHAHA) spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry. *Phytochem. Anal.*, *5*, 190-196.

- Tan, P.W., Tan, C.P., & Ho, C.W. (2011). Antioxidant properties: effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centella asiatica*). *International Food Research Journal*, 18, 557-562.
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., & Ruedi, P. (2006). Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1352-1364.
- Tasioula-Margari, T., & Okogeri, O. (2001). Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC-MS. *Food Chemistry and Toxicology*, 66(4), 530-534.
- Tatiya, A.U., Tapadiya, G.G., Kotecha, S., & Surana, S.J. (2011). Effect of solvents on total phenolics, antioxidant and antimicrobial properties of *Bridelia retusa* Spreng. stem bark. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(4), 442-447.
- Teh, S.S., Bekhit, A.E., & Birch, J. (2014). Antioxidative polyphenols from defatted oilseed cakes: effect of solvents. *Antioxidants*, 3, 67-80.
- Telli, A., Mahboub, N., Boudjeh, S., Siboukeur, O.E.K., & Moulti-Mati., F. (2010). Optimisation des conditions d'extraction des polyphenols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) variété Ghars. *Annales des Sciences et Technologie*, 2(2), 107-114.
- Tereschuk, M.L., Riera, M.V., Castro, G.R., & Abdala, L.R. (1997). Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J. Ethnopharmacol.*, 56, 227-232.
- Terra, X., Valls, J., Vitrac, X., Mérillon, J.M., Arola, L., Ardévol, A., Bladé, C., Fernanadez-Larrea, J., Pujadas, J., Salvado, J., & Blay, M. (2007). Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophage by inhibiting NFκB signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4357-4365.
- Terrill, T.H., Douglas, G.B., Foote, A.G., Purchas, R.W., Wilson, G.F., & Barry, T.N. (1992). Effects of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *J. Agric. Sci.*, 119, 265-273.
- Thintoin, R. (1948). *Les aspects physiques du Tell oranais, essai de morphologie de pays semi-arides*. France : Ed. L. Fouqué, 639 p.
- Thiombiano, A., Millogo-Rasolodimby, J., & Guinko, S. (2001). Anatomical of *Terminalia* (*Combretaceae*) species collected from eastern Burkina Faso. *Ann. Bot. Afr.*, 1, 43-52.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98-106.
- Tlili-Ait Kaki, Y., Bennadja, S., & Chefrou, A. (2013). Revalorisation d'une essence endémique: le sapin de Numidie (*Abies numidica*). *Fl. Medit.*, 23, 123-129.
- Toffali, K., Zamboni, A., Anesi, A., Stocchero, M., Pezzotti, M., Levi, M., & Guzzo, F. (2011). Novel aspects of grape berry ripening and post-harvest withering revealed by untargeted LC-ESI-MS metabolomics analysis. *Metabolomics*, 7, 424-436.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Toker, Z. (2009). Variation of total hypericin, phenolic and flavonoid compounds in *Hypericum triquetrifolium* during its phenological cycle. *Pharmaceutical Biology*, 47, 285-288
- Tomofuji, T., Ekuni, D., Irie, K., Azuma, T., Endo, Y., Tamaki, N., Sanbe, T., Murakami, J., Yamamoto, T., & Morita, M. (2009). Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingivaloxidative stress in experimental periodontitis. *J. Periodontol.*, 80(11), 1799-1808.
- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., Hajlaoui, H., & Abdely, C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 632-639.
- Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., & Coulibaly, A. (2012). Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *J. Appl. Biosci.*, 58, 4234-4242.
- Treutter, D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7, 581-591.
- Troude, C., Lenoir, R., & Passouant, M. (1993). *Méthodes statistiques sous LISA (Statistiques multivariées)*. Paris : Ruraux CIRAD/SAR, 160 p.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., & Inuma, M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.*, 50, 27-34.
- Tsuchiya, H., & Inuma, M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7, 161-165.
- Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, S. (2006). Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99, 838-841.
- Turkmen, N., Velioglu, Y.S., Sari, F., & Polat, G. (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12, 484-496.

## U

- Ulanowska, K., Traczyk, A., Konopa, G., & Wegrzym, G. (2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.*, 184(5), 271-278.
- Ulukanli, Z., & Akkaya, A. (2011). Antibacterial Activities of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens* Var. Hirta Grown Wild in Eastern Anatolia, Turkey. *Int. J. Agric. Biol.*, 13(1), 105-109.

- Uma, D.B., Ho, C.W., & Aida, W.M.W. (2010). Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana*, 39, 119-128.
- Unten, L., Koketsu, M., & Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on  $\beta$ -carotène. *J. Agr. Food. Chem.*, 45, 2009-2019.
- Ushio-Fukai, M., & Nakamura, Y. (2008). Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett.*, 266, 37-52.

## V

- Vallejo, F., Tomas-Barberan, F., & Garcia-Viguera, C. (2003). Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3029-3034.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160(1), 1-40.
- Van Acker, S.A.B.E, Tromp, M., Haenen, G., Van Der Vijgh, W., & Bast, A. (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 214(3), 755-759.
- 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.
- Van Antwerpen, P. *Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène /chlorure*. Thèse de Doctorat. Bruxelles : Académie universitaire Wallonie-Bruxelles, 2006, 145 p.
- Vanden Bosshe, H., Marichal, P., Odds, F.C., Le Jeune, L., & Coene, M.C. (1992). Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 2602-2610.
- Van Der Sluis, A.A., Dekker, M., De Jager, A., & Jongen, W.M.F. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in Apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3606-3613.
- Vergara-Galicia, J., Aguirre-Crespo, F., Tun-Suarez, A., Alejandra, A.C., Estrada-Carrillo, M., Jaimes-Huerta, I., Flores-Flores, A., Estrada-Soto, S., & Ortiz-Andrade, R. (2012). Acute hypoglycemic effect of ethanolic extracts from *Marrubium vulgare*. *Phytopharmacology*, 3(1), 54-60.
- Verma, V., & Kasera, P.K. (2007). Variations in secondary metabolites in some arid zone medicinal plants in relation to season and plant growth. *Indian J. Plant. Physiol.*, 12, 203-206.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound chemistry*. USA: Springer Editions, 276 p.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Veroffa, L., Dell'aghi, M., Giolito, A., Guerini, M., Cabalion, P., & Basisio, E. (2001). *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of *Tristaniopsis* species (Myrtaceae) and identification of the active constituents: ellagic acid and 3,4,5, trimethoxyphenyl-(6'-O-galloyl)-O- $\beta$ -D-glucopyranoside. *Journal of Natural Product.*, 64(5), 603-607.
- Véron, M. (1989). Pseudomonadaceae. In L. Le Minor, & M. Véron (Eds.), *Bactériologie médicale*(pp. 555-587). Paris : Flammarion-Sciences.
- Verpoorte, R. (2002). *La pharmacognosie du nouveau millénaire : pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 4<sup>e</sup> congrès européen d'ethnopharmacologie.* Paris : IRD Edition, 274 p.
- Veveris, M., Kock, E., & Chatterjée, S.S. (2004). *Crataegus* special extract WS1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion. *Life Science*, 74, 1945-1955.
- Vigneau, C. (1985). *Plantes médicinales : Thérapeutique - Toxicité, Collection de médecine légale et de Toxicologie Médicale N° 1.* Paris : Masson, 224 p.
- Vincenot, F., Saleh, M., & Prevost, G. (2008). Les facteurs de virulence de *staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*, 407, 61-69.
- Vinha, A.F., Machado, M., Santos, A., & Oliveira, M.P.P (2012). Study of the influences by geographical origin in chemical characters, sugars, and antioxidant activity of Portuguese autochthonous *Prunus armeniaca* L. *Experimental Agriculture & Horticulture*, 8, 8-20.
- Vinod, K.G., Amit, R., Vikas, K.N., & Kalishankar, M. (2010). Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(16), 1656-1661.
- Vladimir-Knezevic, S., Blazekovic, B., Kindl, M., Vladic, J., Lower-Nedza, A.D., & Brantner, A.H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the lamiaceae family. *Molecules*, 19, 767-782.
- Vlietinck, A.J., De Bruyne, T., Apers, S., & Pieters, L.A. (1997). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of (HIV) infection. *Planta Medica.*, 64, 97-109.
- Vogt, T., Gultz, P.G., & Reznik, H. (1991). UV radiation dependent flavonoid accumulation of *Cistus laurifolius* L. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 46, 37-42.

## W

- Waage, S.K., & Hedin, P.A. (1985). Quercetin 3-O-galactosyl-(1-6)-glucoside, a compound from narrowleaf vetch with antibacterial activity. *Phytochemistry*, 24, 243-245.
- Wang, S., & Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4977-4982.
- Wang, J., & Mazza, G. (2002). Effects of Anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis. *Food chemistry*, 50, 4183-4189.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wang, S.Y., Bunce, J.A., & Maas, J.L. (2003). Elevated carbon dioxide increases contents of antioxidant compounds in field-grown strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4315-4320.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008a). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106(2), 804-810.
- Wang, H., Gao, X.D., Zhou, G.C., Cai, L., & Yao, W.B. (2008b). *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chem.*, 106, 888-895.
- Warda, K., Markouk, M., Bekkouche, K., Larhsini, M., Abbad, A., Romane, A., & Bouskraoui, M. (2009). Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumonia*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(3), 101-104.
- Weber, D.J., Saviteer, S.M., Rutala, W.A., & Thomann, C.A. (1988). *In vitro* susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, 642-645.
- Weel, K.C.G., Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., Gruzdiene, D., & Linssen, J.P.H. (1999). Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania. *Fett/Lipid*, 101(10), 395-400.
- Wei, H., Li, L., Yan, X., & Wang, Y. (2013). Effects of soil drought stress on the accumulation of alkaloids and flavonoids in motherwort. *Advances in information Sciences and Service Sciences*, 5(6), 795-803.
- Wellmann, E. (1974). Regulation der Flavonoidbiosynthese durch ultraviolette Licht und phytochrom in Zellkulturen und Keimlingen von Petersilie (*Petroselinum hortense* Hoffm.). *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 87, 267-273.
- Wen, D., Chenchen, L., Hao, D., Yiping, L., & Liu, H. (2005). A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6624-6629.
- White, T.C. (1997). Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 1482-1487.
- Wilkens, R.T., Spoerke, J.M., Stamp, N.E. (1996). Differential responses of growth and two soluble phenolics of tomato to resource availability. *Ecology*, 77(1), 247-258.
- Williams, V.M., Porter, L.J., & Hemingway, R.W. (1983). Molecular weight profiles of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry*, 22, 569-752.
- Wina, E., Susana, I.W.R., & Tangendjaja, B. (2010). Biological activity of tannins from *Acacia mangium* bark extracted by different solvents. *Media Peternakan*, 33, 103-107.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem*, 105, 940-949.
- Woo, J.H., Kitamura, E., Myouga, H., & Kanei, Y. (2002). An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain Ap77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rad disease in porphyra SPP. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(6), 2665-75.

Woodward, A., & Coppock, D.L. (1995). Role of plant defense in the utilization of native browse in southern Ethiopia. *Agroforestry Systems*, 32(2), 147-161.

Wright, C.W. (2010). Recent developments in research on terrestrial plants used for treatment of malaria. *Natural Product Reports*, 27, 961-968.

### X

Xu, B., & Chang, S.K. (2009). Phytochemical profiles and health-promoting effects of cool-season food legumes as influenced by thermal processing. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 10718-10731.

Xueling, Z., Benguo, L., Limin, L., & Xiaoi, Z. (2011). Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of total phenolic compounds from pomegranate peel. *J. Med. Plants Res.*, 5(6), 1004-1011.

### Y

Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M.C., & Ayachi A. (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, 9, 209-218.

Yamaguchi, K., Liggett, J.L., Kim, N.C., & Baek, S.J. (2006). Anti-proliferative effect of horehound leaf and wild cherry bark extracts on human colorectal cancer cells. *Oncol. Rep*, 15, 275-81.

Yamane, T., Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Koshita, Y., & Kobayashi, S. (2006). Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 54-59.

Yang, J., Chen, C., Zhao, S., Ge, F., & Liu, D. (2014). Effect of solvents on the antioxidant activity of walnut (*Juglans regia* L.) shell extracts. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(9), 621-626.

Ybert, E. (2001). *Petit Larousse de la médecine*. Paris : Larousse-Bordas, 1087 p.

Yee, Y.K., & Koo, M.W. (2000). Anti-*Helicobacter pylori* activity of Chinese tea: *in vitro* study. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 14, 635-638.

Yesland, K., & Fonzi, W.A. (2000). Allele-specific gene targeting in *Candida albicans* results from heterology between alleles. *Microbiology*, 146, 2097-2104.

Yilmaz, Y., & Toledo, R.T. (2005). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 41-48.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Yoshida, T., Hatano, T., Miyamoto, K., Okuda, T., Brouillard, R., & Jay, M. (1995). Antitumor and related activities of ellagitannin oligomers. Les colloques: Polyphenols 94. *Palma de Mallorca*, 69, 123-132.
- Yu, L., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., & Haley, S. (2003). Antioxidant properties of bran extracts from "Akron" wheat grown at different locations. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1566-1570.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., & Harris, M. (2004). Comparison of wheat flours grown at different locations for their antioxidant properties. *Food Chem.*, 86, 11-16.
- Yumrutas, O., & Saygideger, S.D. (2010). Determination of *in vitro* antioxidant activities of different extracts of *Marrubium parviflorum* Fish and Mey. and *Lamium amplexicaule* L. from South east of Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(20), 2164-2172.

## Z

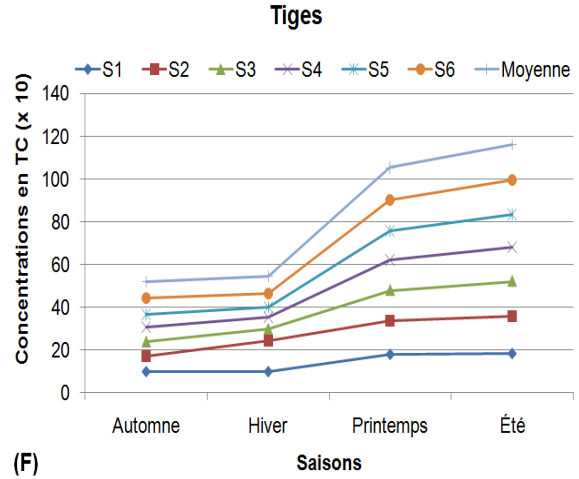
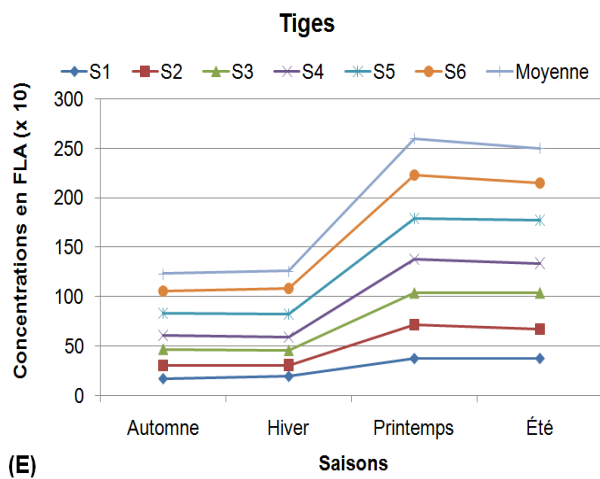
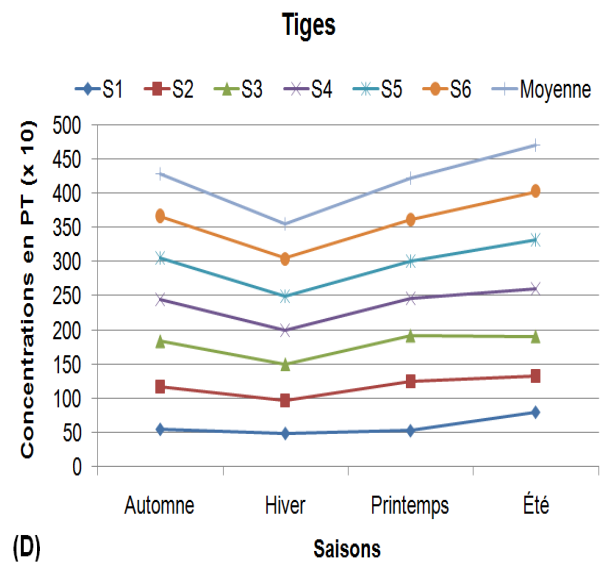
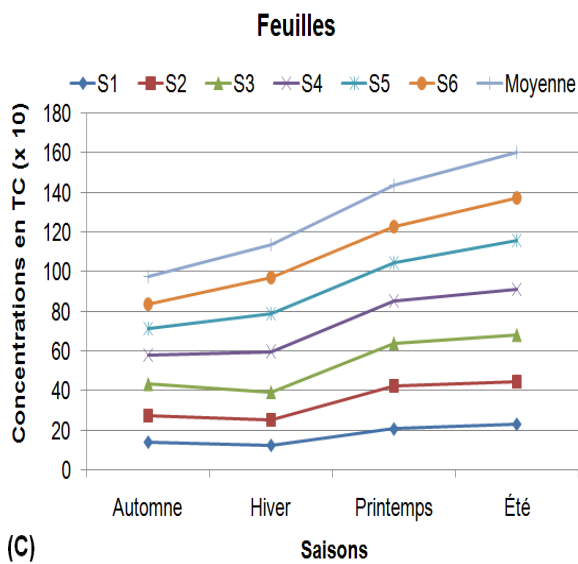
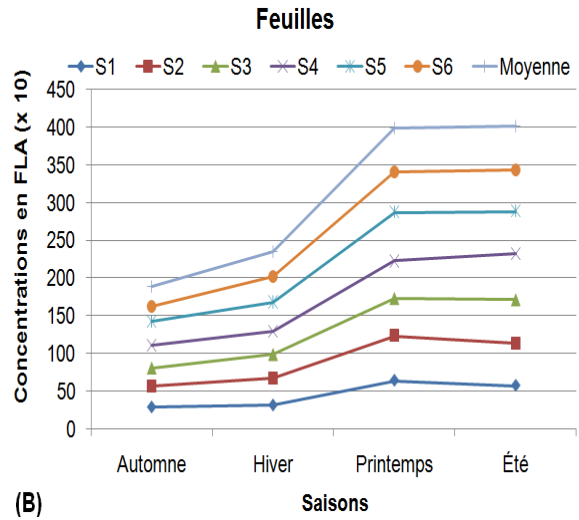
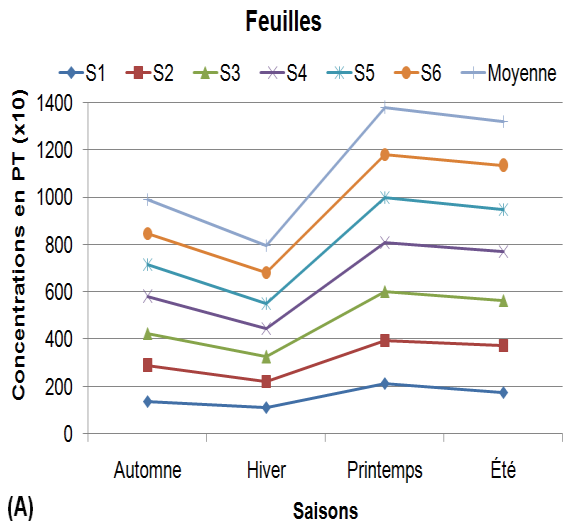
- Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J.M., Martinez-Cacha, A., Pardo, F., & Lopez Nicolas, J.M. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4694-4700.
- Zam, W., Bashour, G., Abdelwahed, W., & Khayata, W. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 675-682.
- Zarai, Z., Kadri, A., Ben Chobba, I., Ben Mansour, R., Bekir, A., Mejdoub, H., & Gharsallah, N. (2011). The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in Health and Disease*, 10, 161-168.
- Zawislak, G. (2012). The chemical composition of the essential oil of *Marrubium vulgare* L. From Poland. *Farmacía*, 60(2), 287-292.
- Zhang, L., Yongmei, W., Dongmei, W., Man, X., & Jiahong, C. (2011). Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from *Camellia oleifera* Fruit Hull. *Molecules*, 16, 4428-4437.
- Zhao, S., Liu, J.Y., Chen, S.Y., Shi, L.L., Liu, Y.J., & Ma, C. (2011). Antioxidant Potential of Polyphenols and Tannins from Burs of *Castanea mollissima* Blume. *Molecules*, 16, 8590-8600.
- Zhang, Q., Su, Y., & Zhang, J. (2013). Seasonal difference in antioxidant capacity and active compounds contents of *Eucommia ulmoides* oliver leaf. *Molecules*, 18, 1857-1868.
- Zhekova, G., & Pavlov, D. (2012). Influence of different factors on tannins and flavonoids extraction of some thyme varieties representatives of thymol, geraniol and citral chemotype. *Agricultural Science and Technology*, 4(2), 148-153.
- Zheng, W.F., Tan, R.X., Yang, L., Liu, Z.L. (1996). Two flavones from *Artemisiagiraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Med*, 62, 160-162.

---

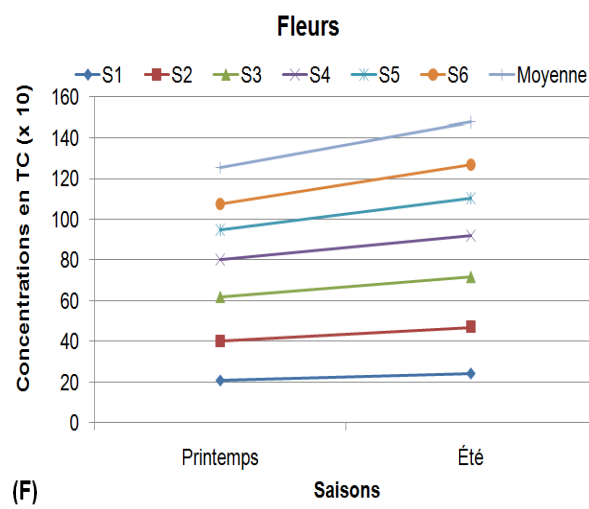
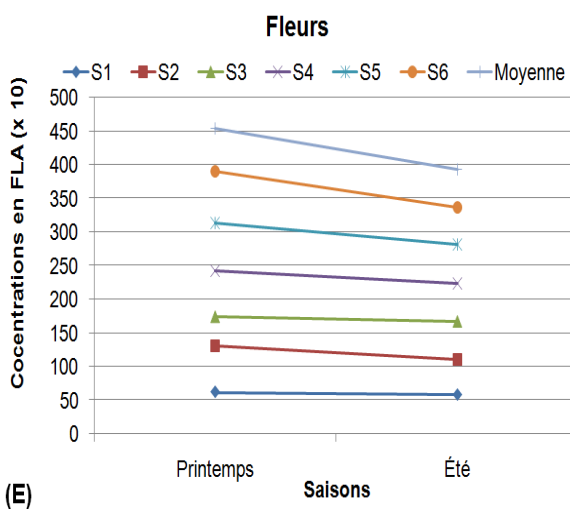
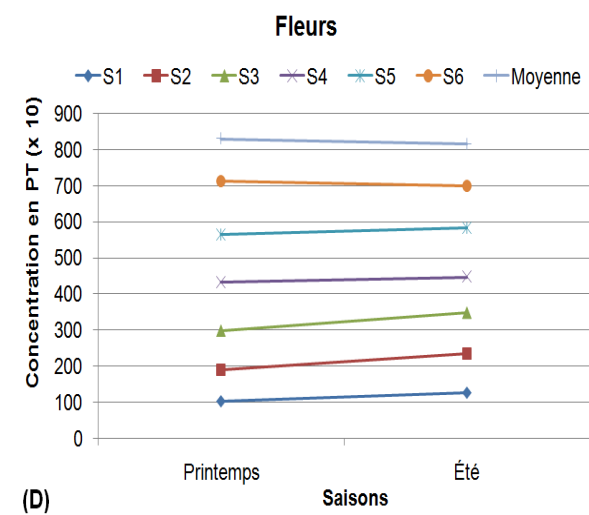
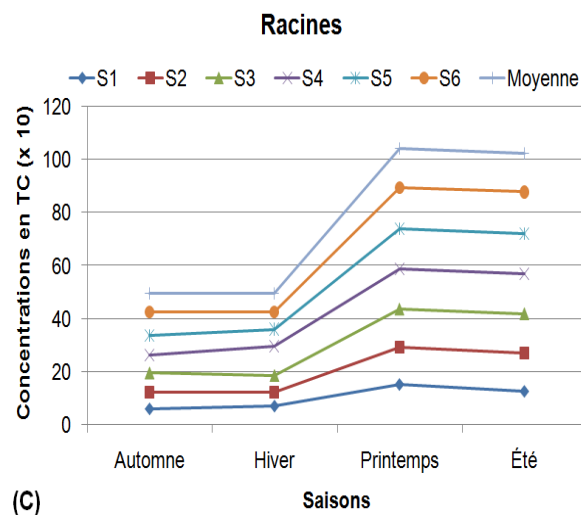
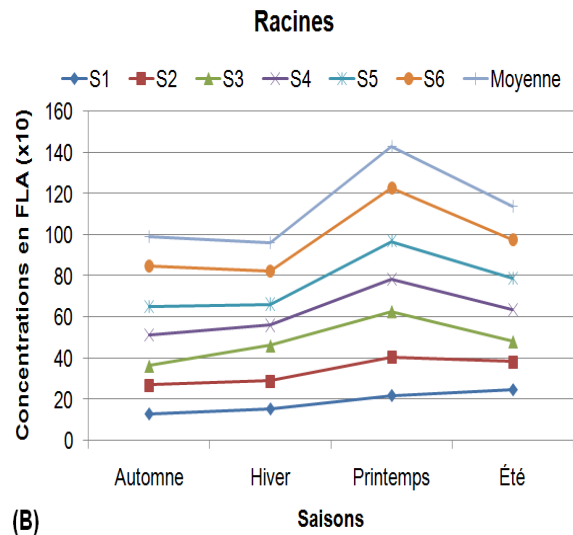
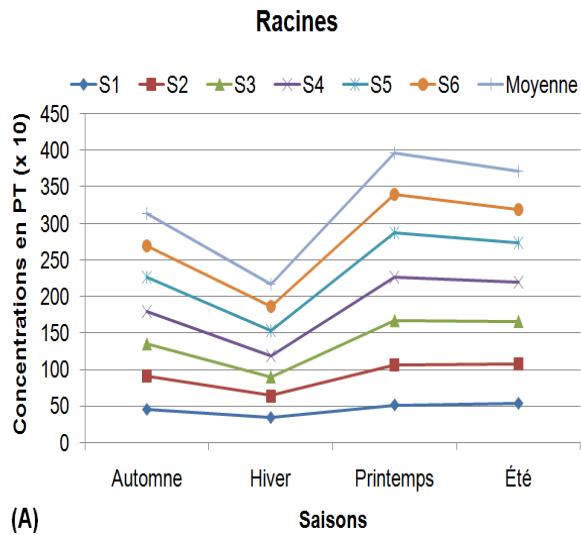
## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zheng, N., Wang, Z., Shi, Y., & Lin, J. (2012). Evaluation of the antifungal activity of total flavonoids extract from *Patrinia Villosa* Juss and optimization by response surface methodology. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 586-593.
- Zhou, K., Laux, J.J., & Yu, L. (2004). Comparison of Swiss red wheat grain, and fractions for their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1118-1123.
- Zobayed, S.M.A., Afreen, F., & Kozai, T. (2005). Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 977-984.
- Zornoza, P., & Esteban, R.M. (1984). Flavonoids content of tomato plants for the study of the nutritional status. *Plant and Soil*, 82(2), 269-271.
- Zubair, M., Anwar, F., & Shahid, S.A. (2012). Effect of extraction solvents on phenolics and antioxidant activity of selected varieties of Pakistani rice (*Oryza sativa*). *Int. J. Agric. Biol.*, 14(6), 935-940.

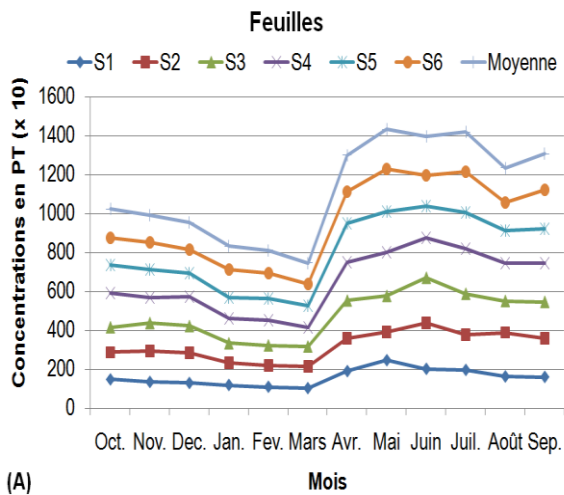
# **Annexes**



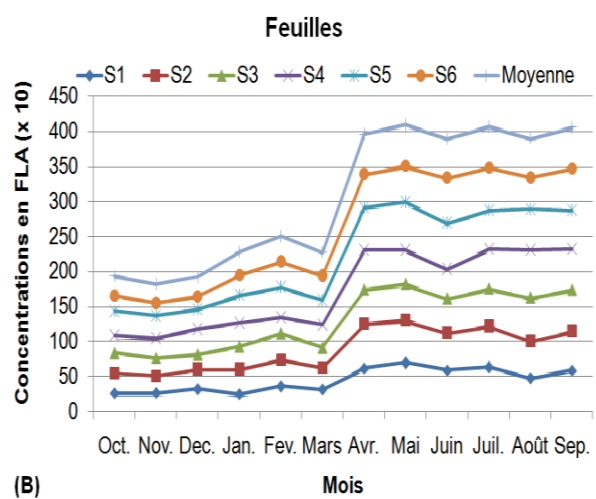
**Annexe 1** : Effet de la saison d'échantillonnage sur les concentrations saisonnières en composés phénoliques dosés dans les feuilles et les tiges.



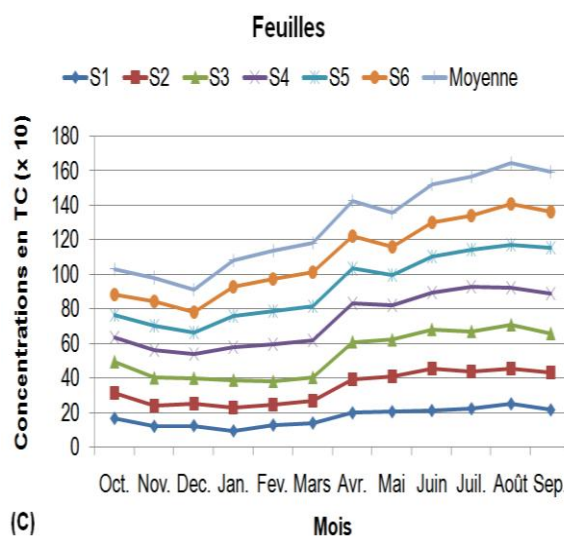
**Annexe 2** : Effet de la saison d'échantillonnage sur les concentrations saisonnières en composés phénoliques dosés chez les tiges et les racines.



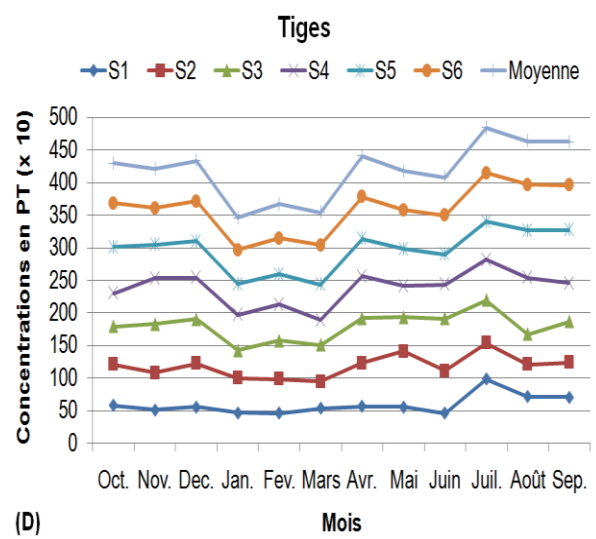
(A)



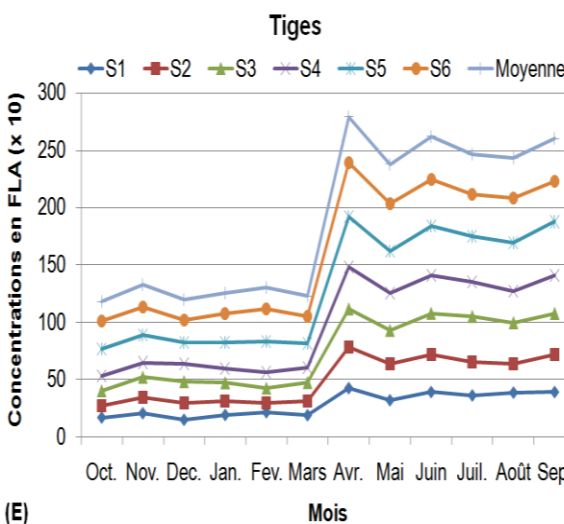
(B)



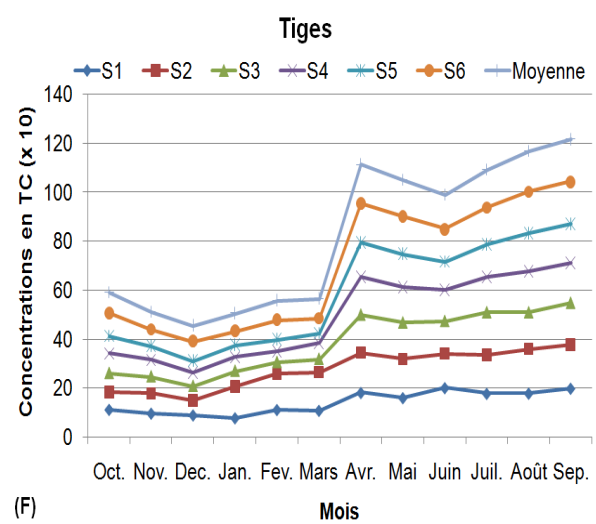
(C)



(D)

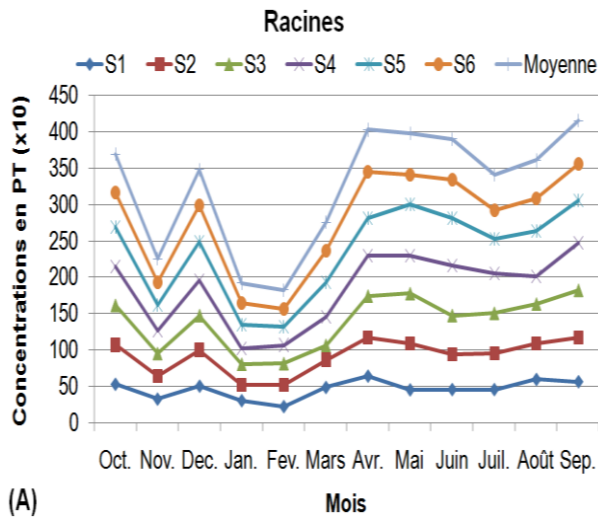


(E)

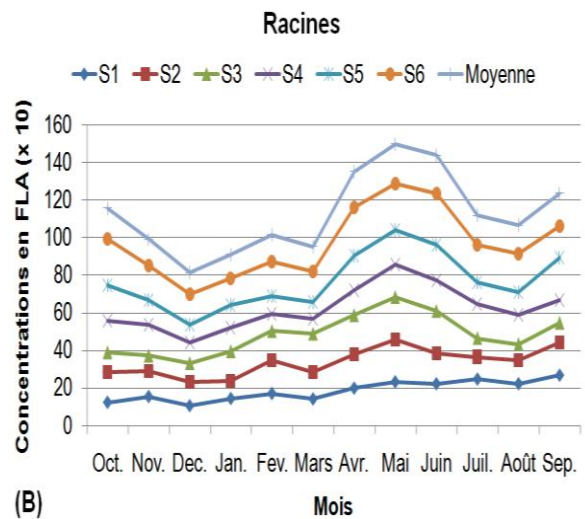


(F)

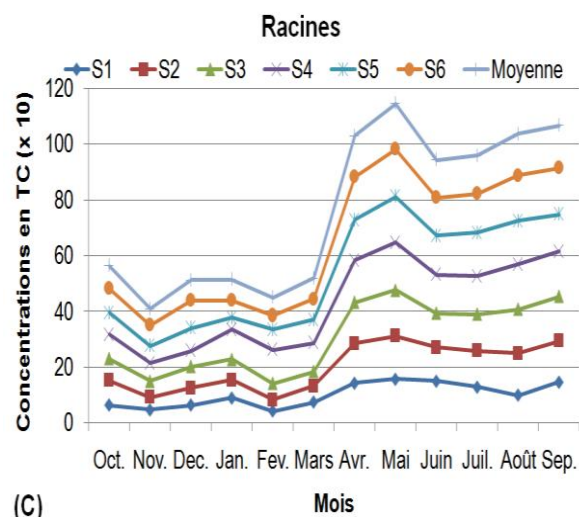
**Annexe 3** : Effet du mois de prélèvement sur les concentrations mensuelles en composés phénoliques dosés chez les feuilles et les tiges.



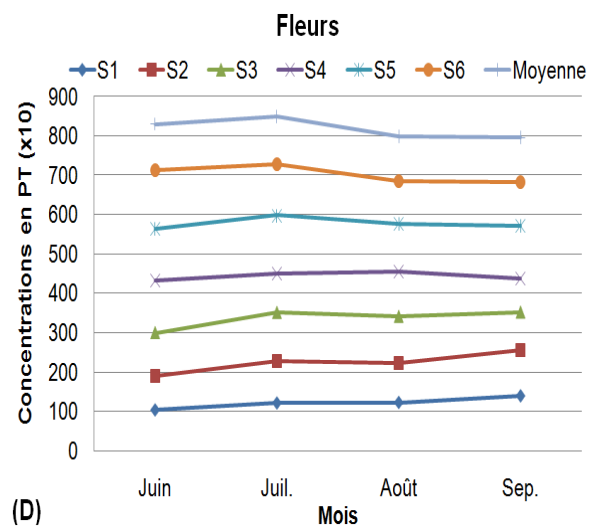
(A)



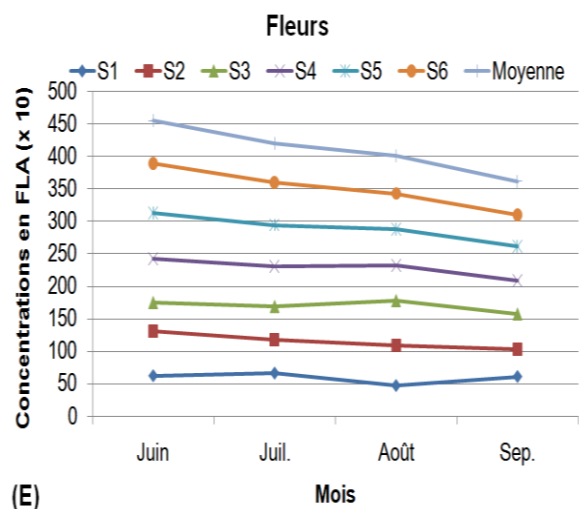
(B)



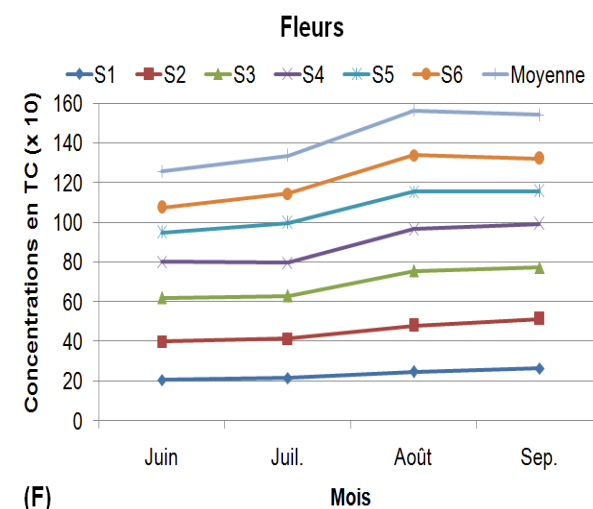
(C)



(D)

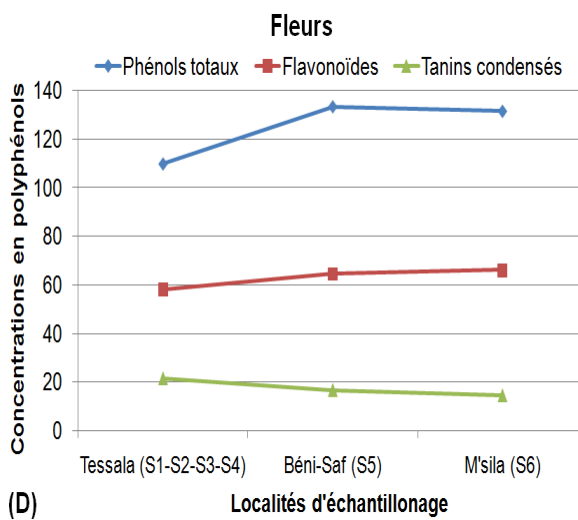
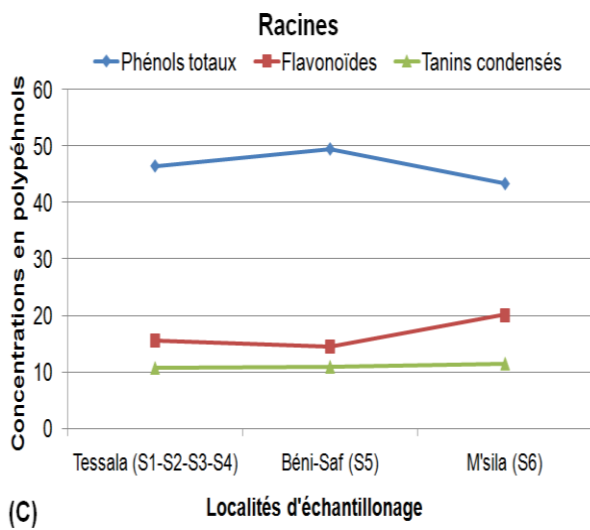
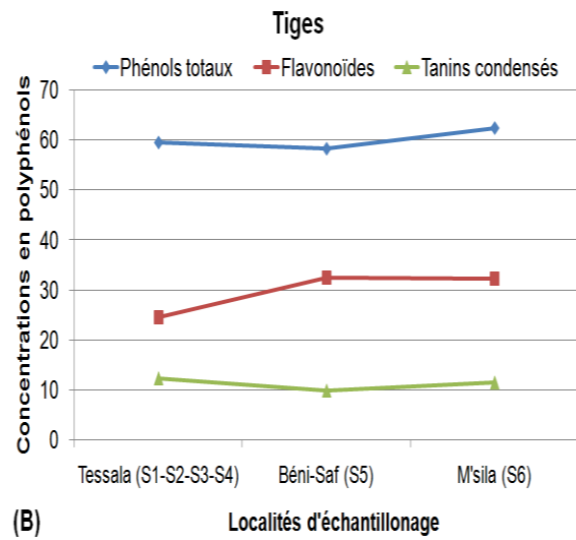
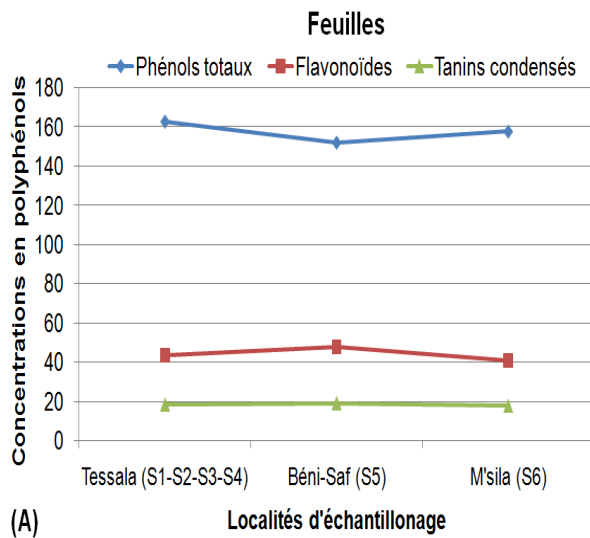


(E)

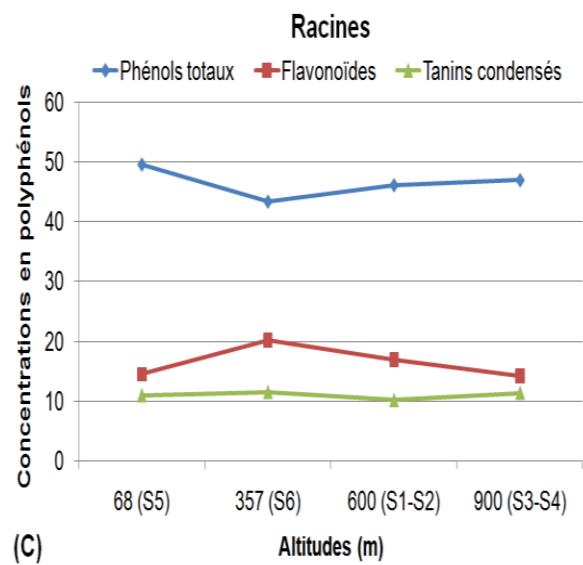
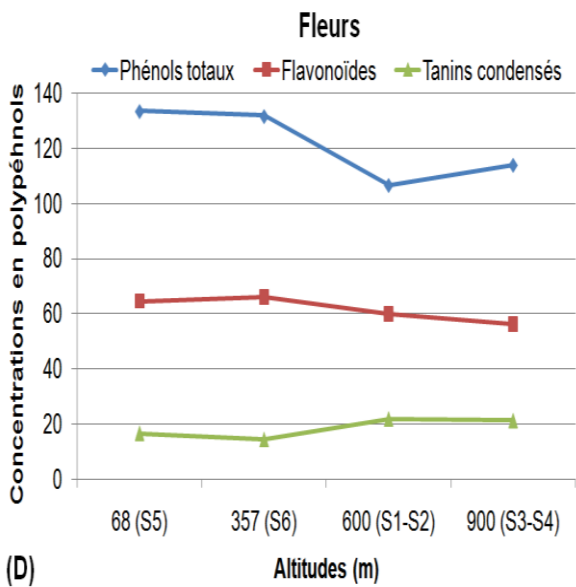
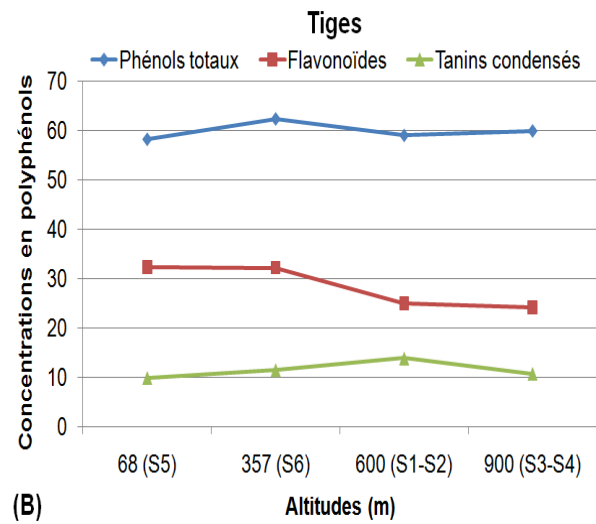
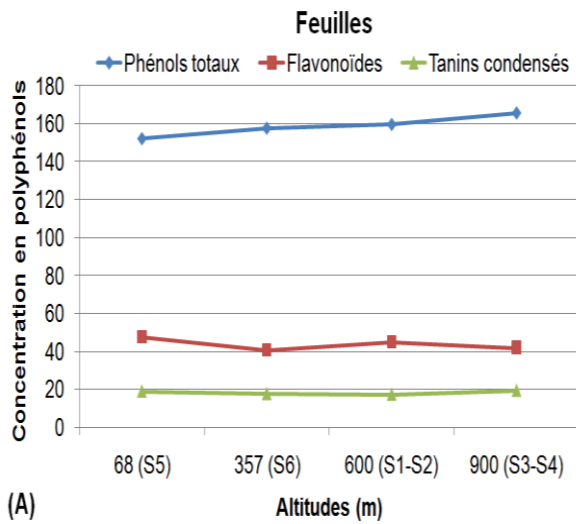


(F)

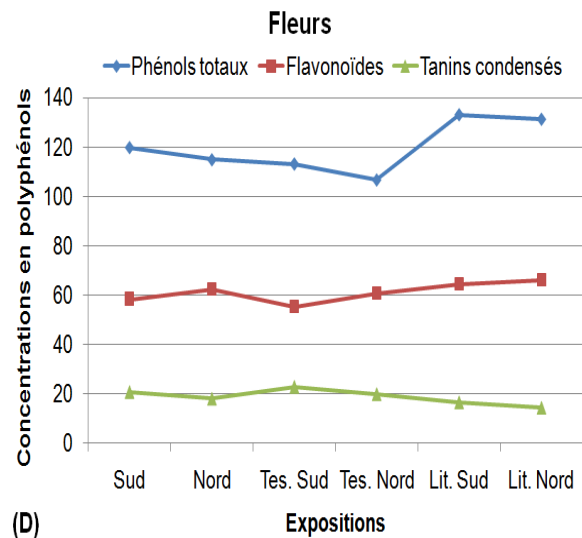
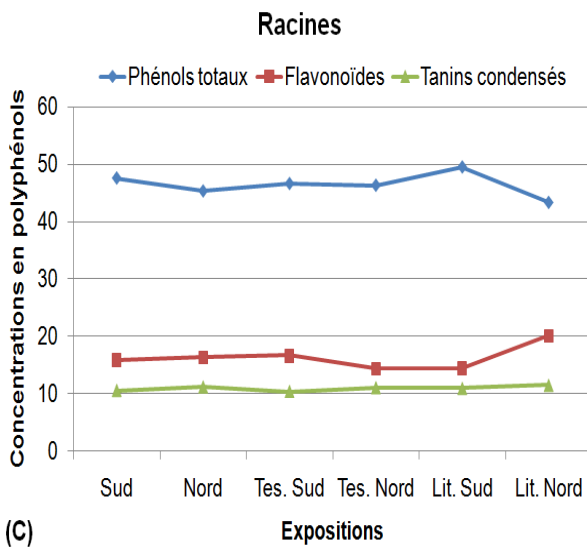
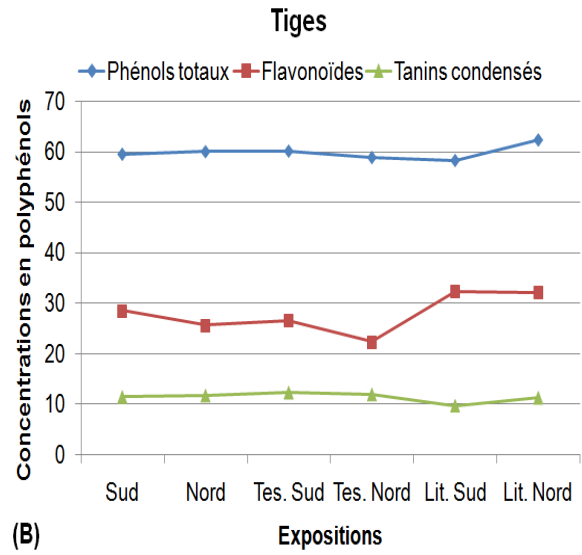
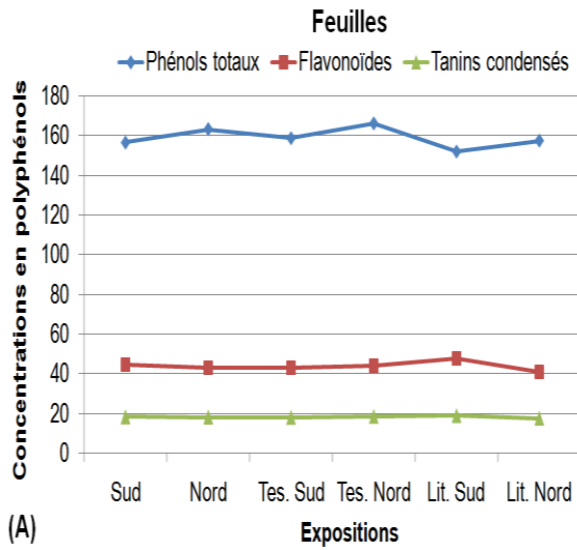
**Annexe 4** : Effet du mois de prélèvement sur les concentrations mensuelles en composés phénoliques dosés chez les racines et les fleurs.



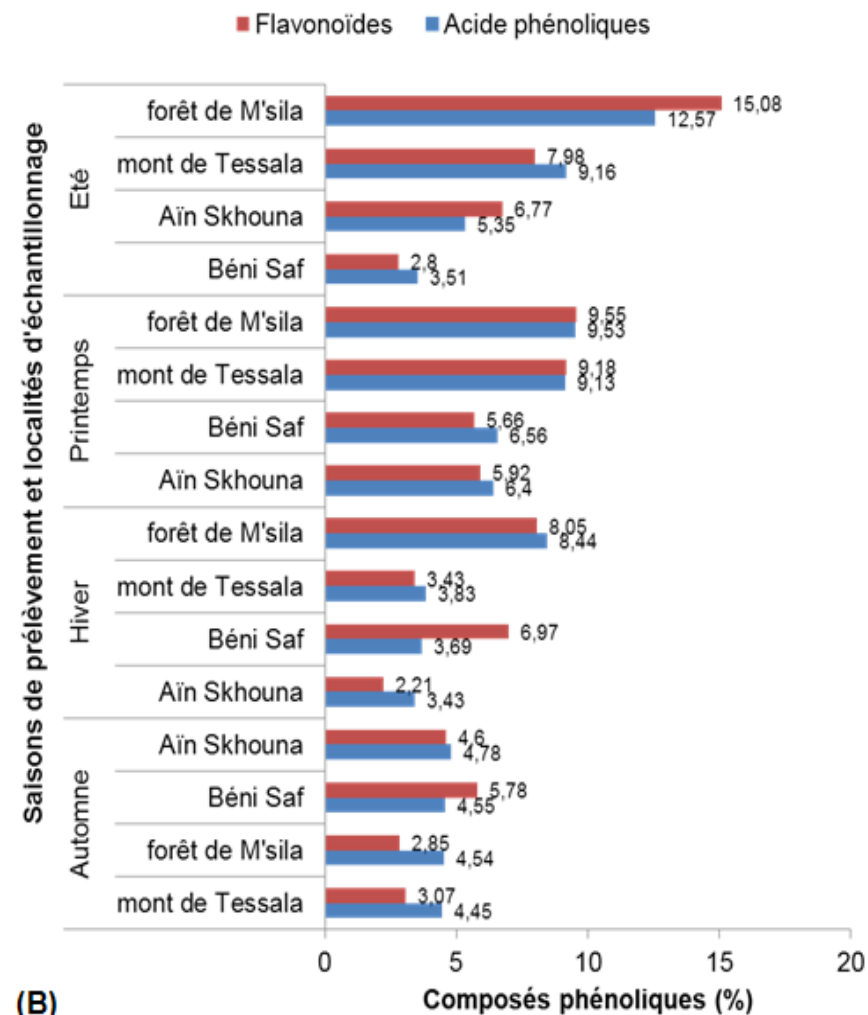
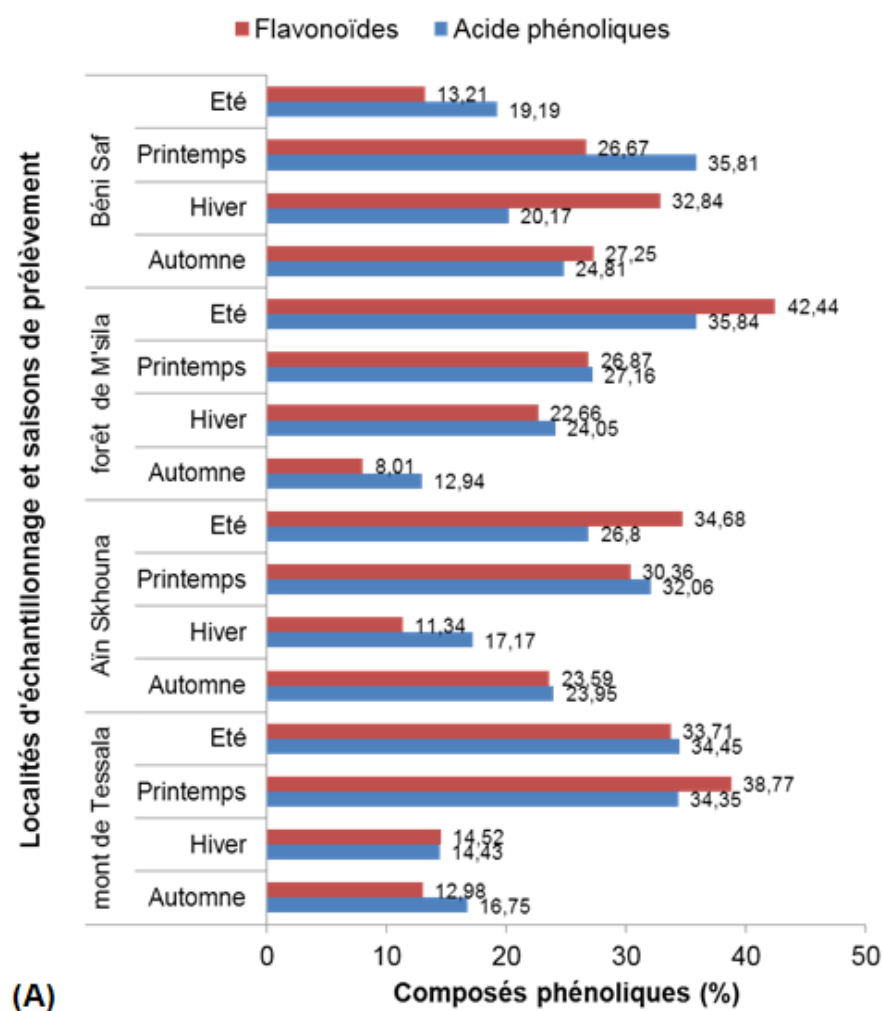
**Annexe 5** : Effet de la nature la localité d'échantillonnage sur les concentrations saisonnières en composés phénoliques dosés chez différents organes.



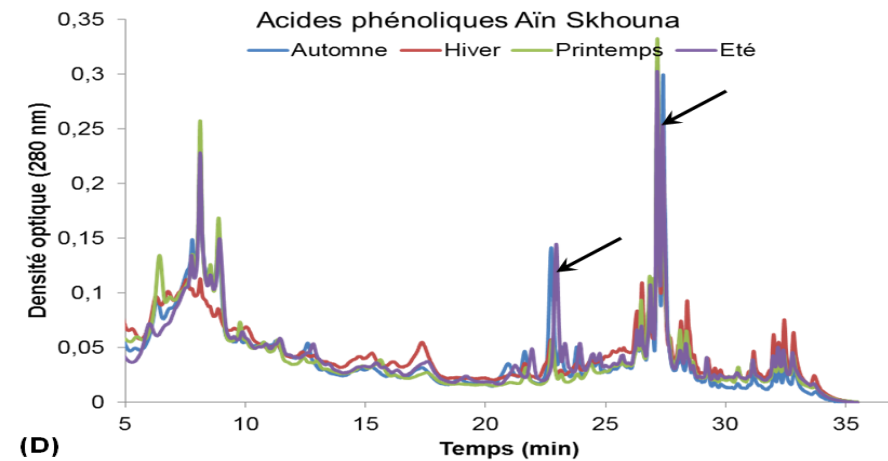
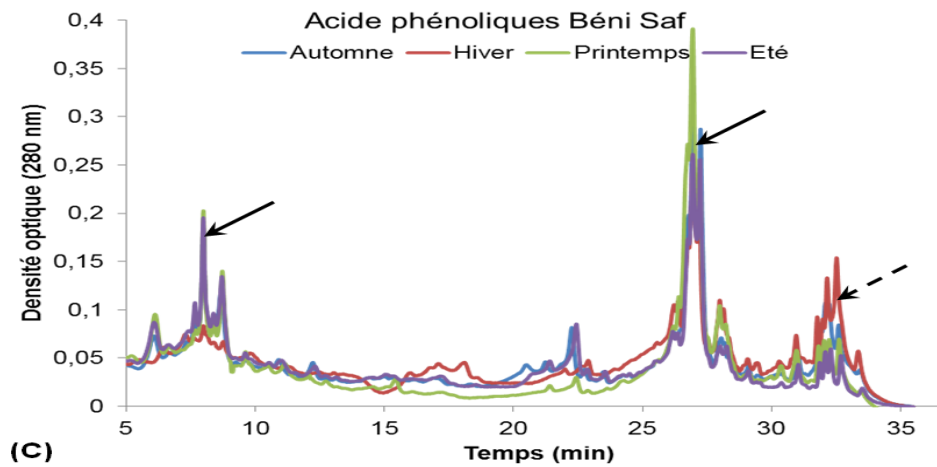
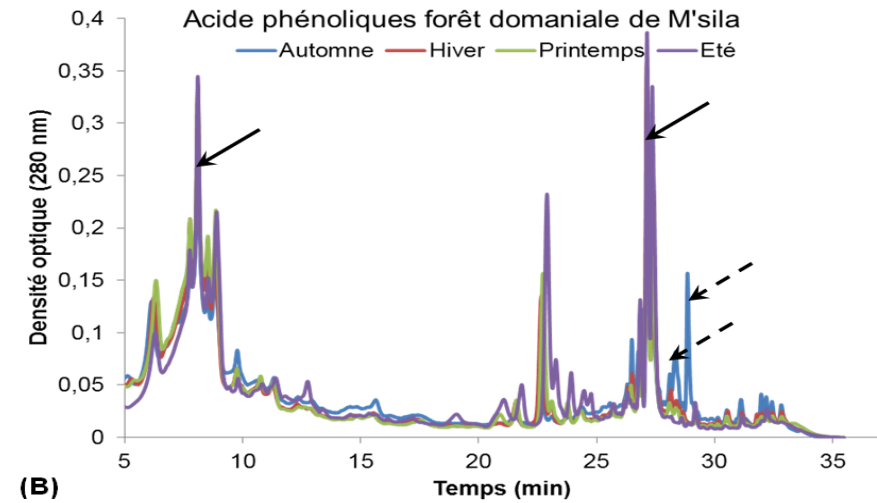
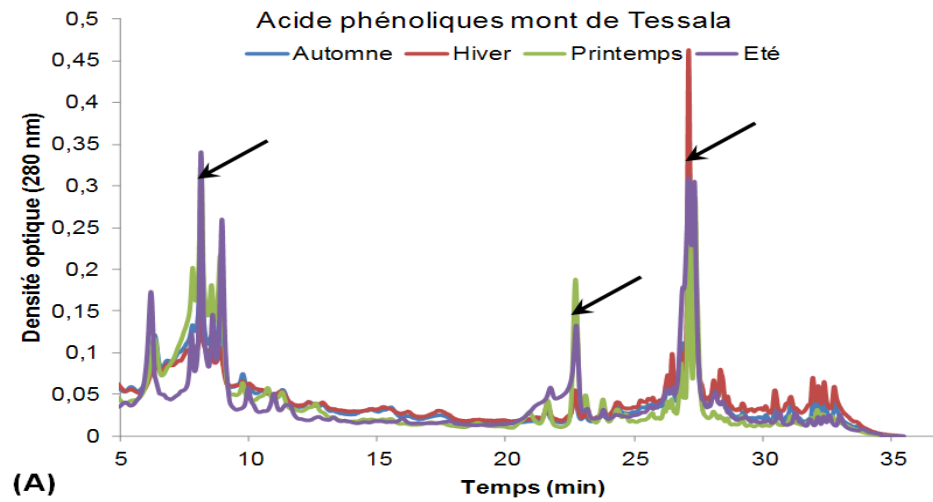
**Annexe 6** : Effet de l'altitude de la localité d'échantillonnage sur les concentrations saisonnières en composés phénoliques dosés chez différents organes.



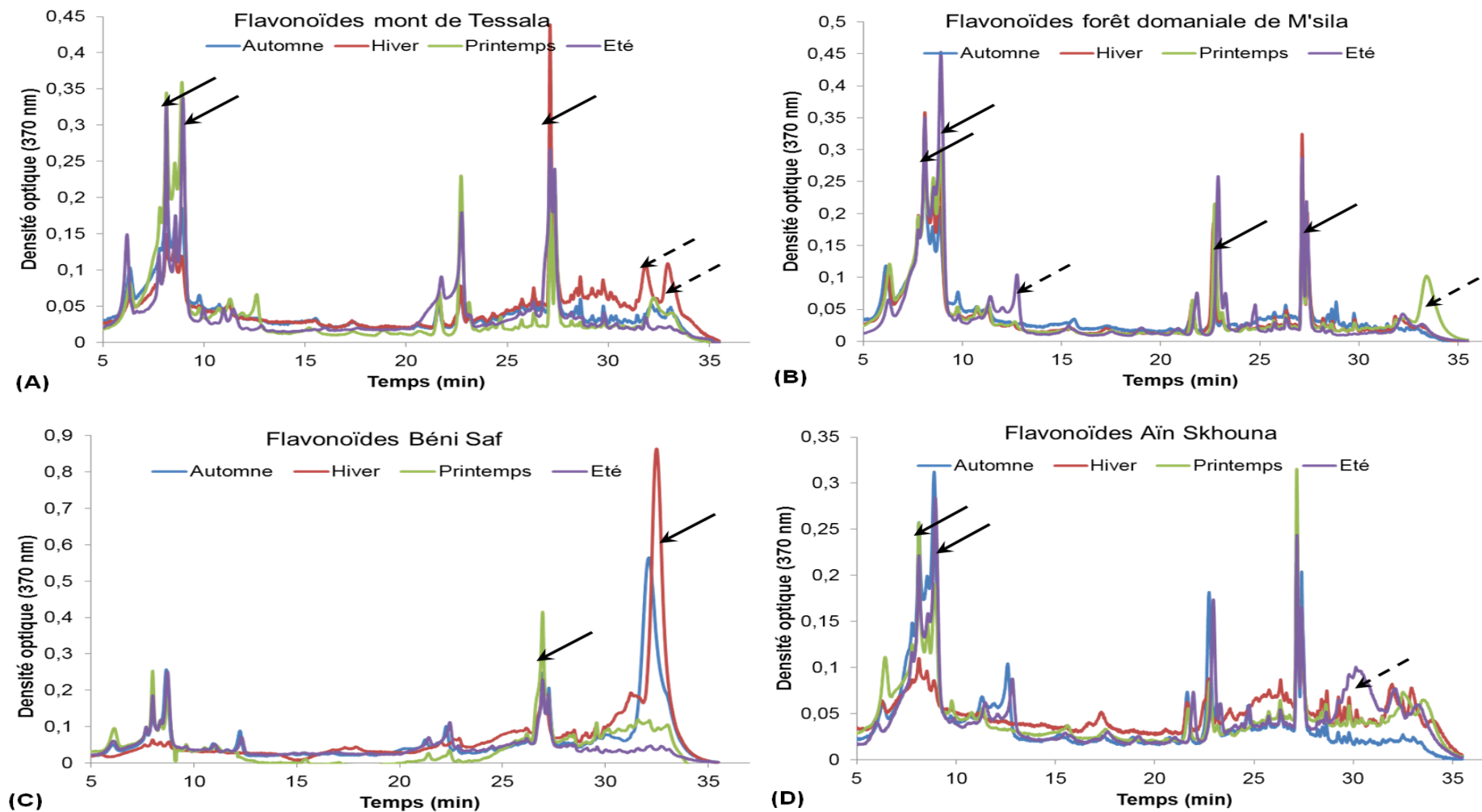
**Annexe 7** : Effet de l'exposition de la localité d'échantillonnage sur le concentrations saisonnières en composés phénoliques dosés chez différents organes.



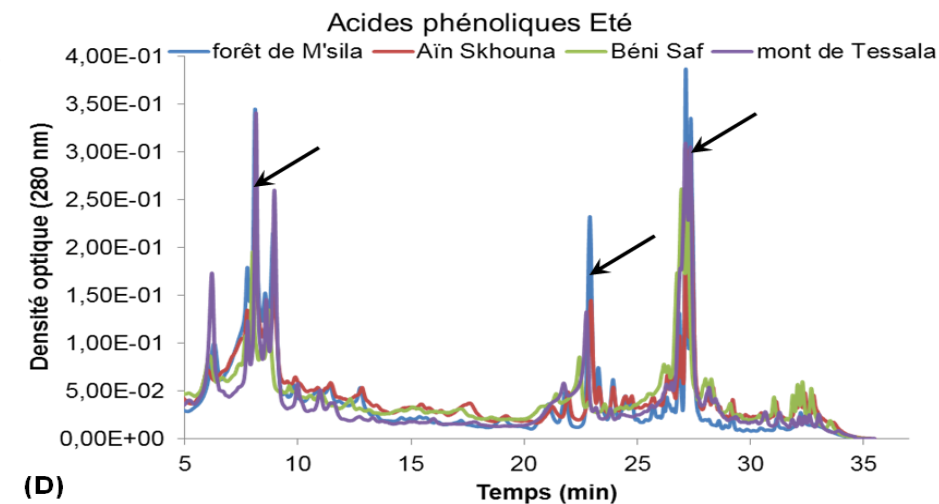
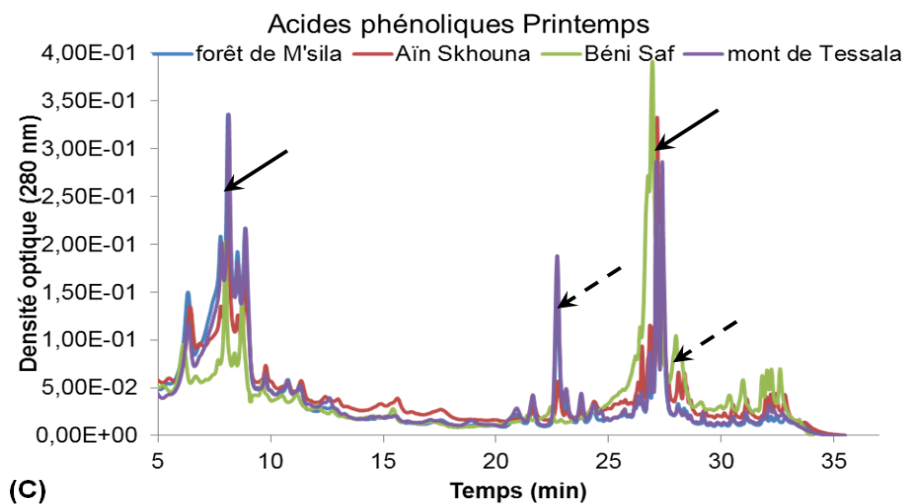
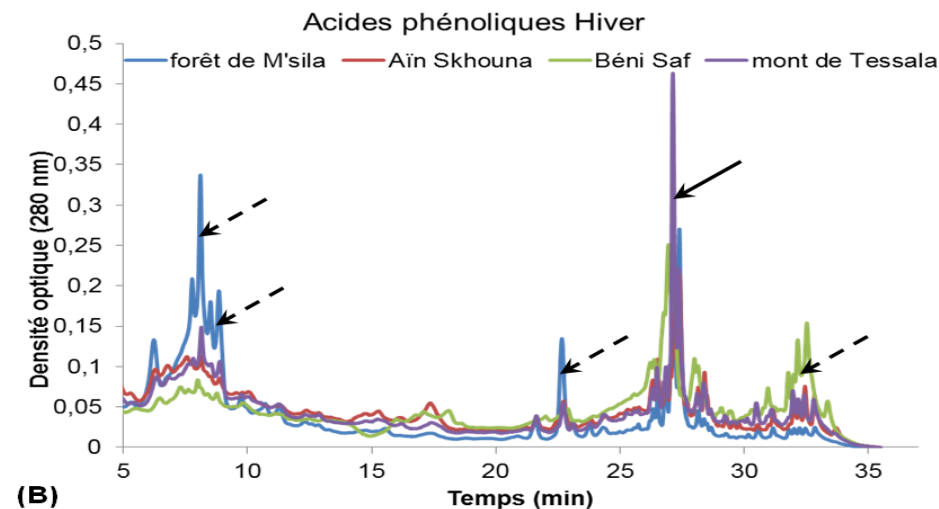
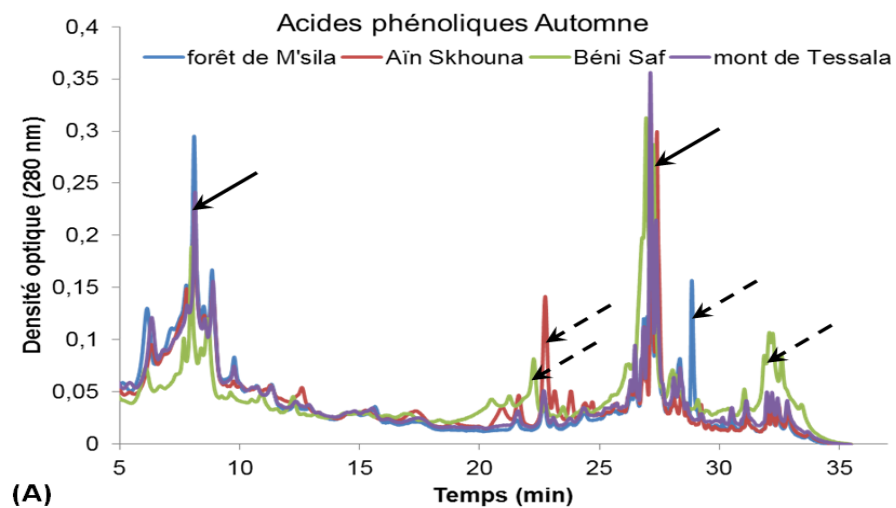
**Annexe 8 :** Taux saisonniers (en %) en acides phénoliques et en flavonoïdes des extraits phénoliques des différentes localités d'échantillonnage.



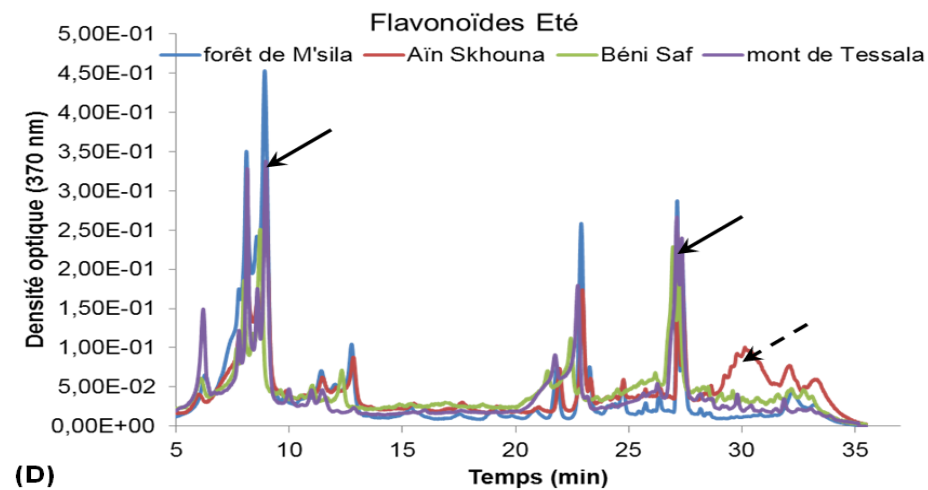
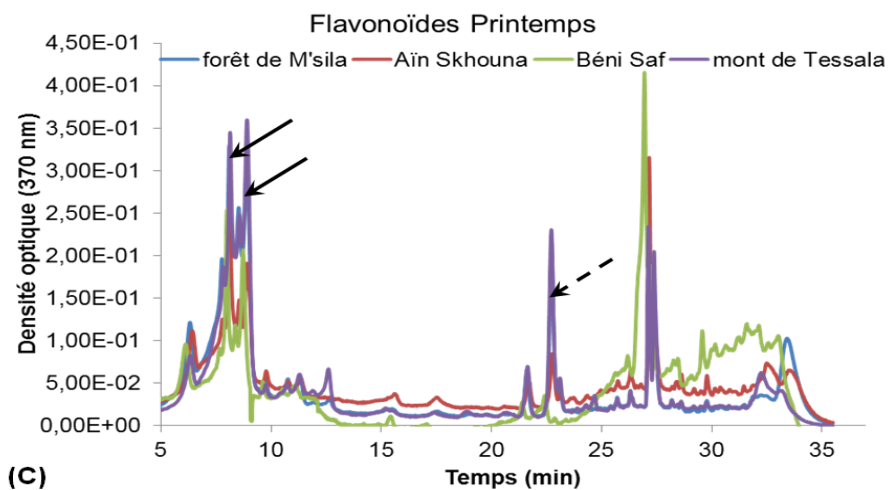
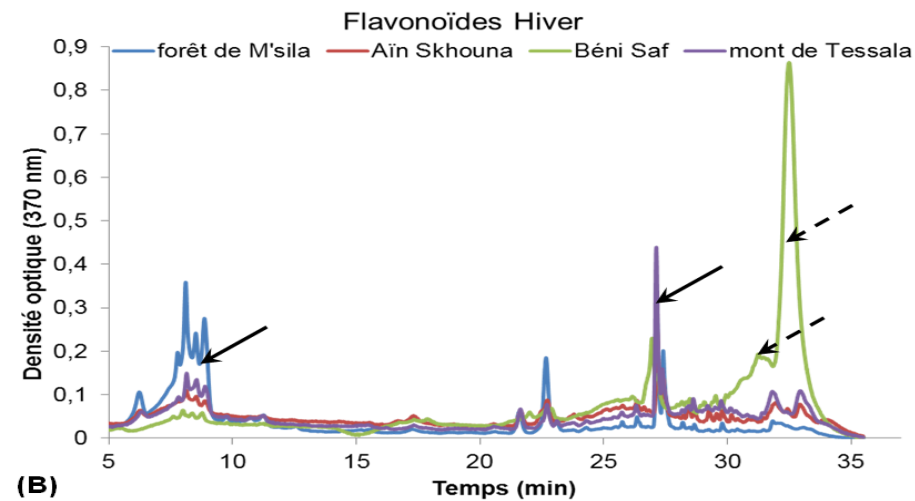
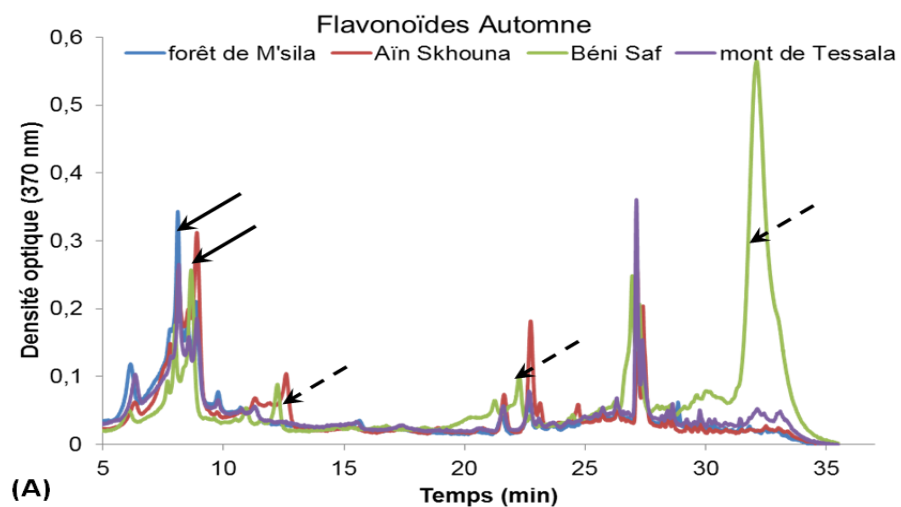
**Annexe 9** : Superposition des profils chromatographiques CLHP des acides phénoliques (effet de la saison de prélèvement à l'intérieur de la même localité d'échantillonnage). Ressemblances :  $\leftarrow$  ; Différences :  $\leftarrow -$ .



**Annexe 10** : Superposition des profils chromatographiques CLHP des flavonoïdes (effet de la saison de prélèvement à l'intérieur de la même localité d'échantillonnage. Ressemblances :  $\leftarrow$  ; Différences :  $\leftarrow -$ ).



**Annexe 11** : Superposition des profils chromatographiques CLHP des acides phénoliques (effet de la localité d'échantillonnage à l'intérieur de la même saison de prélèvement).



**Annexe 12 :** Superposition des profils chromatographiques CLHP des flavonoïdes (effet de la localité d'échantillonnage à l'intérieur de la même saison de prélèvement).

# **Publications internationales**

## Publication N° 1

**Karim BOUTERFAS**, Zoheir MEHDADI, Ali LATRECHE et Kouider CHERIFI. Autoécologie du Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) et caractérisation de la biodiversité végétale dans le Djebel de Tessala (Algérie nord occidentale). ***International Journal of Mediterranean Ecology***, 2013, Vol. 39, N°2: 39-57. ISSN: 1775-4100.

Site: [http://ecologia-mediterranea.univ-avignon.fr/uploads/media/ecologia-mediterranea\\_2013-39-2.pdf](http://ecologia-mediterranea.univ-avignon.fr/uploads/media/ecologia-mediterranea_2013-39-2.pdf).

# Autoécologie du Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) et caractérisation de la biodiversité végétale dans le Djebel de Tessala (Algérie nord-occidentale)

*Autecology of white Horehound (Marrubium vulgare L.)  
and characterization of plant biodiversity in Jebel Tessala  
(north-western Algeria)*

Karim BOUTERFAS\*,<sup>1</sup>, Zoheir MEHDADI<sup>1</sup>, Ali LATRECHE<sup>1</sup>, Kouider CHERIFI<sup>1</sup>

1. Laboratoire de biodiversité végétale : conservation et valorisation,  
Faculté des sciences de la nature et de la vie,  
Université Djillali Liabès, 22000 Sidi Bel-Abbès, Algérie

\* Auteur correspondant : [bouterfas\\_karim@yahoo.fr](mailto:bouterfas_karim@yahoo.fr)

## Résumé

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'autoécologie du *Marrubium vulgare* L. dans le Djebel de Tessala en Algérie. Nous avons choisi douze stations réparties sur les deux versants nord et sud, sur lesquels des échantillons de sol ont été prélevés et des relevés floristiques ont été effectués. Les résultats édaphiques montrent que cette espèce se développe sur des sols légers, légèrement alcalins, fortement calcaires et avec des teneurs moyennes à fortes en matière organique. Les traitements statistiques grâce à une analyse factorielle des correspondances (AFC), une classification ascendante hiérarchique (CAH) et une analyse en composantes principales (ACP) montrent que le *Marrubium vulgare* est caractéristique des matorrals. Il se développe surtout dans des stations ensoleillées, à basses altitudes, sur des terrains faiblement pentus. Nous avons pu comptabiliser sur l'ensemble des stations prospectées 72 espèces appartenant à 35 familles botaniques, participant au potentiel phytoécologique remarquable de notre site d'étude.

## Abstract

In this work, we were interested in the study of *Marrubium vulgare* L. in Tessala Mountains in Algeria. Twelve stations were chosen because they

were distributed on slopes north and south. Soil samples were taken and floristic inventories were realised. Soil analyses showed that this species were presents on light soils, slightly alkaline, highly calcareous and with middle to highly organic matter contents. The Correspondence analysis, the hierarchical cluster analysis and the principal component analysis showed that *Marrubium vulgare* was characteristic of Mediterranean schrubland "Matorral", developing especially in sunny stations at low altitudes, on slightly sloping soils. We have found for the whole prospected stations, 72 species belonging to 35 botanical families, they are included in the remarkable phytoecological potential of our study site.

## Introduction

La région méditerranéenne abrite une diversité biologique de première importance. Ainsi en Afrique du Nord, les espèces de la flore spontanée constituent une part non négligeable des ressources génétiques locales à valeur pastorale, fourragère, alimentaire, aromatique et/ou médicinale (Abdelguerfi & Laouar 1999 ; Ohba & Amirouche 2003).

**Mots clés :** *Marrubium vulgare*, Djebel de Tessala, autoécologie, analyses statistiques.

**Keywords:** *Marrubium vulgare*, Jebel of Tessala, autoecology, statisticals analysis.

Divers travaux ont attiré l'attention des biologistes et des généticiens sur l'intérêt que présentent les forêts méditerranéennes, du point de vue de leur richesse spécifique végétale, autant au niveau des essences forestières qui les constituent que des espèces herbacées qui participent au cortège des habitats qu'elles individualisent (Gomez-Campo 1985). Sur le plan écologique et phytosociologique, de nombreuses publications y ont ainsi été consacrées par Braun-Blanquet (1949); Quézel (1956); Gounot (1969); Barbero & Quézel (1976); Guinochet (1973); Abi-Salah (1978); Rivas-Martinez (1982); Enriquez-Barroso & Gomez-Campo (1991).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante caractéristique de notre région : *Marrubium vulgare* L. Ce taxon a été étudié dans tous ses aspects tant biochimiques que pharmacologiques ; mais son écologie stationnelle reste encore peu connue en Algérie. Cette étude présente donc une certaine originalité à caractère surtout phytoécologique qui fait appel notamment à des variantes écologiques majeures : le bioclimat, l'altitude, le sol et la végétation. Par ailleurs, et en raison de sa distribution importante et son statut d'espèce assez commune du Nord algérien, cette plante a été négligée par rapport aux autres espèces beaucoup moins fréquentes appartenant à la famille des Lamiaceae comme le thym et la sauge par exemple. De ce fait, et pour mieux comprendre la distribution du marrube blanc par rapport aux conditions du milieu du Djebel de Tessala, nous avons jugé nécessaire de réaliser une étude sur cette espèce.

*Marrubium vulgare* est une plante cosmopolite qui pousse presque dans toute l'Europe surtout dans ses régions méditerranéennes ainsi que dans l'Europe méridionale et médiane. C'est une plante herbacée vivace de 30 à 80 cm de hauteur, d'aspect blanchâtre, ressemblant légèrement à la menthe, à odeur forte pénétrante légèrement musquée et qui possède une saveur à la fois chaude et amère (Quézel & Santa 1963). Cette plante est également traditionnellement utilisée pour le traitement de divers maux : sifflements respiratoires, maladies urinaires, otites et ophtalmies.

Pour mieux caractériser l'habitat de *Marrubium vulgare*, nous avons adopté une méthodologie qui consiste à diviser le travail en deux étapes : la première est édaphique, son objectif est de connaître les propriétés physico-chimiques du sol sur lequel se développe

l'espèce ici étudiée ; la seconde étape est floristique, elle a été réalisée par la méthode phytosociologique sigmatiste, basée sur la caractérisation du cortège floristique auquel appartient le marrube. Finalement, des analyses statistiques ont été effectuées (analyse factorielle des correspondances, classification ascendante hiérarchique et analyse en composantes principales) ayant pour but, d'une part, de caractériser la relation entre l'espèce étudiée et ses affinités écologiques (sol et paramètres de la station) et, d'autre part, d'évaluer d'une façon globale la biodiversité végétale qu'abrite notre site d'étude.

## Matériel et méthodes

### Zone d'étude et choix des stations

Localisé à 15 km au nord-ouest de la ville de Sidi Bel Abbés (Algérie occidentale), le Djebel de Tessala, zone de notre étude, présente un secteur de grande diversité biologique. Il est limité au nord par la plaine de la Mleta et la Sebkhia d'Oran, à l'est par les monts de Beni Chougrane, à l'ouest par les monts de Sebaa Chioukh et au sud par la plaine de Sidi Bel Abbés. Le Djebel de Tessala fait partie de l'Atlas tellien, son point culminant se trouve à 1 061 m (Kiekken 1962).

Le climat est de type méditerranéen à hiver frais, avec des pluviométries annuelles moyennes de 290 mm à 420 mm. Les températures mensuelles moyennes sont comprises entre 9,4 °C et 26,6 °C, les températures moyennes minimales du mois le plus froid oscillent entre 2,5 °C et 3,3 °C et les moyennes des maxima du mois le plus chaud excèdent rarement les 30 °C (ONM 2010).

Plusieurs prospections préliminaires sur le terrain nous ont permis une bonne connaissance préalable du Djebel de Tessala. Nous avons ensuite choisi douze stations (figures 1 et 2) réparties sur les deux versants nord et sud. Le choix de ces stations est orienté par la présence de l'espèce *Marrubium vulgare* qui a fait l'objet de notre étude.

### Analyse pédologique et floristique

Sur le terrain, une fosse pédologique a été creusée en avril 2010 pour chaque station étudiée. Trois échantillons de sol sont prélevés pour chaque station de l'horizon superficiel à

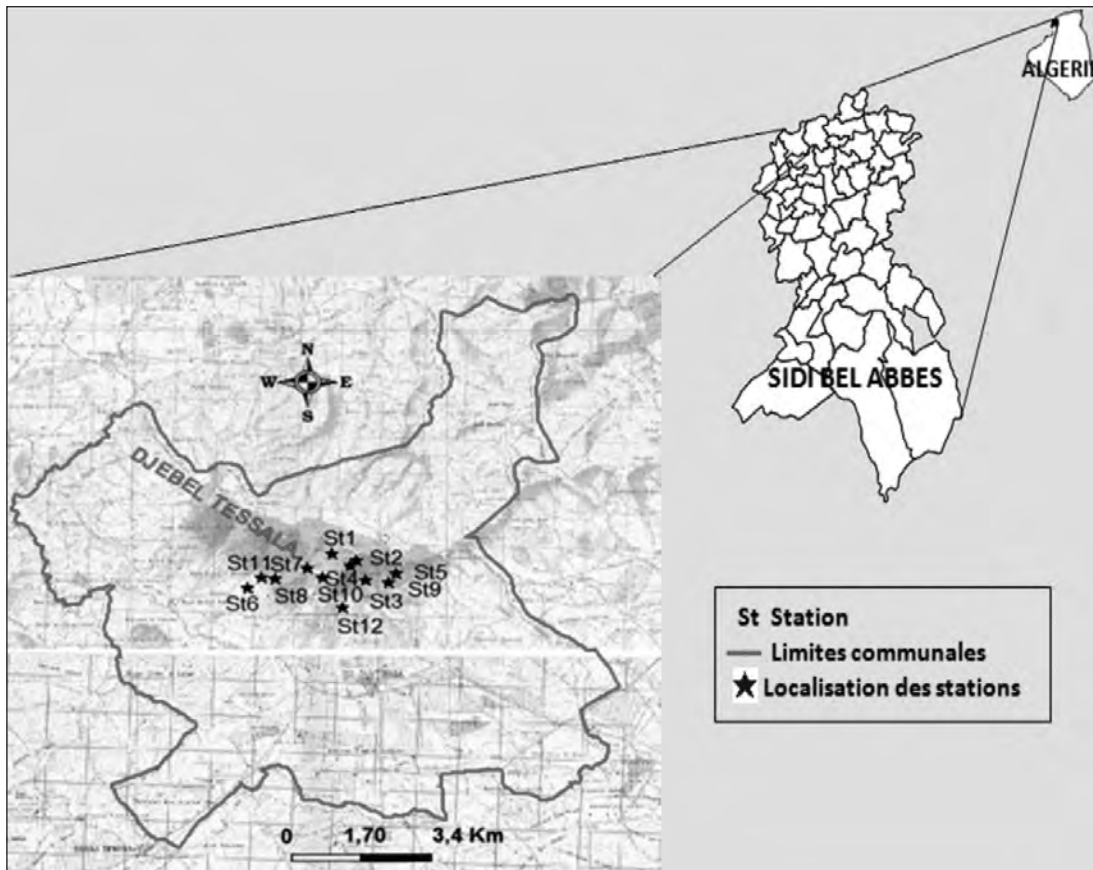


Figure 1 – Situation géographique du Djebel de Tessala en Algérie et localisation des stations échantillonnées.



Figure 2 – Deux stations échantillonnées (stations 3 et 8).

une profondeur de 10 à 20 cm. Quelques caractéristiques sont notées à partir d'observations sur le terrain : structure, couleur et limite des différents horizons.

Les échantillons de sol sont ensuite mis à sécher à l'air libre pendant 15 jours. Une fois séchés, nous avons procédé à l'analyse granulométrique pour classer les différents éléments physiques constitutifs (fractions gros-

sière et fine après tamisage à 2 mm : sables, limons, argiles) selon leur taille et leur pourcentage respectif dans l'échantillon. La texture est définie après projection des résultats de l'analyse granulométrique fine sur le triangle de Jamagne (1967).

Les analyses physico-chimiques du sol consistent à évaluer l'humidité (H), le potentiel hydrogène (pH), la conductivité électrique

(CE), le calcaire total (CT), le calcaire actif (CA) et la matière organique (MO) (Aubert 1978).

Pour l'inventaire floristique, nous avons utilisé la méthode des relevés phytosociologiques recommandée par Braun-Blanquet (1952) dite aussi méthode sigmatiste. Cette démarche, couramment utilisée en écologie végétale pour diagnostiquer les différentes communautés végétales, nous a permis l'élaboration du tableau floristique. Elle consiste à choisir des emplacements typiques pour les inventaires floristiques, noter les conditions des paramètres des différentes stations relatifs à l'emplacement des relevés (date, pente, altitude, coordonnées géographiques, recouvrement), dresser une liste complète des espèces présentes par strate et, finalement, accorder pour chaque espèce un coefficient d'abondance-dominance, de sociabilité ainsi que sa fréquence d'apparition dans chaque relevé.

Dans notre étude, l'aire minimale est fixée à 100 m<sup>2</sup>. Cette aire a été adoptée à l'ensemble des stations échantillonnées en se référant à certains travaux phytoécologiques entrepris sur la végétation de notre zone d'étude (Ferka-Zazou 2006 ; Cherifi *et al.* 2011). C'est une surface où les conditions écologiques sont homogènes et où la végétation est uniforme. En effet, selon Guinochet (1973), pour des végétations herbacées, l'aire minimale est une surface contenant la quasi-totalité des espèces présentes et qui n'offre pas d'écart de composition floristique appréciable entre ses différentes parties.

Quatre strates ont été retenues permettant l'identification des formations végétales : arborescente, arbustive, buissonnante et herbacée. L'identification de ces strates se fait suivant l'échelle avancée par Benabdelli (1996) pour la végétation ligneuse de l'Oranie : la strate arborescente (hauteur de 4 m et plus), la strate arbustive (hauteur entre 1,50 m et 4 m), la strate buissonnante (hauteur entre 0,50 m et 1,50 m) et la strate herbacée (hauteur à moins de 0,50 m).

Sur chacune des stations choisies, un inventaire exhaustif des espèces présentes est effectué durant la période de végétation optimale s'étalant d'avril à mai 2010. Les espèces sont identifiées en se référant à la flore de Quézel & Santa (1962, 1963) et celle de Careme (1990), séchées puis mises en herbier et archivées.

La richesse spécifique de chaque station est calculée pour une surface de 100 m<sup>2</sup>. En plus, les espèces inventoriées sont réparties selon leurs fréquences d'apparition (F), familles correspondantes (Quézel & Santa 1962), types biologiques (Raunkiaer 1934 ; Ellenberg & Mueller 1968), types morphologiques et types phytogéographiques (Quézel & Santa 1962 ; Ozenda 1985 ; Bonnier 1990).

Les espèces inventoriées sont réparties en cinq classes par rapport à leur fréquence d'apparition (F) dans les relevés floristiques effectués :

- classe I (espèces très rares :  $0 < F < 20 \%$ ) ;
- classe II (espèces rares :  $20 < F < 40 \%$ ) ;
- classe III (espèces fréquentes :  $40 < F < 60 \%$ ) ;
- classe IV (espèces abondantes :  $60 < F < 80 \%$ ) ;
- classe V (espèces constantes :  $80 < F < 100 \%$ ).

### Traitements statistiques

Les valeurs moyennes des différents paramètres physico-chimiques des échantillons de sols analysés ainsi que le nombre d'espèces et de familles botaniques recensées sont comparées par le test de l'analyse de la variance (ANOVA) et le test de Tukey en utilisant le logiciel Minitab 16.

La similarité de la composition floristique entre les stations étudiées est effectuée par l'indice de similarité  $\beta$  de Sorensen (Gaujour *et al.* 2009 ; Masharabu *et al.* 2010) et l'indice J de Jaccard (De Bello *et al.* 2007).

L'un des objectifs de notre étude portait également sur la caractérisation de la biodiversité végétale du Djebel Tessala et l'analyse des groupements du *Marrubium vulgare*. Compte tenu des données disponibles, les analyses statistiques pouvant répondre à l'objectif principal de cette étude écologique, à savoir la caractérisation de l'habitat de *Marrubium vulgare*, sont notamment : l'analyse factorielle des correspondances (AFC), la classification ascendante hiérarchique (CAH) et l'analyse en composantes principales (ACP).

L'analyse factorielle des correspondances est utilisée depuis longtemps en phytosociologie et en phytoécologie. Selon Cibois (1983), elle traite des tableaux de nombres, remplaçant un tableau difficile à lire par un autre plus simple tout en ayant une bonne approximation de celui-ci. Cette analyse offre également d'autres grandes possibilités. En effet, elle

permet de traiter conjointement les variables floristiques et les variables écologiques (Djebaïli 1984).

Pour la réalisation de l'AFC, la matrice est présentée de telle sorte que les espèces inventoriées ainsi que les résultats physico-chimiques du sol, en plus de l'altitude et la pente, sont disposés en colonnes (variables) et les douze stations choisies en lignes (individus).

Pour la constitution de la matrice de l'AFC, le coefficient de sociabilité n'a pas été pris en considération ; celui d'abondance-dominance étant le seul exploitable dans ce type de traitement. Les variables ont été introduites sous forme de codes. Chaque espèce est codifiée par deux ou trois lettres tirées de son nom vernaculaire, pour rendre facile sa lecture sur les plans factoriels.

La classification ascendante hiérarchique (CAH) est une méthode d'agglomération qui met en relief des groupements de relevés ou d'espèces à partir des résultats de l'analyse factorielle des correspondances. Elle a pour objectif de représenter les ressemblances mutuelles entre les relevés selon un arbre ou dendrogramme, dans lequel les groupes sont aussi mutuellement exclusifs mais hiérarchisés (Blanc 2000 ; Gillet 2000). L'AFC et la CAH sont réalisées en utilisant le logiciel Statistica 6.

Les variables floristiques prises en compte ont fait l'objet d'une analyse en composantes principales (ACP). Cette analyse permet d'intégrer plusieurs variables quantitatives à la fois, d'étudier les liaisons entre les variables, de mettre en évidence les variables les plus discriminantes et d'obtenir une image simplifiée sur des plans discriminant au maximum les facteurs (Duby & Robin 2006 ; Ali Kouani *et al.* 2007). Dans notre cas, l'ACP, réalisée par le logiciel XLSTAT 2012, consiste à mettre en évidence les groupes de stations présentant des affinités floristiques.

## Résultats

### Analyses pédologiques

Les valeurs moyennes relatives aux différents paramètres physico-chimiques caractéristiques de l'horizon superficiel du sol correspondant aux douze stations retenues sont représentées dans le tableau 1.

L'ensemble des échantillons de sol analysés est caractérisé par des pourcentages appréciables de sables grossiers, de sables fins et de fractions grossières ; alors que les argiles et les limons sont faiblement présents. Pour la texture du sol, neuf stations sont limono-sableuses (St 1, St 2, St 3, St 4, St 6, St 7, St 8, St 9 et St 11), deux stations sablo-limoneuses (St 5 et St 12) et une station limono-argilo-sableuse (St 10).

La couleur des échantillons de sols est très diversifiée : marron foncé (St 2, St 3, St 5, St 9 et St 10), marron clair (St 4, St 7 et St 8), noirâtre (St 1 et St 12), brun foncé (St 6) et jaunâtre (St 11).

La structure grumeleuse est dominante dans les stations St 1, St 2, St 3, St 4, St 5, St 7, St 8, St 9 et St 10 ; alors que la structure polyédrique caractérise les stations St 6, St 11 et St 12.

Les stations du versant nord (St 6, St 9, St 10 et St 11) présentent un taux d'humidité plus important que celui des stations du versant sud (St 1, St 2, St 3, St 4, St 5, St 7, St 8 et St 12).

Le pH est légèrement alcalin dans les stations St 1, St 2, St 3, St 4, St 5, St 7, St 9, St 10 et St 11 ; voisin de la neutralité dans les stations restantes (St 6, St 8 et St 12).

La projection des résultats de la conductivité électrique sur l'échelle de salure révèle des sols non salés pour toutes les stations avec des valeurs fluctuant entre 0,1 et 0,44 ms/cm.

Pour la teneur en matière organique, sept stations (St 1, St 2, St 3, St 6, St 9, St 10 et St 12) sont riches avec des valeurs de 4,06 % à 10,45 % ; les autres stations (St 4, St 5, St 7, St 8 et St 11) sont moyennement riches enregistrant des pourcentages compris entre 2,42 % et 3,81 %.

Le taux du calcaire total oscille entre 8,57 % et 49,65 % avec existence de deux classes de sols : sols fortement calcaires (St 1, St 2, St 3, St 5, St 7, St 8, St 9 et St 11) et sols modérément calcaires (St 4, St 6, St 10 et St 12).

Les teneurs en calcaire actif sont le plus souvent inférieures à 3,45 % avec un maximum de 4,52 % noté dans la station 11 (tableau 1).

L'analyse de la variance montre d'une manière globale une différence très hautement significative (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre les valeurs des paramètres physico-chimiques précités des sols des 12 stations, exception faite pour le pH ( $p > 0,05$ ).

**Tableau 1 – Résultats des analyses pédologiques des échantillons de sol pour les 12 fosses pédologiques réalisées dans le Djebel de Tessala (Algérie nord-occidentale).**

Stations	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8	St 9	St 10	St 11	St 12
<b>Analyses granulométriques et textures</b>												
FG (%)	24,37 <sup>c</sup>	16,57 <sup>dcl</sup>	20,53 <sup>cd</sup>	29,83 <sup>b</sup>	20,78 <sup>cd</sup>	14,21 <sup>f</sup>	20,15 <sup>cd</sup>	39,53 <sup>a</sup>	15,88 <sup>cl</sup>	20,15 <sup>cd</sup>	18,84 <sup>de</sup>	17,61 <sup>dcl</sup>
SG (%)	36,75 <sup>a</sup>	30,49 <sup>abc</sup>	31,31 <sup>abc</sup>	30,67 <sup>abc</sup>	14,34 <sup>f</sup>	30 <sup>bc</sup>	22,66 <sup>de</sup>	28,48 <sup>bcd</sup>	16,71 <sup>cl</sup>	25,63 <sup>cd</sup>	22,35 <sup>de</sup>	33,96 <sup>ab</sup>
SF (%)	23,4 <sup>c</sup>	31,09 <sup>d</sup>	22,1 <sup>c</sup>	25,13 <sup>c</sup>	50,4 <sup>a</sup>	33,13 <sup>d</sup>	40,03 <sup>bc</sup>	15,51 <sup>f</sup>	48,56 <sup>a</sup>	33,17 <sup>d</sup>	40,31 <sup>b</sup>	34,28 <sup>cd</sup>
L (%)	6,32 <sup>de</sup>	12,52 <sup>ab</sup>	14,68 <sup>a</sup>	6,17 <sup>e</sup>	5,29 <sup>e</sup>	9,61 <sup>bc</sup>	8 <sup>cde</sup>	7,64 <sup>cde</sup>	6,79 <sup>cde</sup>	10 <sup>bc</sup>	9,4 <sup>cd</sup>	5,59 <sup>e</sup>
A (%)	9,2 <sup>ab</sup>	9,41 <sup>ab</sup>	12,11 <sup>ab</sup>	8,2 <sup>n</sup>	9,1 <sup>ab</sup>	13,04 <sup>a</sup>	9,16 <sup>ab</sup>	8,82 <sup>b</sup>	12,03 <sup>ab</sup>	11,28 <sup>ab</sup>	8,47 <sup>b</sup>	8,54 <sup>b</sup>
Type de texture	Ls	Ls	Ls	Ls	Sl	Ls	Ls	Ls	Ls	Las	Ls	Sl
<b>Paramètres physiques</b>												
Profondeur (cm)	12,5	14	18	16	17	19	18,5	14	15	20	20	19
Couleur	N	MF	MF	MC	MF	BF	MC	MC	MF	MF	J	N
Structure	G	G	G	G	G	P	G	G	G	G	P	P
H (%)	14,38 <sup>de</sup>	10,18 <sup>lg</sup>	9,11 <sup>lg</sup>	8,45 <sup>g</sup>	10,78 <sup>clg</sup>	25,43 <sup>bc</sup>	10,5 <sup>clg</sup>	16 <sup>d</sup>	28,1 <sup>ab</sup>	22,5 <sup>c</sup>	30,42 <sup>a</sup>	12,8 <sup>dcl</sup>
<b>Paramètres chimiques</b>												
pH	7,51 <sup>a</sup>	7,57 <sup>a</sup>	7,5 <sup>a</sup>	7,47 <sup>a</sup>	7,5 <sup>a</sup>	6,98 <sup>a</sup>	7,4 <sup>a</sup>	7,02 <sup>a</sup>	7,54 <sup>a</sup>	7,24 <sup>a</sup>	7,36 <sup>a</sup>	6,94 <sup>a</sup>
Appréciation	LA	LA	LA	LA	LA	VN	LA	VN	LA	LA	LA	VN
CE (ms/cm)	0,14 <sup>cd</sup>	0,15 <sup>cd</sup>	0,1 <sup>g</sup>	0,16 <sup>c</sup>	0,39 <sup>b</sup>	0,12 <sup>clg</sup>	0,1 <sup>g</sup>	0,13 <sup>dcl</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,11 <sup>dclg</sup>	0,13 <sup>cl</sup>	0,16 <sup>c</sup>
Salinité	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MO (%)	11,5 <sup>a</sup>	9,54 <sup>b</sup>	7,42 <sup>c</sup>	3,81 <sup>d</sup>	2,42 <sup>c</sup>	10,45 <sup>ab</sup>	3,32 <sup>d</sup>	3,26 <sup>e</sup>	5,23 <sup>d</sup>	4,06 <sup>de</sup>	2,89 <sup>e</sup>	12,2 <sup>a</sup>
Appréciation	R	R	R	MR	MR	R	MR	MR	R	R	MR	R
CT (%)	33,1 <sup>de</sup>	35,17 <sup>d</sup>	49,65 <sup>a</sup>	9,31 <sup>g</sup>	31 <sup>e</sup>	8,57 <sup>g</sup>	45,5 <sup>b</sup>	45,71 <sup>b</sup>	40 <sup>c</sup>	22,85 <sup>f</sup>	40 <sup>c</sup>	20 <sup>f</sup>
Appréciation	FC	FC	FC	MCA	FC	MCA	FC	FC	FC	MCA	FC	MCA
CA (%)	2,37 <sup>bcd</sup>	3,41 <sup>ab</sup>	3,23 <sup>abc</sup>	1,25 <sup>d</sup>	2,12 <sup>bcd</sup>	1,78 <sup>abcd</sup>	1,27 <sup>d</sup>	1,31	3,45 <sup>abcd</sup>	0,9 <sup>d</sup>	4,52 <sup>a</sup>	1,39 <sup>cd</sup>

abcdefg : les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significatives au niveau p = 0,05 ; FG : fraction grossière ; SG : sables grossiers ; SF : sables fins ; L : limons ; A : argiles ; LS : limono-sableuse ; Sl : sablo-limoneuse ; Las : limono-argileux sableuse ; N : noirâtre ; MF : marron foncé ; MC : marron clair ; BF : brun foncé ; J : jaunâtre ; G : grumeleuse ; P : polyédrique ; pH : potentiel hydrogène ; LA : légèrement alcalin ; VN : voisin de la neutralité ; CE : conductivité électrique ; NS : non salé ; MO : matière organique ; R : riche en matière organique ; MR : moyennement riche en matière organique ; CT : calcaire total ; FC : fortement calcaire ; MCA : moyennement calcaire ; CA : calcaire actif.

### Analyses floristiques

L'inventaire floristique réalisé sur les douze stations a permis de comptabiliser 72 espèces (tableau 2). Le nombre d'espèces enregistre une différence très hautement significative entre les stations échantillonnées (\*\*p < 0,001), il varie de 15 espèces (St 1) à 35 espèces (St 7) (figure 3, D).

Les indices de similarité de Sorensen et de Jaccard (tableau 3) ont fait ressortir des groupes de stations présentant des similitudes floristiques. De fortes similitudes floristiques caractérisent les groupes de stations suivants : St 11-St 9 (β = 0,66 et J = 0,50), St 1-St 2 (β = 0,62 et J = 0,45), St 7-St 6 (β = 0,61 et J = 0,44), St 11-St 5 (β = 0,60 et J = 0,42) et St 4-St 5 (β = 0,60 et J = 0,43) ; par contre de faibles similitudes sont notées sur : St 2-St 12 (β = 0,17 et J = 0,09) et St 1-St 12 (β = 0,25 et J = 0,14).

Les espèces recensées se rattachent à 35 familles botaniques de plantes vasculaires. La famille la mieux représentée est celle des Asteraceae (10 espèces soit un taux de présence de 13,88 %), suivie par la famille des

Poaceae (7 espèces soit un taux de présence de 9,72 %), ensuite viennent les Brassicaceae, Lamiaceae et Oleaceae (4 espèces chacune soit un taux de présence de 5,55 %). Nous avons noté aussi l'existence, d'une part, de trois familles à deux espèces à savoir les Apiaceae, Fabaceae et Liliaceae avec un taux de présence de 4,16 % chacune et, d'autre part, sept familles (Caryophyllaceae, Cistaceae, Convolvulaceae, Papaveraceae, Primulaceae, Rosaceae et Rutaceae) représentées par deux espèces chacune, soit un taux de présence de 2,77 %. Les vingt familles restantes sont monospécifiques enregistrant une faible présence de 1,38 % chacune (figure 3, F).

Le nombre de familles varie d'une station à une autre (\*\*p < 0,001). Les stations 4 et 8 sont les mieux représentées (20 familles chacune) suivies par la station 10 (19 familles) et par les stations 3, 6 et 7 (17 espèces chacune).

Le calcul de la fréquence d'apparition des espèces inventoriées dans les relevés floristiques a fait ressortir cinq classes d'espèces : la classe I comportant les espèces très rares (32 espèces) ; la classe II englobant les espèces rares (12 espèces) ; la classe III

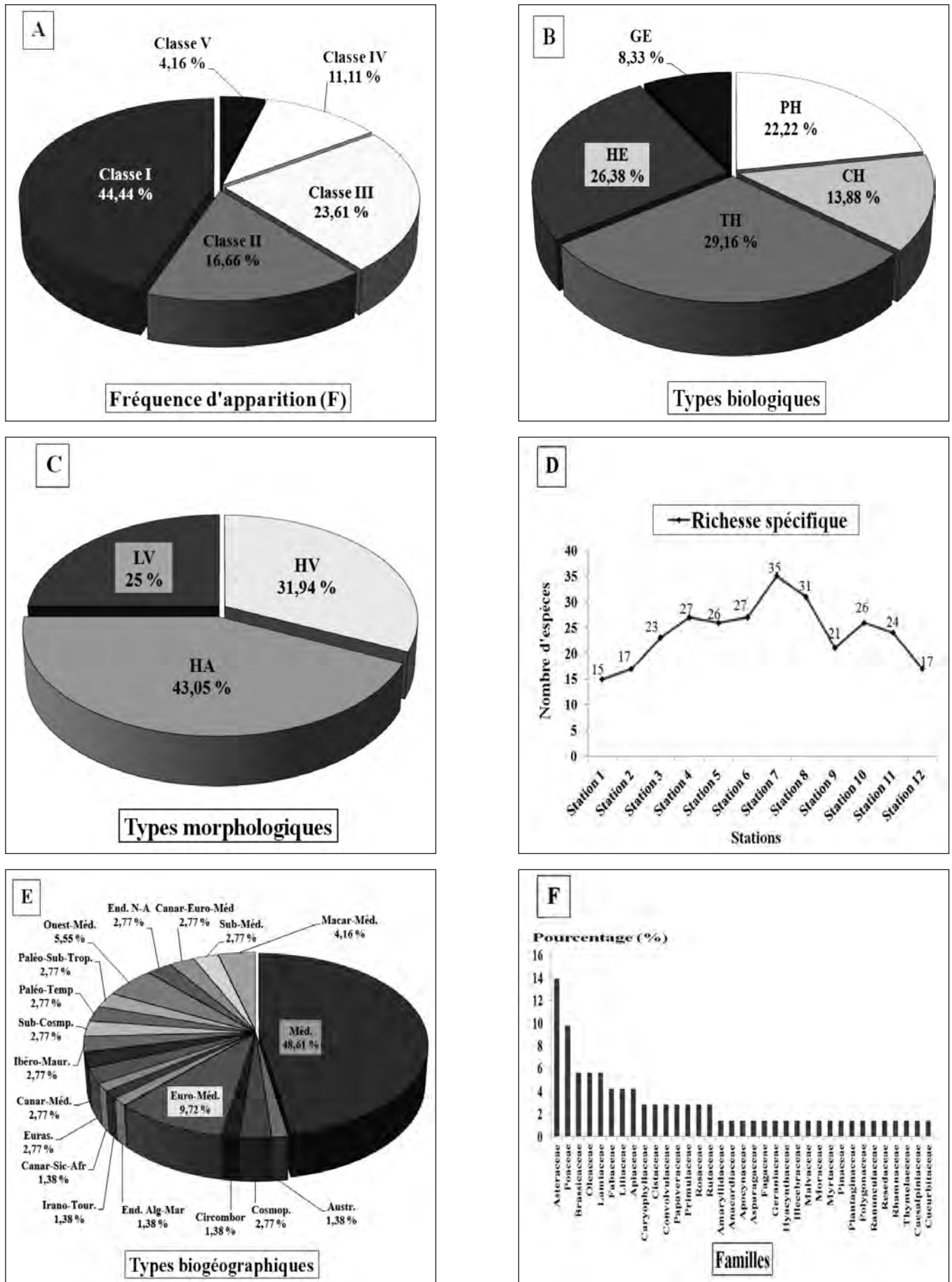


Figure 3 – Richesse spécifique et classification des espèces inventoriées selon leurs fréquences d'apparition, familles, types biologiques, morphologiques et biogéographiques.

Tableau 2 – Tableau global des relevés floristiques pour les 12 stations réalisées dans le Djebel de Tessala (Algérie nord-occidentale).

Station	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8	St 9	St 10	St 11	St 12
Date	15-04-10	17-04-10	22-04-10	26-04-10	30-04-10	09-05-10	13-05-10	15-04-10	11-05-10	13-05-10	15-05-10	03-05-10
Recouvrement de la végétation en %	50	50	60	60	75	60	80	80	75	80	75	80
Longitude (ouest)	35°16'34"	35°16'33"	35°16'00"	35°16'13"	35°16'10"	35°17'23"	35°16'16"	35°16'21"	35°16'08"	35°16'56"	35°17'11"	35°16'12"
Latitude (nord)	0°46'25"	0°46'27"	0°46'45"	0°46'32"	0°46'13"	0°46'16"	0°45'48"	0°47'13"	0°45'55"	0°46'29"	0°47'57"	0°46'58"
Altitude en mètre	575	596	732	770	809	833	792	990	728	814	850	881
Versant	S	S	S	S	S	N	S	S	N	N	N	S
Exposition	S-E	S-O	S-E	S-E	S-O	N-O	S-E	S-E	N-E	N-E	N-O	S-O
Pente en %	0-3	0-3	3-12	3-12	0-3	<25	12-25	<25	12-25	12-25	<25	3-12
<b>Strate arborescente</b>												
1	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	-	-	-	-	-	-	2.2	-	-	-	-
2	<i>Ficus carica</i> L.	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-
3	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	-	-	-	-	-	-	2.2	-	-	-	-
4	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	-	-	-	-	-	-	2.3	-	-	-	-
5	<i>Olea europea</i> L.	-	-	-	-	-	-	1.1	2.1	2.1	1.1	-
6	<i>Pinus halepensis</i> Mill.	-	-	-	-	-	-	3.2	-	-	-	+
7	<i>Quercus ilex</i> L.	-	-	-	-	-	-	3.3	-	1.1	-	-
<b>Strate arbustive</b>												
8	<i>Bryonia dioica</i> Jacq.	-	-	2.2	-	-	-	-	-	-	1.1	-
9	<i>Crataegus oxyacantha</i> L.	-	-	-	-	1.4	-	1.1	-	-	-	-
10	<i>Nerium oleander</i> L.	-	-	-	-	1.4	-	-	-	-	-	-
11	<i>Olea europea</i> L.	2.2	1.4	-	-	-	2.3	-	-	-	-	25
12	<i>Olea europea</i> Var. <i>Oleaster</i> Dc.	-	-	1.2	1.2	1.4	1.1	-	1.1	-	-	41,66
13	<i>Phillyrea angustifolia</i> L.	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	8,33
14	<i>Pistacia atlantica</i> Desf.	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	8,33
15	<i>Rosa sempervirens</i> L.	-	-	1.2	-	-	-	1.1	-	-	1.1	25
16	<i>Smilax aspera</i> L.	-	-	1.1	-	-	-	1.1	-	-	-	8,33
17	<i>Ziziphus lotus</i> (L.) Lam.	-	-	2.1	1.1	-	-	-	-	1.1	-	25
<b>Strate buissonnante et herbacée</b>												
18	<i>Ampelodesma mauritanicum</i> Bir.	2.1	1.1	-	-	2.1	1.1	-	-	2.1	-	41,66
19	<i>Anacyclus clavatus</i> (Desf.) Pers.	-	-	-	-	2.1	2.2	-	-	-	-	16,66
20	<i>Anagallis arvensis</i> L.	-	1.1	1.1	-	-	-	2.1	1.1	1.1	2.1	58,33
21	<i>Anagallis monelli</i> L.	-	1.2	-	2.2	2.1	2.2	1.1	1.1	-	1.1	58,33
22	<i>Asparagus acutifolius</i> L.	-	-	1.4	1.1	1.1	+	2.2	1.4	-	1.1	75
23	<i>Asphodelus microcarpus</i> Sal & Viv.	-	-	1.1	2.1	1.1	2.2	1.1	2.2	2.2	-	75
24	<i>Asteriscus maritimus</i> L.	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	8,33
25	<i>Avena sterilis</i> L.	-	-	-	-	-	1.4	-	-	-	-	8,33
26	<i>Ballota hirsuta</i> L.	+	1.4	1.1	1.1	1.1	3.2	3.2	-	2.1	2.1	83,33
27	<i>Brista maxima</i> L.	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	8,33
28	<i>Bromus rubens</i> L.	1.1	-	1.2	-	2.1	1.1	+	-	-	+	58,33
29	<i>Bryonia dioica</i> Jacq.	-	-	-	1.1	-	-	2.2	-	1.1	-	33,33
30	<i>Calendula arvensis</i> L.	-	-	-	1.1	-	-	-	-	1.1	2.2	41,66
31	<i>Calendula bicolor</i> L.	-	-	-	3.2	3.2	-	-	-	1.1	1.1	33,33
32	<i>Calycotome spinosa</i> Link.	-	-	1.1	2.2	3.2	2.1	3.2	2.1	2.1	2.1	83,33
33	<i>Capsella bursa-pastoris</i> L.	-	1.1	2.1	-	-	-	1.1	-	1.1	-	25
34	<i>Carduus pycnocephalus</i> L.	2.1	2.1	1.1	-	1.1	2.2	1.1	-	1.1	-	58,33
35	<i>Centaurea pullata</i> L.	-	-	-	-	-	2.1	-	-	-	-	8,33
36	<i>Chamaerops humilis</i> L.	-	-	-	2.1	2.2	3.2	2.1	2.1	2.2	2.1	75
37	<i>Cistus salvifolius</i> L.	-	-	-	-	1.1	-	1.1	-	-	-	16,66



Tableau 3 – Indices de similarité de Sorensen et de Jaccard.

Stations	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8	St 9	St 10	St 11	St 12	Indice de Sorensen (β)
St 1	ND	0,62	0,36	0,33	0,29	0,38	0,36	0,34	0,44	0,43	0,51	0,25	
St 2	0,45	ND	0,50	0,31	0,41	0,36	0,38	0,29	0,36	0,41	0,39	0,17	
St 3	0,22	0,33	ND	0,36	0,53	0,40	0,41	0,40	0,45	0,44	0,42	0,35	
St 4	0,20	0,18	0,21	ND	0,60	0,51	0,45	0,44	0,50	0,52	0,58	0,54	
St 5	0,17	0,26	0,36	0,43	ND	0,49	0,39	0,42	0,59	0,57	0,60	0,51	
St 6	0,23	0,22	0,25	0,35	0,32	ND	0,61	0,48	0,50	0,49	0,50	0,45	
St 7	0,21	0,23	0,26	0,29	0,24	0,44	ND	0,36	0,39	0,49	0,44	0,42	
St 8	0,21	0,17	0,25	0,28	0,26	0,31	0,22	ND	0,46	0,45	0,50	0,50	
St 9	0,28	0,22	0,29	0,33	0,42	0,33	0,24	0,30	ND	0,55	0,66	0,47	
St 10	0,28	0,26	0,28	0,35	0,40	0,32	0,32	0,29	0,38	ND	0,50	0,37	
St 11	0,34	0,24	0,27	0,41	0,42	0,34	0,28	0,34	0,50	0,34	ND	0,43	
St 12	0,14	0,09	0,21	0,37	0,34	0,29	0,26	0,33	0,31	0,22	0,28	ND	
Indice de Jaccard (J)													

ND : non déterminé (indice de Sorensen et de Jaccard égal à 1).

correspondant aux espèces fréquentes (17 espèces); la classe IV se rapportant aux espèces abondantes (8 espèces) et la classe V à laquelle sont rattachées les espèces très constantes (3 espèces) (figure 3, A).

Les thérophytes (TH) est le type biologique dominant (21 espèces soit 29,16 %), suivis par les hémicryptophytes (HE) (19 espèces soit 26,38 %), les phanérophytes (PH) (16 espèces soit 22,22 %), les chaméphytes (CH) (10 espèces soit 13,88 %) et enfin les géophytes (GE) (6 espèces soit 8,33 %) (figure 3, B).

L'analyse du spectre biogéographique montre, dans les 12 stations, la dominance des espèces de type méditerranéen qui constitue presque la moitié des espèces recensées avec 35 espèces soit un taux de 48,61 %. Suivent successivement les éléments euro-méditerranéens (7 espèces soit un taux de 9,72 %), ouest-méditerranéens (4 espèces soit un taux de 5,55 %) et macaronésiens-méditerranéens (3 espèces soit un taux de 4,16 %) (figure 3, E).

La catégorisation des espèces végétales rencontrées selon leurs types morphologiques montre que les herbacées annuelles (HA) sont les espèces dominantes (31 espèces soit un taux de 43,05 %), suivies par les herbacées vivaces (HV) (23 espèces soit un taux de 31,94 %) et enfin les ligneuses vivaces (LV) (18 espèces soit un taux de 25 %) (figure 3, C).

### Caractérisation de l'habitat de *Marrubium vulgare* L.

La projection des variables (paramètres physico-chimiques du sol et espèces recensées) sur le plan factoriel (F1 x F2) met en évidence quatre grands ensembles répartis sur les deux parties de l'axe 1. Cet axe représente 39,41 % de l'information totale, contre 19,24 % d'inertie expliquée par l'axe 2 (figure 4, A). Les différents groupes sont répartis sur les deux côtés de l'axe 1 : deux groupes du côté positif (Gr 1 et Gr 2) et deux sur le côté négatif (Gr 3 et Gr 4).

Le groupe 1 (Gr 1) forme le cortège floristique où est présent *Marrubium vulgare*. Il est constitué essentiellement d'espèces dont la fréquence d'apparition est rare telles que *Capsella bursa-pastoris* L., *Foeniculum vulgare* (Mill.) Gaer., *Hordeum murinum* L., *Muscari comosum* (L.) Mill., *Olea europea* L. et *Ziziphus lotus* (L.) Lam., avec absence totale des chaméphytes et dominance des hémicryptophytes comme *Malva sylvestris* L., *Scolymus hispanicus* L., *Ampelodesma mauritanicum* Bir. et *Reseda alba* L. Du point de vue biogéographique et morphologique, ce groupe est marqué par une nette dominance du type méditerranéen comme *Rumex bucephalophorus* L. et *Carduus pycnocephalus* L. Il est également caractérisé par une présence équitable des herbacées annuelles et vivaces, et une faible présence des espèces ligneuses représentées par trois espèces. Ce groupe est formé dans sa majorité d'espèces se développant sur les deux versants nord et sud, à des basses et moyennes

altitudes, en corrélation avec la présence de terres fines (sables fins et limons), modérément alcalines, riches en matière organique et avec de fortes teneurs en calcaire actif.

Le groupe 2 (Gr 2) englobe dans sa majorité des espèces appartenant à la classe des espèces très rares avec dominance des thérophytes et absence totale des géophytes. Du point de vue morphologique, nous y constatons la dominance des herbacées annuelles qui constituent les trois quarts des espèces présentes. En ce qui concerne la nature biogéographique, ce groupe est constitué à moitié d'espèces méditerranéennes. Cet ensemble est associé à des sols où prédominent notamment les sables grossiers, les argiles et le calcaire total.

Le groupe 3 (Gr 3) est caractérisé par la dominance des espèces appartenant à l'élément méditerranéen dont la fréquence d'apparition est très rare. Du point de vue biologique et morphologique, nous avons pu noter la dominance des thérophytes et des hémicryptophytes d'une part, et des herbacées vivaces et annuelles d'autre part. Cet ensemble est marqué par la présence des espèces se développant majoritairement au versant sud et en lien avec un taux élevé en humidité et le type de structure grumeleuse du sol.

Le groupe 4 (Gr 4) est marqué par la présence de deux espèces très constantes parmi les trois inventoriées : *Ballota hirsuta* L. et *Calycotome spinosa* Link., avec une nette dominance des ligneux et une grande richesse en phanérophytes. En ce qui concerne la répartition des types biogéographiques, le type méditerranéen est le plus dominant. Ce lot d'espèces domine la station 8 où les deux strates arborescente et arbustive ont un taux de recouvrement le plus important parmi les stations retenues en liaison avec l'altitude, la teneur en graviers et en cailloux du sol ainsi que la pente.

La classification ascendante hiérarchique (figure 4, B) a permis de mettre en évidence sur l'ensemble de l'espace factoriel des groupes de stations échantillonnées selon leurs affinités.

Le groupe A est formé de deux sous-groupes (A1 et A2).

Le sous-groupe A1 est constitué d'une seule station (St 8) appartenant au versant sud où la pente est forte (< 25 %) et l'altitude est la plus élevée (990 m). Du point de vue de la richesse spécifique, cette station vient en deuxième position avec 30 espèces. Ce sous-groupe est

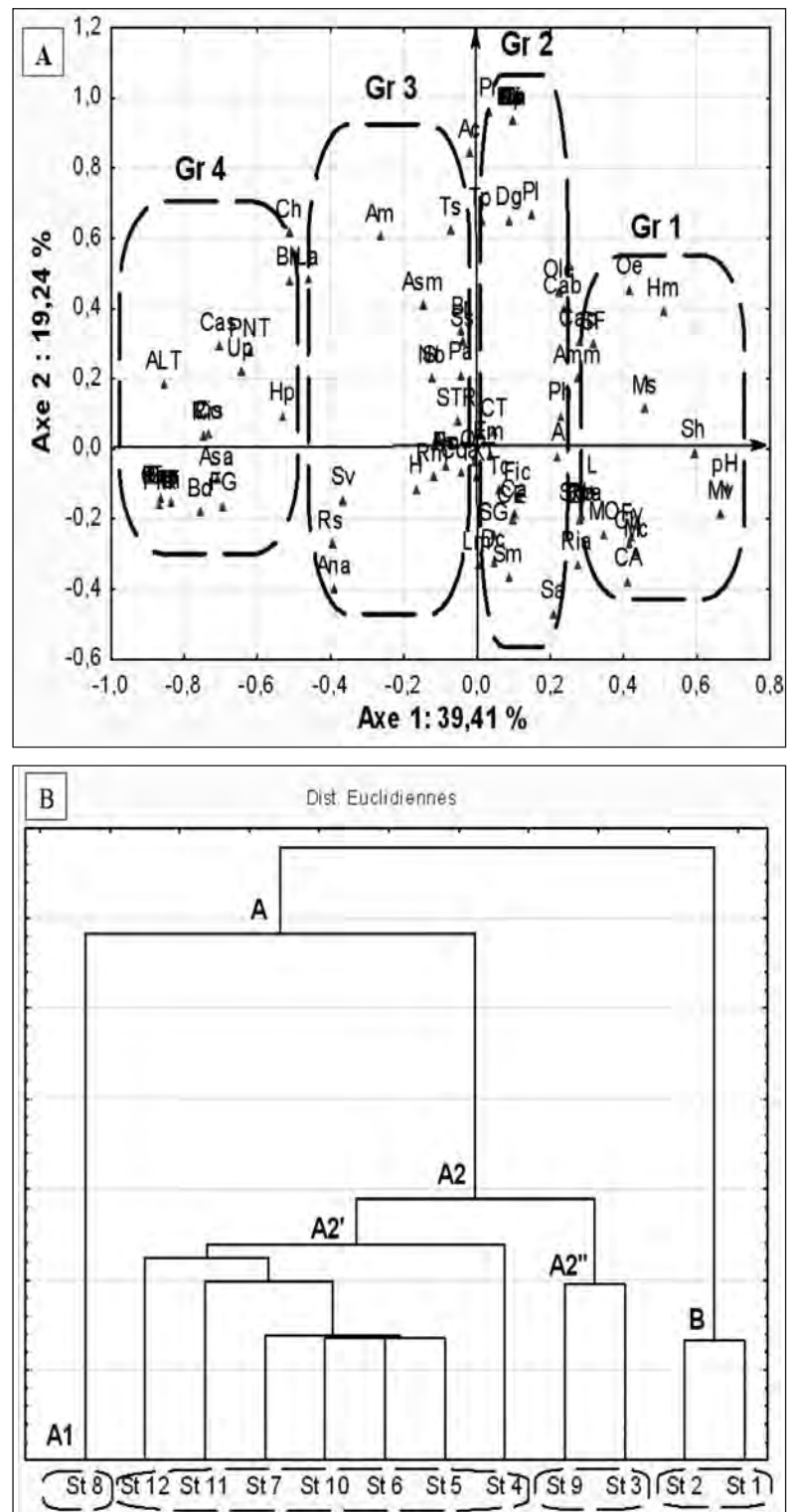


Figure 4 – Traitements statistiques des résultats.  
 A : Analyse factorielle des correspondances (AFC) ;  
 B : Classification ascendante hiérarchique (CAH).

caractérisé par une présence importante en phanérophytes. Il est constitué d'une strate arborescente développée, marquée par la présence exclusive de *Ceratonia siliqua* L., d'*Eucalyptus globulus* Labill. et de *Fraxinus excelsior* L.

Le sous-groupe A2 est subdivisé en deux sous-groupes (A2' et A2'') :

- le sous-groupe A2' est très diversifié, formé de sept stations (St 4, St 5, St 6, St 7, St 10, St 11 et St 12), localisées sur les deux versants (sud et nord), caractérisées par des altitudes moyennes comprises entre 770 et 881 m et par des valeurs de pentes hétérogènes. En ce qui concerne la structure et la texture du sol, ce sous-groupe forme un mélange entre la structure grumeleuse et polyédrique d'une part, et la texture limono-sableuse, sablo-limoneuse et limono-argileux sableuse d'autre part. Du point de vue floristique, nous avons noté la dominance des hémicryptophytes à l'exception de la station 7 où dominent les thérophytes. Nous avons pu noter aussi la dominance des herbacées annuelles à part pour la station 4 où nous avons constaté une distribution équitable entre les herbacées annuelles et les herbacées vivaces ;
- le sous-groupe A2'' est composé de deux stations (St 3 et St 9), se trouvant à des altitudes presque identiques (732 et 728 m) et où la richesse spécifique est presque semblable (23 et 21 espèces). Ce sous-groupe est caractérisé au niveau du sol par des proportions élevées en calcaire total et en matière organique, des sols légèrement alcalins, une structure grumeleuse, une texture limono-sableuse et une couleur marron foncé. Le test de Tukey montre que les stations 3 et 9 ne présentent aucune différence en argiles, en potentiel hydrogène et en calcaire actif.

Le groupe B est formé de deux stations (St 1 et St 2) appartenant au versant sud, se trouvant à des altitudes basses ne dépassant pas les 600 m et caractérisées par une faible pente (0-3 %). Ce groupe est doté de la plus faible richesse spécifique parmi les stations retenues avec des valeurs ne dépassant pas les 17 espèces, il est le plus pauvre en espèces ligneuses, en géophytes et en phanérophytes. Du point de vue pédologique, ce groupe de stations est caractérisé par des sols à pH légèrement alcalin, riche en matière organique, fortement calcaire, avec un taux faible en humidité estimé à moins de 16 %, une texture limono-sableuse et une structure grumeleuse. Selon le test de Tukey, les stations 1 et 2 se ressemblent en sables grossiers, argiles, potentiel hydrogène, conductivité électrique, calcaire total et calcaire actif.

Sur le plan factoriel F1 x F2 (figure 5), sont représentées les ségrégations secrétées par l'ACP concernant les différents résultats floristiques des douze stations échantillonnées. Au niveau de ce plan, 43,41 % de l'information totale est expliquée par l'axe F1 contre 19,17 % donnée par l'axe F2. En tenant compte des contributions que prennent les stations échantillonnées (figure 5, A) et les corrélations entre les variables floristiques (figure 5, B), quatre ensembles s'individualisent sur les deux côtés de l'axe F1 : deux ensembles (E1 et E2) se forment sur le côté positif.

L'ensemble E1 est subdivisé en deux sous-ensembles (E1' et E1'').

Le sous-ensemble E1' constitué par la station 7 est corrélé :

- aux thérophytes (TH) dominant cette station avec 14 espèces et une présence de 40 % ;
- aux herbacées annuelles (HA) représentées par 12 espèces et une présence de 34,28 % ;
- au nombre de types biogéographiques (TBIORG) avec 14 types soit une présence de 40 % et la présence exclusive du type iranotouranien ;
- aux espèces de la classe III (CLIII) avec 14 espèces soit une présence de 40 %.

Les représentants de ce sous-ensemble présentent de forts coefficients de corrélation : 0,889 entre HV et CLIII ; 0,883 entre TH et CLIII et 0,857 entre TH et HA.

Le sous-ensemble E1'' formé par la station 8 est corrélé :

- aux espèces ligneuses vivaces (LV) avec 13 espèces et un taux de 41,93 % ;
- aux phanérophytes (PH) avec 11 espèces soit une présence de 35,48 % ;
- aux espèces de classe I (CLI) avec 10 espèces et une présence de 32,25 % ;
- au taux de recouvrement de la végétation (RCV) le plus élevé, estimé à 80 % ;
- au nombre de familles (NF) représentant 57,14 % du nombre total des familles présentes ;
- au nombre élevé en espèces (NE) équivalent à un taux de 43,05 % des espèces recensées. Nous avons enregistré des coefficients de corrélation de : 0,991 entre PH et LV, 0,884 entre NE et PH, 0,837 entre NE et NF et 0,822 entre NF et PH.

L'ensemble E2 à son tour se subdivise en deux sous-ensembles (E2' et E2'').

Le sous-ensemble E2' est formé par les stations 10 et 11 qui sont corrélées à une seule variable floristique à savoir les hémicryptophytes (HE). Ces derniers sont abondants dans St 10 et St 11 et sont représentés respectivement par 11 espèces soit une présence de 42,40 % et 9 espèces soit un taux de 45,83 %. Les indices de similarités de Sorensen et de Jaccard confirment la similitude entre ces deux stations ( $\beta = 0,50$  et  $J = 0,34$ ).

Le sous-ensemble E2'' est constitué par les stations 4, 5 et 6 qui sont corrélées :

- aux herbacées vivaces (HV) qui enregistrent leur plus grand nombre avec 12, 10 et 9 espèces et des taux de 44,44 %, 38,46 % et 33,33 % respectivement dans St 4, St 5 et St 6 ;
- aux géophytes (GE) représentées par un nombre maximum en espèces qui marquent leurs valeurs maximales avec 5 espèces et des pourcentages de 18,51 % et 19,23 % dans les stations 4 et 5, et 4 espèces soit un taux de 14,81 % dans St 6 ;
- aux chaméphytes (CH) qui enregistrent à leur tour leurs valeurs maximales avec 7, 4 et 5 espèces et des contributions de 29,92 %, 15,38 % et 18,51 % dans St 4, St 5 et St 6 respectivement ;
- aux espèces appartenant à la classe V (CLV) avec un nombre identique en espèces, estimé à 3 ;
- aux espèces de la classe IV (CLIV) qui sont abondantes dans St 4 et St 5 avec 8 espèces chacune et représentée par 7 espèces dans St 6.

Sur les trois stations sus-indiquées, seules les stations 4 et 5 présentent une forte similarité ( $\beta = 0,60$  et  $J = 0,43$ ).

Sur le côté négatif de l'axe F1, l'ensemble E3 est constitué par les stations 3 et 9, corrélées aux espèces faisant partie de la classe III (CLIII). Cette catégorie d'espèces est abondante dans St 3 et St 9 avec 7 espèces chacune et des taux respectifs de 30,43 % et 33,33 %.

L'ensemble E4 est formé par les stations 1, 2 et 12 qui ne sont corrélées à aucune variable floristique. Ce sont les stations les moins diversifiées sur les plans spécifiques et familles botaniques.

La CAH traitant conjointement les paramètres physico-chimiques du sol et les espèces inventoriées a abouti aux mêmes groupes de stations ayant des affinités entre elles, que ceux dégagés par l'ACP traitant seulement les paramètres floristiques.

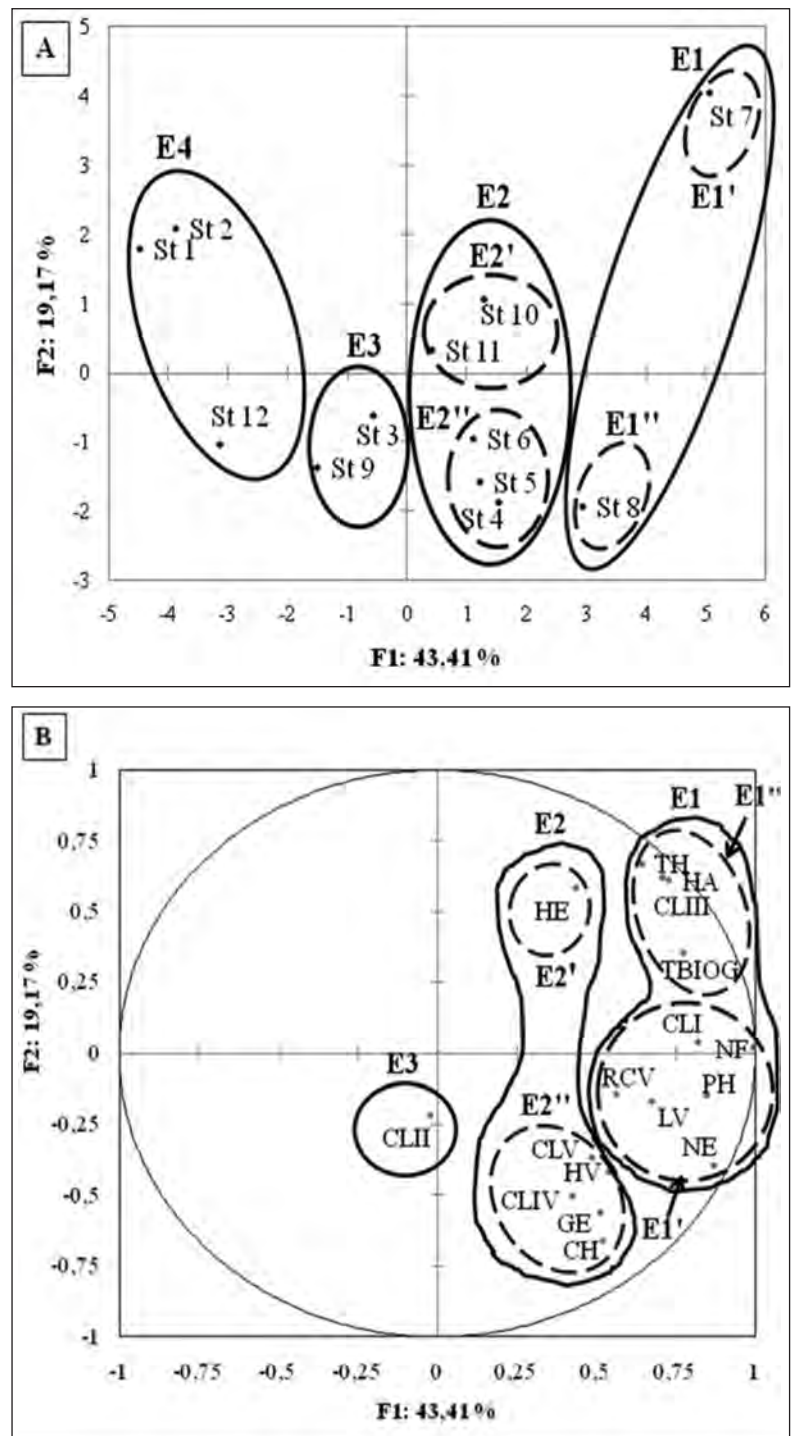


Figure 5 – Analyse en composantes principales.  
 A : projection des individus sur le plan factoriel (F1 x F2) ;  
 B : cercle des corrélations des variables.

E : ensemble ; NF : nombre de familles ; NE : nombre d'espèces ;  
 TBIOG : nombre de types biogéographiques ; HE : hémicryptophytes ;  
 CH : chaméphytes ; TH : thérophytes ; PH : phanérophytes ; GE : géophytes ;  
 LV : ligneuses vivaces ; HV : herbacées vivaces ; HA : herbacées annuelles ;  
 RCV : recouvrement ; CLI : classe I ; CLII : classe II ; CLIII : classe III ;  
 CLIV : classe IV ; CLV : classe V.

## Discussion

L'ensemble des caractères physico-chimiques des échantillons de sol retenus, prélevés de l'horizon de surface (profondeur  $\leq 20$  cm), ont contribué à identifier certaines particularités. Selon Aubert (1989), la composition de cet horizon joue un rôle important sur le comportement de la végétation. Vu les perturbations humaines, agricoles ou pastorales, la plupart des descripteurs du sol concernent donc surtout l'horizon superficiel (Devineau 2001).

La couleur des sols reste très hétérogène, allant des sols jaunâtres et marron clair à des sols noirâtres, c'est l'une des caractéristiques des sols de la région d'étude connus par leurs couleurs très diversifiées (Ferka-Zazou 2006). Cette diversité de la couleur des sols est due à la nature de la roche mère, aux mécanismes complexes de pédogénèse en zone méditerranéenne, à la nature et au taux de la matière organique, à l'accumulation ou non des sels, au fer et à la forme sur laquelle il se trouve.

Le taux d'humidité est plus important dans les échantillons de sol du versant nord en comparaison avec ceux du versant sud, cela peut être expliqué par l'exposition du versant nord aux vents humides venant de la mer, ce qui favorise l'augmentation de la charge en eau dans les sols, tandis que le versant sud est exposé à l'ensoleillement et aux vents chauds, ce qui entraîne l'évaporation de l'humidité (Benyahia *et al.* 2001). La teneur en humidité dépend en effet de la nature du sol, de sa richesse en matière organique, de la période et de l'emplacement du prélèvement (Aubert 2003).

La structure grumeleuse domine la majorité des sols échantillonnés dans le Djebel Tessala et caractérise les sols rouges, brun-rouge et les vertisols. Il existe aussi des sols avec une structure polyédrique due à la fissuration des limons et des argiles et où on remarque que l'action de la faune est moins marquée. Cette structure caractérise en général les sols bruns calcaires avec une charge caillouteuse très importante à la surface (Talbi *et al.* 2011). En ce qui concerne la texture, nous avons remarqué que la texture limono-sableuse et, à un degré moindre, la texture sablo-limoneuse sont prédominantes. Ces deux textures sont caractéristiques des sols dans le site d'étude, déterminées surtout par la nature du matériau pédologique originel et les propriétés de l'environnement des sols (Pouquet 1952).

Le pH est légèrement basique dans la majorité des échantillons de sol, néanmoins nous notons la présence de sols légèrement acides due probablement à l'utilisation des engrais surtout phosphoreux, aux pluies acides et à l'assimilation des nutriments par les racines de la plante. Le pH n'est pas une caractéristique stable du sol, mais dépend des différents cations absorbés, de la nature de la couverture végétale ainsi que des conditions climatiques (Dajoz 1982) ; il est lié aussi à la quantité du calcaire présent dans le sol, et dépend de la présence du complexe argilo-humique (Huetz Delemps 1980).

Le taux de matière organique est très variable (moyen à fort). Les quantités appréciables de matière organique enregistrées s'expliquent par la proximité de la plupart des stations choisies aux champs cultivés. La quantité de la matière organique dépend de l'âge et du type du groupement, mais aussi de l'abondance des éléments grossiers, ces derniers ayant pour effet de concentrer le système racinaire et les substances organiques dans les interstices (Stambouli 2010).

Comme la teneur en matière organique, les taux de calcaire total et actif présents dans les échantillons du sol restent très hétérogènes (modérés à forts). Cette forte teneur se trouve liée à la nature de la roche mère qui est souvent calcaire, expliquant ainsi l'installation des garrigues qui résultent de la dégradation des formations forestières (Benabdelli 1983).

Les résultats de la conductivité électrique indiquent des sols non salés dans l'ensemble des échantillons de sol retenus.

L'étude de la composition floristique a permis de mettre également en évidence certaines caractéristiques écologiques des stations étudiées.

Sur l'ensemble des relevés floristiques réalisés dans les stations étudiées, 72 espèces ont été comptabilisées. Ce nombre peut être qualifié de moyen par rapport aux études antérieures menées sur notre site d'étude. Bouzidi *et al.* (2009) ont dénombré 43 espèces et Cherifi *et al.* (2011) ont pu recenser 41 espèces. Dans d'autres inventaires, le nombre d'espèces est beaucoup plus important. En effet, Ouici (2011) a relevé 108 espèces et Benchiha (2012) a identifié 124 espèces.

La richesse spécifique représentée par le nombre d'espèces dans un territoire défini sur un relevé floristique est la première approche pour évaluer la biodiversité (Quézel *et al.*

1988). Cette richesse présente une distribution assez hétérogène avec une différence de 20 espèces entre la valeur minimale (15 espèces à la station 1) et maximale (35 espèces à la station 7). Cette inégalité témoigne de la variabilité de la répartition de la flore en relation avec les différents facteurs du milieu, tels que le type de sol, l'exposition ou l'action anthropozoogène. Selon la classification de Daget & Poissonet (1991, 1997), cette flore peut être qualifiée de moyennement riche avec une valeur moyenne de 24 espèces pour une surface de 100 m<sup>2</sup> par station.

Du point de vue composition, nous avons constaté la prédominance des Asteraceae avec 10 espèces et des Poaceae avec 7 espèces, suivies par les Brassicaceae, les Lamiaceae et les Oleaceae avec 4 espèces chacune. Cette représentation de familles est comparable à celle signalée par Baraka (2008), qui a réalisé un inventaire de plus de 190 espèces appartenant aux deux versants du Djebel Tessala.

Si on considère la flore algérienne dans son ensemble, les Asteraceae et les Poaceae occupent à côté des Fabaceae les trois premiers rangs. Elles capitalisent à elles seules 166 espèces soit 39 % de l'effectif global de la flore adventice oranaise (Kazi Tani *et al.* 2010). Leur supériorité numérique est également confirmée par Guillemin & Maillet (1982) au sein de la flore des régions ouest-méditerranéennes de l'Europe.

Une forte corrélation dégagée par l'ACP a été enregistrée entre le nombre d'espèces et le nombre de familles avec un coefficient de corrélation de 0,837, car plus le nombre d'espèces est important, plus le nombre de familles l'est aussi (Daget & Gaston 2001).

Le calcul de la fréquence d'apparition des espèces inventoriées a fait ressortir l'existence d'espèces très constantes comme *Calycotome spinosa* Link., *Ballota hirsuta* L. et *Marrubium vulgare* L., qui sont présentes presque dans tous les relevés. D'autres sont rares et très rares, représentant la majorité des taxons inventoriés. Selon Gégout (1995), la rareté d'une espèce peut être due à plusieurs raisons : elle est caractéristique d'un autre milieu et y est donc par accident ; elle est « naturellement » rare, sa fréquence est très faible dans toutes les conditions écologiques. Dans notre cas, c'est l'hétérogénéité du milieu physique, sa complexité conjuguée aux différents stress écologiques qui sont les causes des raretés floristiques rencontrées localement.

La composition du spectre biologique montre une prédominance des thérophytes sur les hémicryptophytes, phanérophytes, chamaephytes et géophytes. Ces observations sont dans l'ensemble semblables à celle de Dahmani-Megrerouche (1997) dans les principales formations forestières à Chêne vert du Tell occidental algérien.

La proportion élevée des thérophytes (29,16 %) s'explique par les conditions édaphiques (sol léger et bien aéré) et surtout microclimatiques : périodes hivernale et printanière relativement humides alternant avec une période assez prolongée de sécheresse (Henaoui, 2007).

Floret *et al.* (1990) signalent que plus un système est influencé par l'homme (surpâturage, culture), plus les thérophytes prennent de l'importance. En plus de l'anthropisation, la thérophytisation trouverait son origine dans le phénomène d'aridité. Barbero *et al.* (1990) présentent ainsi la « thérophytie » comme étant une forme de résistance à la sécheresse ainsi qu'aux fortes températures des milieux arides et semi-arides.

Malgré l'importance des thérophytes, les hémicryptophytes gardent une place particulièrement importante dans la zone d'étude par leur présence évaluée à 26,38 %. Barbero *et al.* (1989) expliquent l'abondance des hémicryptophytes au Maghreb par une plus grande richesse en matière organique, par l'humidité et par l'altitude vu son effet sur la diminution des températures. Rappelons que selon Raunkiaer (1934) in Jeanmonod *et al.* (2011), l'augmentation du taux des hémicryptophytes est liée à l'augmentation du froid comme à celle des précipitations, ce qui correspond aux modifications climatiques observées lors de l'élévation de l'altitude. En plus, la teneur en matière organique est en général corrélée avec le taux d'humidité des sols (Aubert 2003). Cette relation justifie l'augmentation du contenu des sols en matière organique selon un gradient altitudinal (Wesemael & Brahy 2012). Cela explique donc l'importance des hémicryptophytes et leur corrélation selon l'ACP avec les stations 4, 5 et 6 situées à 833 m d'altitude et où des valeurs maximales de 10,45 % en matière organique et de 30,42 % en humidité sont notées.

Les phanérophytes sont représentés par 22,22 % des espèces inventoriées. Ils sont moins adaptés que les chamaephytes à la sécheresse et à la lumière, car ils sont moins xérophiiles (Anderson 1988 ; Benabadj

& Bouazza 2001). Selon l'ACP ce type biologique est corrélé avec la station 8 avec un taux de 35,48 %, et se trouve lié au recouvrement (80 %), au nombre de familles (20 familles) et à l'altitude (880 m) caractérisant la station la moins dégradée avec un recouvrement important en strates arborée et arbustive qui la protège du surpâturage dans la mesure où les animaux y accèdent difficilement.

Les chamaephytes et les géophytes sont beaucoup moins importants, ils présentent des taux respectifs de 13,88 et 8,33 %. Le premier type biologique est décrit comme étant le mieux adapté à l'aridité et s'installe proportionnellement au fur et à mesure qu'il y a dégradation des écosystèmes forestiers (Ghezlaoui *et al.* 2011). Quant aux géophytes, leur très faible proportion est en relation avec un gradient défavorable (rigueurs climatiques) favorisant le développement d'espèces à cycle de vie court (Aidoud 1983). Ces deux types biologiques se trouvent liés selon l'ACP aux stations 4, 5 et 6 qui sont représentées par des garrigues fortement dégradées à base de *Calycotome spinosa* Link. associé au *Chamaerops humilis* L.

Sur le plan phytogéographique, le type méditerranéen domine dans les stations choisies avec une présence de 48,61 %, suivi par les types européen-méditerranéen (9,72 %) et ouest-méditerranéen (5,55 %). Les autres ensembles, malgré leurs faibles participations, contribuent à la diversité et à la richesse du potentiel phytogénétique de la zone étudiée. Plus de 15 types biogéographiques sont observés, ce qui majore hautement la phytodiversité en place. Ces chiffres confirment bien l'appartenance du territoire étudié à la flore méditerranéenne.

La dominance de l'élément méditerranéen a été confirmée dans le Djebel de Tessala (Baraka 2008 ; Ouici 2011) et dans plusieurs régions de l'Ouest algérien comme au nord de Tlemcen (Ghezlaoui *et al.* 2009), une partie du Tell occidentale algérien (Kazi Tani *et al.* 2010) et le Chott El-Gharbi (Ghezlaoui *et al.* 2011).

En ce qui concerne la morphologie, les formations végétales des stations échantillonnées sont caractérisées par une nette dominance des espèces herbacées annuelles, suivies par les herbacées vivaces et les ligneuses vivaces. La prédominance des herbacées annuelles est due à l'envahissement des thérophytes, qui sont en général des herbacées annuelles. Pour Romane (1987) *in* Dahmani-Megrerouche

(1997) : « Il y a une bonne corrélation entre les types biologiques et de nombreux caractères phénomorphologiques. » Cela a été confirmé par l'ACP où nous avons remarqué que 85 % des thérophytes sont des herbacées annuelles avec un coefficient de corrélation de 0,857, en plus toutes les espèces ligneuses vivaces recensées sont des phanérophytes donnant un coefficient de corrélation de 0,991.

L'instabilité structurale du sol (substrat sablonneux) et les rigueurs climatiques favorisent l'installation et le développement des espèces à cycle de vie court aux dépens des ligneuses vivaces généralement plus exigeantes en besoins hydriques et trophiques (Stambouli 2010).

L'intervention de l'homme et de ses troupeaux exerce également une certaine influence sur la répartition des différentes classes des types morphologiques. Le Floc'h (2001) affirmait que les ovins et les caprins apprécient différemment les espèces classées par types morphologiques principaux (ligneuses dressées, herbacées vivaces, annuelles, etc.), les ovins apprécient les espèces annuelles alors que les caprins, au contraire, les consomment peu.

En plus, les résultats des traitements statistiques des données par l'AFC et la CAH ont pu fournir des informations complémentaires pour l'interprétation des résultats pédologiques et floristiques.

L'AFC a permis de mettre en évidence quatre grands ensembles répartis sur les deux côtés de l'axe 1. Le groupe 1 (Gr 1) nous a révélé les caractéristiques majeures du cortège floristique et de l'habitat de *Marrubium vulgare*. Ce dernier est marqué du point de vue floristique par la grande présence d'espèces à fréquence rare, la dominance des hémicryptophytes, l'absence des chamaephytes, la présence avec des proportions comparables des herbacées vivaces et annuelles. Biogéographiquement, c'est l'élément méditerranéen qui prédomine dans ce groupe. D'une façon générale, notre espèce se développe dans des garrigues à *Calycotome spinosa* Link., *Ampeledesma mauritanica* Bir., *Chaerops humilis* L. et à *Asphodelus microcarpus* Sal & Viv.

Pour les paramètres édaphiques, ce groupe est corrélé positivement au pH ( $R^2 = 0,88$ ), à la matière organique ( $R^2 = 0,61$ ), aux sables fins ( $R^2 = 0,69$ ), aux limons ( $R^2 = 0,77$ ) et au calcaire actif ( $R^2 = 0,75$ ). Cela peut s'expliquer par le développement de cette plante le plus

souvent à côté des terres cultivées où la matière organique est souvent importante. Elle est présente aussi dans des sols légers (sables fins et limons) avec une importante macroporosité et donc très perméables expliquant les faibles taux d'humidité mesurés. Ces sols sont aussi généralement légèrement alcalins et présentent des valeurs hétérogènes en calcaire actif.

À l'opposé, *Marrubium vulgare* est corrélé négativement à l'altitude ( $R^2 = -0,82$ ), à la pente ( $R^2 = -0,73$ ) et à l'humidité ( $R^2 = -0,67$ ), ceci est expliqué par le développement important de cette espèce aux basses et moyennes altitudes où la pente est souvent comprise entre 0 et 12 %, avec des taux d'humidité moins importants. En effet, cette espèce est souvent présente dans des stations ensoleillées (Quézel & Santa 1963), expliquant son importante répartition dans les stations du versant sud par rapport à celles du versant nord dans notre zone d'étude.

La classification hiérarchique ascendante a abouti à la catégorisation des stations échantillonnées en deux grands groupes selon leurs similarités. Il ressort de cette classification une grande hétérogénéité dans la structuration de notre site d'étude, traduisant sa diversité qui est due essentiellement aux différentes conditions écologiques : sol, type de végétation et paramètres stationnels. Ainsi, l'analyse en composantes principales a permis de tirer les grands traits de la biodiversité végétale des stations étudiées et de caractériser les corrélations entre les différentes variables floristiques.

## Conclusion

La caractérisation de l'habitat de *Marrubium vulgare* a fait ressortir que cette plante est associée à des garrigues à calycotome, à *Ampelodesma* de Mauritanie (diss), à palmier doum et à asphodèle. Il se développe à des altitudes comprises entre 600 et 900 m, avec une importante répartition dans le versant sud par rapport au versant nord, et dans des basses altitudes par rapport aux fortes. En ce qui concerne les paramètres édaphiques, *Marrubium vulgare* est lié à des sols légers, moyennement à fortement riches en matière organique, peu humides, à pH légèrement alcalin, fortement calcaires.

L'étude floristique par le biais de la méthode sigmatiste a permis de comptabiliser 72 espèces formant le cortège floristique accompagnant *Marrubium vulgare* et participant à l'importante richesse floristique du Djebel de Tessala.

L'étude de l'habitat de *Marrubium vulgare* telle qu'elle est présentée ici est cependant loin d'être exhaustive. En effet, elle doit être établie sur une période beaucoup plus étendue afin de mieux caractériser son cortège floristique et de nommer l'association végétale à laquelle elle appartient.

## Références

- Abdelguerfi A. & Laouar M., 1999. Autoécologie et variabilité de quelques légumineuses d'intérêt fourrager et/ou pastoral : possibilités de valorisation en région méditerranéenne. *Pastagens e Forragens* 20 : 81-112.
- Abi-Salah B., 1978. *Étude phytosociologique, phytodynamique et écologique des populations sylvatiques du Liban*. Thèse Droit Econom. Sci., Université Aix Marseille III, France, 184 p.
- Aidoud A., 1983. *Contribution à l'étude des écosystèmes steppiques du Sud Oranais. Phytomasse, productivité primaire et applications pastorales*. Thèse de doctorat, USTHB Alger, Algérie, 180 p.
- Ali Kouani S., El Jamali S. & Talbi M., 2007. *Analyse en composantes principales : une méthode factorielle pour traiter les données didactiques*. Faculté des sciences de Ben M'Sik, Université Hassane II, Radisma, Maroc, 2 : 1-18.
- Anderson D.M., 1988. Seasonal stocking of tabosa managed under continuous and rotation grazing. *Journal of Range Management* 1: 78-82.
- Aubert G., 1978. *Méthodes d'analyses des sols*. 2<sup>e</sup> édition, CNBP, Marseille, 199 p.
- Aubert G., 1989. *La classification des sols*. Document de travail n° 2, faculté Saint-Jérôme, Marseille, France, 6 p.
- Aubert G., 2003. *Biodiversité et processus écologique à l'interface sol-végétation dans les hêtraies sur limon de haute Normandie*. Thèse de doctorat, Université de Rouen, France, 59 p.
- Baraka D., 2008. *Inventaire et caractérisation des plantes médicinales de Djebel Tessala (Willaya de Sidi Bel Abbés)*. Mémoire de magister, Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbés, Algérie, 137 p.
- Barbero M. & Quézel P., 1976. Les groupements forestiers de Grèce centro-méridionale. *Ecol. Med.* 2 : 1-86.
- Barbero M., Bonin G., Loisel R. & Quézel P., 1989. *Sclerophyllus Quercus* forests of the mediterranean area: Ecological and ethological significance. *Biolefelder Okol Beiter* 4: 1-23.
- Barbero M., Loisiel R. & Quézel P., 1990. Les apports de la phyto-écologie dans l'interprétation des changements et perturbations induits par l'homme sur les écosystèmes forestiers méditerranéens. *Forêts méditerranéennes* 2 : 194-215.

- Benabadj N. & Bouazza N., 2001. L'impact de l'homme sur la forêt dans la région de Tlemcen. *Forêts méditerranéennes* 22 : 269-274.
- Benabdelli K., 1983. *Mise au point d'une méthodologie d'appréciation de l'action anthropozoogène sur la végétation de la région de Télagh (Algérie)*. Thèse de doctorat, Université Aix-Marseille, France, 183 p.
- Benabdelli K., 1996. *Aspects physionomico-structuraux et dynamique des écosystèmes forestiers face à la pression anthropozoogène dans les monts de Tlemcen et les monts de Dhaya (Algérie occidentale)*. Thèse de doctorat, Université Djillali Liabés, Sidi Bel Abbés, Algérie, 356 p.
- Benchiha W., 2012. *Contribution à l'étude de la flore méditerranéenne du Nord-Ouest de l'Algérie : cas des monts de Tessala*. Mémoire de magister, Université Djillali Liabés, Sidi Bel Abbés, Algérie, 115 p.
- Benyahia M., Benabdelli K. & Moueddene K., 2001. Géologie, pédologie et systèmes de production dans les monts de Tessala (Sidi Bel Abbés). *Revue des Sciences de la nature et de l'environnement (écosystems)* 1 : 70-75.
- Blanc L., 2000. *Données spatio-temporelles en écologie et analyses multitableaux : examen d'une relation*. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard, Lyon I, France. 266 p.
- Bonnier G., 1990. *La grande flore en couleur*. Édition Belin, tomes 1-2-3-4, Paris, France, 1 401 p.
- Bouzidi M.A., Latreche A., Attaoui I., Mehdadi Z. & Benyahia M., 2009. Caractérisation des matorrals et des garrigues à *Urginea pancracion* (steinh) phil. dans le djebel Tessala (Algérie occidentale). *Géographie physique et environnement* 3 : 131-149.
- Braun-Blanquet J., 1949. *Premier aperçu phytosociologique du Sahara tunisien*. Mémoire de la Société d'histoire naturelle d'Afrique du Nord, Alger, Algérie, 12 p.
- Braun-Blanquet J., 1952. *Phytosociologie appliquée*. Communication de Station internationale de géobotanique méditerranéenne et alpine, Montpellier, France : 156-161.
- Careme C., 1990. *Les adventices des cultures méditerranéennes en Tunisie : leurs plantules, leurs semences*. AGCD, Institut national de la recherche agronomiques, Publications agricoles, Tunis, 400 p.
- Cherifi K., Mehdadi Z., Latreche A. & Bachir Bouiadjara S.E., 2011. Impact de l'action anthropozoogène sur l'écosystème forestier du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Sécheresse* 22 : 197-206.
- Cibois P., 1983. *L'analyse factorielle*. Édition Que sais-je ?, 43 p.
- Daget P. & Poissonet J., 1991. *Prairies et pâturages : méthodes d'étude*. Institut de botanique, Montpellier, France, 354 p.
- Daget P. & Poissonet J., 1997. Biodiversité et végétation pastorale. *Rev. Élev. Méd. Vét. Pays Trop.* 50 : 141-149.
- Daget P. & Gaston A., 2001. La base FLOTROP et biodiversité des pâturages du Tchad oriental. *Systematics and Geography of Plants* 71 : 327-336.
- Dahmani-Megrerouche M., 1997. *Le chêne vert en Algérie : syntaxonomie, phytosociologie et dynamique des peuplements*. Thèse de doctorat, Université Houari Boumédiène, Alger, Algérie, 383 p.
- Dajoz R., 1982. *Précis d'écologie*. Gauthier, Villars, 503 p.
- De Bello F., Leps J. & Sebastia M.T., 2007. Grazing effects on the species-area relationship: Variation along a climatic gradient in NE Spain. *Journal of Vegetation Science* 18 : 25-34.
- Devineau J.L., 2001. Les espèces ligneuses indicatrices des sols dans les savanes et jachères de l'Ouest de Burkina Faso. *Phytocoenologia* 31 : 325-351.
- Djebaili S., 1984. *Steppe algérienne, phytosociologie et écologie*. OPU, Alger, Algérie, 171 p.
- Duby C. & Robin S., 2006. *Analyse en composantes principales*. Département OMP, Institut national agronomique, Paris, Grignon, 53 p.
- Ellenberg S. & Mueller P., 1968. A key of Raunkiaer plant use forms with revised. *Ber. Geobot. Inst. ETH. Stift. Rubel. Zurich* 37 : 56-73.
- Enriquez-Barroso A. & Gomez-Campo C., 1991. Les plantes endémiques de l'Afrique du Nord-Ouest (Maroc, Algérie, Tunisie). *Bot. Chron.* 10 : 517-520.
- Ferka-Zazou N., 2006. *Impact de l'occupation spatio-temporelle des espaces sur la conservation de l'écosystème forestier : cas de la commune de Tessala, wilaya de Sidi Bel Abbés, Algérie*. Mémoire de magister, Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie, 154 p.
- Floret C., Galan M.J., Le Floc'h E., Orshan G. & Romane F., 1990. Dynamics of holm oak (*Quercus ilex* L.) coppies after clear cutting in southern France. *Vegetation* 11 : 99-100.
- Gaujour E., Amiaud B., Fiorelli J.L., Mignolet C. & Coquil X., 2009. Effets de la dynamique des pratiques culturales lors de la conversion à l'agriculture biologique sur la végétation des prairies permanentes. *Innovations Agronomiques* 4 : 229-238.
- Gégout J.C., 1995. *Étude des relations entre les ressources minérales du sol et la végétation forestière dans les Vosges*. Thèse de doctorat, École nationale de génie rural, des eaux et des forêts, Nancy, France, 215 p.
- Gillet F., 2000. *Méthodes d'étude de la végétation*. Lab. écologie végétale et phytosociologie, Institut botanique universitaire, Neuchâtel, 142 p.
- Gomez-Campo C., 1985. *Plant conservation in the mediterranean area*. W. Junk Publisher, Dordrecht-Boston-Lancaster, 269 p.
- Gounot M., 1969. *Méthodes d'études quantitatives de la végétation*. Masson, vol 1, 314 p.
- Ghezlaoui B.E., Benabadj N., Aboura R., 2009. Approche floristique et physionomique des Atriplexaies au nord de Tlemcen (Ouest Algérie). *Mediterranea* 20 : 9-41.
- Ghezlaoui B.E., Benabadj N., Benmansour D. & Merzouk A., 2011. Analyse des peuplements végétaux halophytes dans le Chott El-Gharbi (Oranie-Algérie). *Acta Botanica Malacitana* 36 : 113-124.
- Guillerm J.L. & Maillet J., 1982. Western Mediterranean countries of Europe. In: Holzner W. & Numata M. (eds), *Biology and ecology of weeds*. The Hague: 227-243.
- Guinochet M., 1973. *Phytosociologie*. Masson, Paris, France, 227 p.
- Henaoui I.A., 2007. *Les cistes dans la région de Tlemcen : aspect écologique et cartographique*. Mémoire de magister, Université de Tlemcen, Algérie, 415 p.
- Huetz Delemps P., 1980. *La végétation de la terre*. Masson et C<sup>ie</sup>, Paris, France, 133 p.

- Jamagne M., 1967. Bases et techniques d'une cartographie des sols. In: Yvette Dewolf, *Annales de géographie*, vol. 78, 478 p.
- Jeanmonod D., Schlüssel A. & Gamisans J., 2011. Analyse de la flore Corse : aspects biologiques. *Candollea* 66 (1) : 5-25.
- Kazi Tani C., Le Bourgeois T. & Munoz F., 2010. Aspects floristiques de la flore des champs du domaine phytogéographique oranais (Nord-Ouest algérien) et persistance d'espèces rares et endémiques. *Flora Mediterranea* 20 : 5-22.
- Kiekken R., 1962. *Géologie et stratigraphie des monts de Tessala*. Floquet, Oran, Algérie, 220 p.
- Le Floc'h E., 2001. Biodiversité et gestion pastorale en zones arides et semi-arides méditerranéennes du Nord de l'Algérie. *Bocconea* 13 : 223-237.
- Ohba H. & Amirouche R., 2003. Observation of the Flora of Tadmait and Tidikelt, Central Sahara, Algeria. *Journal of Japanese Botany* 78: 104-111.
- Masharabu T., Noret N., Lejoly J., Bigendako M.J. & Bogaert J., 2010. Étude comparative des paramètres floristiques du Parc national de la Ruvubu, Burundi. *Geo-Eco-Trop.* 34 : 29-44.
- ONM, 2010. Organisation nationale de météorologie. Recueil des données climatiques de la wilaya de Sidi Bel Abbés. Feuilles de relevés quotidiens de la période 1980-2009, Alger, Algérie.
- Ouici H., 2011. *Inventaire et analyse de la biodiversité végétale du versant sud du mont de Tessala (Algérie occidentale)*. Mémoire de magister, Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbés, Algérie, 118 p.
- Ozenda P., 1985. *Flore du Sahara septentrional et centre*. CNRS, Paris, France, 441 p.
- Pouquet J., 1952. Les monts du Tessala (chaînes sud-telliennes d'Oranais). *Rev. géogr. Alpine* : 691-694.
- Quézel P., 1956. *Contribution à l'étude des forêts de chêne à feuilles caduques d'Algérie*. Mémoire de la Société d'histoire naturelle d'Afrique du Nord, Alger, nouvelle série I, 57 p.
- Quézel P. & Santa S., 1962. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. CNRS, tome I, Paris, France, 565 p.
- Quézel P. & Santa S., 1963. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. CNRS, tome II, Paris, France, 605 p.
- Quézel P., Barbero M., Benabid A., Loisel R. & Rivas Martinez S., 1988. Contribution à l'étude des groupements pré-forestiers et des matorrals rifains. *Ecologia mediterranea* (1-2) : 76-122.
- Raunkiaer C., 1934. *The life forms of plants and statistical plant*. Edition Clarendon Press, Oxford, 632 p.
- Rivas-Martinez S., 1982. Étages bioclimatiques, secteurs chronologiques et série de végétation de l'Espagne méditerranéenne. Groupements pré-forestiers et des matorrals rifains. *Ecologia mediterranea* 8 : 275-288.
- Romane F., 1987. *Efficacité de la distribution des formes de croissance pour l'analyse de la végétation à l'échelle régionale*. Thèse de doctorat, Marseille, France, 195 p.
- Stambouli H., 2010. *Contribution à l'étude des groupements à psammophytes de la région de Tlemcen (Algérie occidentale)*. Thèse de doctorat, Université Abu Bakr Belkaid, Tlemcen, Algérie, 201 p.
- Talbi D., Ferka-Zazou N. & Benabdeli K., 2011. Caractérisation pédologique et édaphique des sols argileux et analyse de leur occupation dans la région de Tessala (Algérie occidentale). *Mediterranea* 22 : 251-277.
- Wesemael B. & Brahy V., 2012. *La matière organique dans les sols*. Rapport sur l'état de l'environnement de Wallon, les indicateurs clés de l'environnement Wallon. Chapitre 11 : Les sols et l'environnement terrestre, SPW édition : 469-475.

## Publication N° 2

**Karim BOUTERFAS**, Zoheir MEHDADI, Ali LATRECHE et Linda AOUAD. Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale). **Revue Phytothérapie, Springer-Verlag France, 2014, Vol. 12, N°1 : 6-14.** ISSN : 1765-2847.

Site : <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10298-014-0830-6>.

## Article original

### Pharmacognosie

# Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale)

K. Bouterfas<sup>1</sup>, Z. Mehdadi<sup>1</sup>, A. Latreche<sup>1</sup>, L. Aouad<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de biodiversité végétale : conservation et valorisation, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Djillali-Liabès, BP 89, Haï Larbi Ben M'Hidi, Sidi Bel Abbès, 22000, Algérie

<sup>2</sup>Laboratoire de synthèse de l'information environnementale, faculté de médecine, université Djillali-Liabès, Sidi Bel Abbès, 22000, Algérie

Correspondance : bouterfas\_karim@yahoo.fr

**Résumé :** Cinq extraits flavonoïques obtenus des feuilles de *Marrubium vulgare* L. ont été testés sur quatre souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 1306 et *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) et deux souches fongiques (*Penicillium digitatum* ATCC 201167 et *Aspergillus niger* ATCC 16404). Ils présentent un remarquable effet antibactérien sur les bactéries Gram+ et une activité antifongique modérée. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) varient entre 6,25 et 50 µg/ml en fonction de l'extrait flavonoïque et de la souche microbienne. Le screening phytochimique et la chromatographie sur couche mince (CCM) ont révélé l'existence de certaines classes flavonoïques qui pourraient être responsables du pouvoir antimicrobien de *Marrubium vulgare* L.

**Mots clés :** Pouvoir antimicrobien – Flavonoïdes – *Marrubium vulgare* L. – Screening phytochimique – CCM – CMI

## Antimicrobial Power of the Flavonoids Extracted from the Leaves of *Marrubium vulgare* L. Coming from the Mount of Tessala (Western Algeria)

**Abstract:** Five flavonoid extracts obtained from the leaves of *Marrubium vulgare* L. were tested on four bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 1306 and *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) and two fungal strains (*Penicillium digitatum* ATCC 201167 and *Aspergillus niger* ATCC 16404). They present a remarkable antibacterial effect on the Gram+ bacteria and a moderate antifungal activity. The minimal inhibitory concentrations (MICs) vary between 6.25 and 50 µg/ml according to the flavonoid extract and microbial strain. The phytochemical screening and the thin layer chromatography (TLC) showed the existence of some classes of flavonoids being able

to be responsible for the antimicrobial power of *Marrubium vulgare* L.

**Keywords:** Antimicrobial power – Flavonoids – *Marrubium vulgare* L. – Phytochemical screening – TLC – MIC

## Introduction

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est une pratique courante depuis des millénaires ; ce phénomène a eu un regain d'intérêt avec les premières recherches sur les propriétés antimicrobiennes des plantes utilisées en médecine traditionnelle, donnant une base scientifique à ces pratiques empiriques [24].

Les plantes de la famille des Lamiacées sont réputées actives contre une variété de micro-organismes par leurs composés phénoliques [46]. C'est le cas du marrube blanc ou marrube commun, *Marrubium vulgare* L., herbacée vivace assez commune dans la région méditerranéenne, de 30 à 80 cm de hauteur, d'aspect blanchâtre, à petites fleurs blanches, à odeur pénétrante légèrement musquée et à saveur chaude et amère. Cette plante est traditionnellement utilisée pour le traitement de divers maux : sifflements respiratoires, maladies urinaires, otites, ophtalmies [4]. En Algérie, le marrube blanc est utilisé en médecine folklorique contre la diarrhée, le diabète, le rhumatisme, le rhume et les douleurs respiratoires [3].

Sur le plan chimique, *Marrubium vulgare* L. est riche en diterpènes [14], en phényléthanoïdes glucosidiques [43], en tanins [21], en saponins [21] et en flavonoïdes [38] ; on lui reconnaît des propriétés antioxydantes [27,40], hypoglycémiantes [52] et antidiabétiques [7], analgésiques [12,29] et anti-inflammatoires [44].

En ce qui concerne les propriétés antimicrobiennes de *Marrubium vulgare* L., plusieurs travaux ont été focalisés surtout sur l'effet de ses huiles essentielles [56]. Dans d'autres études, l'activité antimicrobienne est déterminée sur des extraits obtenus en utilisant des solvants à différentes polarités : acétone [31], éthanol [15,33,46], méthanol [15,19,31,34,55], hexane [31] et l'eau [15,31,55].

Cependant, le pouvoir antimicrobien des flavonoïdes de *Marrubium vulgare* L. n'a pas été encore élucidé. C'est ce qui nous a incités, à travers ce travail, à l'évaluer à partir d'extraits de feuilles de *Marrubium vulgare* L. croissant en Algérie et particulièrement dans le mont de Tessala (Algérie occidentale).

## Matériel et méthodes

### Matériel biologique

L'identification botanique de la plante *Marrubium vulgare* L. a été faite par M. Mehdadi Zoheir, professeur au département des sciences de l'environnement, université Djillali-Liabès, Sidi Bel Abbès, Algérie. Un spécimen a été conservé au laboratoire de biodiversité végétale : conservation et valorisation.

Des feuilles de *Marrubium vulgare* L. ont été récoltées en novembre 2012 dans le mont de Tessala (Algérie occidentale). Elles ont été lavées à l'eau distillée, séchées à l'air libre et à l'ombre pendant une dizaine de jours puis broyées avec un broyeur à couteau muni d'un filtre à mailles.

Les souches microbiennes proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection) : quatre bactériennes (Gram- : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 et *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram+ : *Bacillus cereus* ATCC 1306 et *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) et deux fongiques (*Penicillium digitatum* ATCC 201167 et *Aspergillus niger* ATCC 16404). Nous avons utilisé le milieu Mueller-Hinton (MH) pour la culture des bactéries et l'oxytétracycline-glucose-agar (OGA) pour les champignons.

### Extraction des flavonoïdes

Les feuilles broyées ont été macérées dans un mélange méthanol/eau (7/3 : v/v) avec un rapport 1/10 (masse/v), sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est filtré sous vide, et le méthanol est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif. L'extrait obtenu correspond à l'extrait brut (EBr) des feuilles. Cinquante millilitres de cet extrait ont été congelés puis lyophilisés afin de déterminer le rendement d'extraction [26,28].

L'EBr restant a été extrait par l'hexane (1/1, v/v) plusieurs fois jusqu'à ce que la phase hexanique devienne transparente. Après évaporation à sec à l'évaporateur rotatif, on obtient un extrait hexanique (EHx). La phase aqueuse est ensuite extraite plusieurs fois par le chloroforme puis par l'acétate d'éthyle pour donner les extraits ECh et EAc. Ces

deux extraits sont évaporés à sec à l'évaporateur rotatif. Cinquante millilitres de chaque extrait concentré (EHx, ECh, EAc et la phase aqueuse résiduelle EAq) ont été congelés puis lyophilisés afin de déterminer les rendements d'extraction. Tous les lyophilisats ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leurs utilisations.

### Rendements en flavonoïdes

Les différents extraits obtenus après lyophilisation sont pesés pour déterminer le poids sec résultant. Les rendements ont été rapportés à 100 g de poudre de feuilles.

### Screening phytochimique

Les tests phytochimiques des différents extraits obtenus sont réalisés à base de précipitations ou de colorations caractéristiques en vue de s'assurer de la présence des flavonoïdes et de mettre en évidence des groupements chimiques qui peuvent être présents dans ces extraits flavonoïques. Les essais sont effectués selon les protocoles décrits par Dohou et al. [13] et Senhadji et al. [47] ; ils sont réalisés soit sur les extraits (polyphénols, flavonoïdes, tanins et saponosides), soit sur les infusés à 10 % (coumarines, flavanes, flavanols, anthocyanes et proanthocyanidols), soit sur les lyophilisats (substances stéroïques et alcaloïdes). La recherche des groupes chimiques a été déterminée par des réactions en tubes à essai.

### Tests antimicrobiens

#### Tests de sensibilité : technique de diffusion en milieu solide

La solubilisation des lyophilisats obtenus est faite dans le diméthylformamide (DMF) pur. Des essais témoins sont effectués in vitro pour le DMF pur vis-à-vis de chaque type de souche microbienne. Pour cela, nous n'avons enregistré aucune inhibition de la croissance pour l'ensemble des souches bactériennes et fongiques.

Pour la préparation des différentes concentrations d'extraits flavonoïques, 1 mg de chaque extrait lyophilisé (EBr, EHx, ECh, EAc et EAq) est introduit dans un tube à essai auquel 10 ml de DMF pur sont ajoutés. Les tubes sont agités au vortex jusqu'à dissolution totale de l'extrait. Pour les cinq extraits, une solution mère à 100  $\mu\text{g/ml}$  a été préparée. Les solutions mères sont diluées progressivement dans le DMF pur afin d'avoir, pour chaque extrait, une gamme de solutions ayant des concentrations de 20, 40, 60 et 80  $\mu\text{g/ml}$ . Ces quatre solutions plus les solutions mères sont utilisées pour la détermination de leurs activités antibactériennes et antifongiques.

Le test de la sensibilité des bactéries et des champignons est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, encore appelée méthode des disques [9,11]. Dans des boîtes de Petri stériles, 20 ml de gélose (MH) sont coulés et laissés pendant 20 minutes pour se solidifier. Sur ce milieu de

culture, 1 ml de suspension bactérienne a été disposé et ensemencé sur toute la surface. Des disques en papier Whatman n° 1 de 6 mm de diamètre sont autoclavés puis imprégnés de chaque concentration (20, 40, 60, 80 et 100 µg/ml) et disposés à la surface du milieu solidifié. Les boîtes de Petri ont été incubées dans une étuve, 24 à 48 heures, à 37 °C. La détermination de l'activité antibactérienne a été estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, induit par les concentrations des différents extraits.

Pour le test antifongique, il est accompli en suivant les mêmes étapes du test antibactérien et en utilisant l'OGA comme milieu de culture [42].

Des antibiotiques témoins ont été utilisés (kanamycine à 30 µg/ml, ampicilline à 10 µg/ml et pipéracilline à 100 µg/ml) ainsi que des antifongiques (amphotéricine B1 à 100 µg/ml, amphotéricine B2 à 50 µg/ml, amphotéricine B3 à 20 µg/ml et nitrate d'éconazole à 20 µg/ml).

Chaque expérience est répétée trois fois, en même temps et au même endroit.

La catégorisation des souches bactériennes et fongiques par l'antibiogramme, l'antifongigramme et vis-à-vis des extraits flavonoïques s'effectue comme suit [6,10] : souches sensibles + ( $10 \text{ mm} \leq \text{Ø} \leq D$ ) ; souches intermédiaires ± ( $d \leq \text{Ø} < 10 \text{ mm}$ ) et souches résistantes - ( $\text{Ø} < d$ ).  $D$  : étant le diamètre critique haut (le plus grand diamètre atteint par la souche),  $d$  : diamètre critique bas (le plus petit diamètre atteint par la souche) et  $\text{Ø}$  : diamètre de la zone d'inhibition. Ainsi, les souches microbiennes testées et les extraits flavonoïques utilisés sont classés respectivement selon leurs sensibilités et leurs effets, exprimés en pourcentage (%).

#### Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI est faite en utilisant la méthode de microdilution en milieu gélosé [5,54] à partir d'une gamme de concentrations de l'extrait flavonoïque. Elle est réalisée seulement pour les extraits flavonoïques les plus actifs constatés lors des tests de sensibilité en milieu solide, ce choix est arbitraire ( $\text{Ø} \geq 16 \text{ mm}$ ). Une série de dilutions à raison géométrique de 2 sont réalisées à partir d'une solution mère de 100 µg/ml de chaque extrait flavonoïque préparé dans le DMF pur. Ces concentrations sont de 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 et 3,12 µg/ml.

Deux millilitres de chaque dilution sont alors incorporés à 38 ml de milieu MH (bactéries) ou d'OGA (champignons). Les mélanges sont immédiatement répartis dans deux boîtes de Petri à raison de 20 ml de milieu par boîte. Après solidification, l'inoculation des géloses, contenant l'extrait ou non (témoin), est effectuée en surface sous forme de quatre (pour les bactéries) ou cinq (pour les champignons) dépôts de 1 µl de chaque souche microbienne. Après incubation à 35 °C pendant six jours, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance bactérienne ou fongique n'est visible comparativement au témoin sans extrait flavonoïque.

#### Séparation des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les extraits flavonoïques et cinq témoins (rutine, apigénol, quercétol, kaempférol et catéchine) ont été chromatographiés sur couche mince de gel de silice sur des plaques en aluminium (20 × 20 cm). Une bonne séparation des taches a été obtenue avec le système de solvants chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique (5/4/1) [41]. Les chromatogrammes ont été observés à 254 nm en chambre noire et les rapports frontaux ont été calculés.

## Résultats

### Rendements en extraits flavonoïques

Les extraits flavonoïques obtenus présentent différents aspects : pâteux, huileux et poudreux, de diverses couleurs : vert foncé, marron clair, vert jaunâtre et vert clair.

EBr représente 32,5 % du poids de matière sèche des feuilles, suivi d'EHx (13,5 %), d'EAc (12,5 %), d'ECh (10,5 %) et d'EAq (7 %). Par rapport à l'EBr, les rendements sont de 41,53, 38,46, 32,31 et 21,53 % respectivement pour EHx, EAc, ECh et EAq.

### Screening phytochimique

Les polyphénols et les flavonoïdes sont présents dans tous les extraits ; l'EBr est le seul extrait qui contient des tanins condensés et hydrolysables ; les flavanols sont présents dans l'EBr, l'EHx et l'ECh ; les flavanes sont présents dans l'EBr, l'EHx et l'EAc. Par contre, les saponines, les alcaloïdes, les anthocyanes, les substances stéroliques, les proanthocyanidols et les coumarines sont absents dans tous les extraits (Tableau 1).

### Tests antimicrobiens

L'utilisation des antibiotiques et des antifongiques commercialisés a induit sur les souches microbiennes utilisées des zones d'inhibition (Tableau 2), dont les diamètres permettent d'établir un antibiogramme et un antifongigramme, à partir desquels sont classées les souches microbiennes selon leur sensibilité.

Les souches microbiennes choisies ne manifestent aucune résistance vis-à-vis des antifongiques et des antibiotiques commercialisés. Elles sont soit intermédiaires, soit sensibles, en enregistrant des diamètres d'inhibition compris entre 5,6 et 37,6 mm.

EBr et EHx sont les extraits flavonoïques les plus actifs (Tableau 3), induisant respectivement des diamètres d'inhibition maximum de 31,6 et 24 mm sur *Bacillus cereus*, 27 et 29,6 mm sur *Staphylococcus aureus* (Fig. 1). Les extraits restants manifestent une activité beaucoup moins importante, excepté les effets de l'EAq et de l'EAc sur *Bacillus cereus* qui induisent des diamètres d'inhibition respectivement de 17,6

**Tableau 1.** Screening phytochimique des extraits flavonoïques.

Composés caractérisés	Extraits flavonoïques				
	EBr	ECh	EAc	EAq	EHx
Polyphénols	+++	+++	+++	+++	+++
Flavonoïdes	+++	+++	+++	+++	+++
Tanins condensés	+	-	-	-	-
Tanins hydrolysables	+	-	-	-	-
Saponines	-	-	-	-	-
Composés stéroïques	-	-	-	-	-
Flavanes	+++	-	+++	-	+++
Anthocyanes	-	-	-	-	-
Flavanols	+++	+++	-	-	+++
Proanthocyanidols	-	-	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	-	-	-
Coumarines	-	-	-	-	-

+++ : réaction franchement positive ; + : réaction positive ; - : réaction négative.

**Tableau 2.** Diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne  $\pm$  écart-type) et sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques commercialisés.

Diamètres des zones d'inhibition et sensibilité									
Antibiotiques ( $\mu\text{g/ml}$ )		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
		D	S	D	S	D	S	D	S
PIP	100	24,3 $\pm$ 1,5	+	37,6 $\pm$ 1,5	+	30,3 $\pm$ 1,5	+	25 $\pm$ 2,6	+
AMP	10	5,6 $\pm$ 1,5	$\pm$	6,3 $\pm$ 1,1	$\pm$	5,6 $\pm$ 1,1	$\pm$	17,6 $\pm$ 1,1	+
K	30	7,6 $\pm$ 0,5	$\pm$	15,6 $\pm$ 2,0	+	21,3 $\pm$ 2,0	+	16 $\pm$ 1,7	+
Antifongiques ( $\mu\text{g/ml}$ )		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium digitatum</i>					
		D	S	D	S	D	S	D	S
AMB1	100	6,3 $\pm$ 1,1		$\pm$		8,0 $\pm$ 1,0	$\pm$		
AMB2	50	22,6 $\pm$ 2,0		+		20,6 $\pm$ 2,0	+		
AMB3	20	7,0 $\pm$ 2,0		$\pm$		7,3 $\pm$ 0,5	$\pm$		
N	20	35,3 $\pm$ 3,5		+		37,6 $\pm$ 1,5	+		

AMP : ampicilline ; K : kanamycine ; PIP : pipéracilline ; AMB1 : amphotéricine B1 ; AMB2 : amphotéricine B2 ; AMB3 : amphotéricine B3 ; N : nitrate d'éconazole ; D : diamètre de la zone d'inhibition ; S : sensibilité ; + : sensible ;  $\pm$  : intermédiaire.

et 17,3 mm. Il est à noter aussi que les diamètres d'inhibition maximum enregistrés sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* ne dépassent pas les 18 mm.

Concernant l'activité antifongique (Tableau 3), les diamètres obtenus sont inférieurs à ceux enregistrés lors de l'activité antibactérienne. EBr et EHx restent toujours les deux extraits flavonoïques les plus actifs en induisant des diamètres d'inhibition respectivement de 19,3 et 17,3 mm sur *Penicillium digitatum*.

L'activité inhibitrice la plus forte est enregistrée par l'EBr et l'EHx sur *Bacillus cereus* (CMI = 6,25  $\mu\text{g/ml}$ ). Une CMI de 25  $\mu\text{g/ml}$  est enregistrée par l'EHx sur *Staphylococcus aureus*. Toutes les autres CMI sont évaluées à 50  $\mu\text{g/ml}$ , c'est le cas de l'EBr sur *Pseudomonas aeruginosa*, l'EAc et l'EAq sur *Bacillus cereus*, l'EBr et l'EAq sur *Staphylococcus aureus*, l'EBr et l'EHx sur *Escherichia coli* et *Penicillium digitatum* (Tableau 3).

Les extraits flavonoïques et les souches microbiennes choisis sont classés respectivement selon leurs effets et sensibilités (Tableau 4).

Les effets des extraits flavonoïques sont hétérogènes. EHx et EBr sont les plus actifs avec 60 et 50 % de tests sensibles respectivement pour l'activité antibactérienne, 30 et 40 % de tests sensibles respectivement pour l'activité antifongique.

Pour les souches microbiennes utilisées, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* sont les plus résistantes avec respectivement 64 et 56 % des tests. Les champignons montrent une grande résistance enregistrant des taux de 72 % des tests pour *Aspergillus niger* et 56 % pour *Penicillium digitatum*.

### CCM

EBr et EHx présentent les plus grands nombres de spots avec sept et cinq respectivement. Viennent ensuite EAc et ECh

Tableau 3. Diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne  $\pm$  écart-type), concentrations minimales inhibitrices ( $\mu\text{g/ml}$ ) et sensibilité des souches microbiennes.

Extraits flavo- noïques	Diamètres des zones d'inhibition (en mm), concentrations minimales inhibitrices (en $\mu\text{g/ml}$ ) et sensibilité des souches												
	Bactéries						Champignons						
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium digitatum</i>		
	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	
EBr	100	16,0 $\pm$ 1,0	+	31,6 $\pm$ 2,5	+	27,0 $\pm$ 2,0	+	16,0 $\pm$ 1,7	+	15,6 $\pm$ 2,0	+	19,3 $\pm$ 1,5	+
	80	11,6 $\pm$ 1,1	+	20,0 $\pm$ 1,7	+	18,0 $\pm$ 1,0	+	11,6 $\pm$ 1,1	+	12,6 $\pm$ 1,1	+	12,3 $\pm$ 1,5	+
	60	7,6 $\pm$ 0,5	$\pm$	15,6 $\pm$ 1,1	+	9,3 $\pm$ 2,1	$\pm$	8,3 $\pm$ 1,1	$\pm$	9,6 $\pm$ 1,1	$\pm$	7,6 $\pm$ 1,1	$\pm$
	40	0	-	12,3 $\pm$ 1,5	+	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	8,3 $\pm$ 1,5	$\pm$	0	-	0	-	0	-	0	-
EHx	100	15,3 $\pm$ 1,5	+	24,0 $\pm$ 4,5	+	29,6 $\pm$ 1,5	+	18,0 $\pm$ 1,0	+	13,3 $\pm$ 2,0	+	17,3 $\pm$ 2,0	+
	80	11,3 $\pm$ 1,5	+	22,3 $\pm$ 1,5	+	23,6 $\pm$ 1,5	+	15,3 $\pm$ 1,5	+	8,0 $\pm$ 1,7	-	10,33 $\pm$ 1,1	+
	60	0	-	17,3 $\pm$ 2,0	+	12,0 $\pm$ 1,0	+	10,0 $\pm$ 1,0	+	0	-	7,6 $\pm$ 1,1	$\pm$
	40	0	-	11,6 $\pm$ 1,1	+	8,6 $\pm$ 1,5	$\pm$	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	5,3 $\pm$ 1,5	$\pm$	0	-	0	-	0	-	0	-
ECh	100	12,3 $\pm$ 2,0	+	13,6 $\pm$ 1,5	+	11,0 $\pm$ 1,0	+	14,3 $\pm$ 0,5	+	11,6 $\pm$ 2	+	15,33 $\pm$ 1,5	+
	80	8,6 $\pm$ 1,5	$\pm$	9,3 $\pm$ 1,5	+	7,6 $\pm$ 0,5	$\pm$	11,3 $\pm$ 0,5	+	0	-	10,6 $\pm$ 1,5	+
	60	0	-	6,3 $\pm$ 1,1	$\pm$	0	-	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
EAc	100	11,0 $\pm$ 1,0	+	17,3 $\pm$ 2,0	+	15,3 $\pm$ 2,3	+	11,3 $\pm$ 1,5	+	9,6 $\pm$ 1,1	+	13,0 $\pm$ 1,7	+
	80	0	-	13,6 $\pm$ 1,5	+	12,0 $\pm$ 1,7	+	0	-	0	-	8,3 $\pm$ 1,1	$\pm$
	60	0	-	10,3 $\pm$ 1,5	+	8,6 $\pm$ 1,5	$\pm$	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
EAq	100	12,3 $\pm$ 1,1	+	17,6 $\pm$ 1,1	+	16,6 $\pm$ 1,5	+	13,3 $\pm$ 1,1	+	10,3 $\pm$ 1,5	+	11,3 $\pm$ 2,5	+
	80	0	-	13,3 $\pm$ 2,0	+	11,6 $\pm$ 1,1	+	10,6 $\pm$ 1,1	+	0	-	0	-
	60	0	-	11,0 $\pm$ 2,6	+	8,0 $\pm$ 1,7	$\pm$	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-

- : résistante ; + : sensible ;  $\pm$  : intermédiaire.

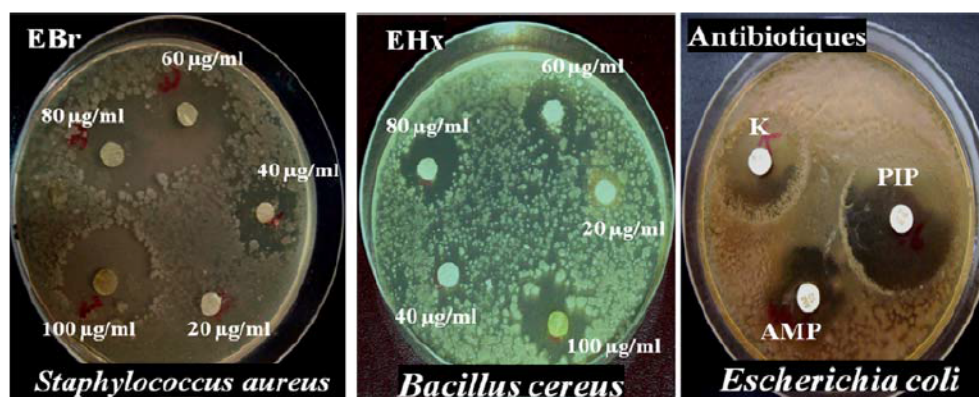


Fig. 1. Effets inhibiteurs de l'EBr, de l'EHx et des antibiotiques vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, de *Bacillus cereus* et d'*Escherichia coli*

Tableau 4. Classement des extraits flavonoïques selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités.

		Sensibilité							
		Résistante (-)		Intermédiaire (±)		Sensible (+)		Totaux	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Type du test et de souches	Extraits								
Test antibactérien	EBr	6	30	4	20	10	50	20	100
	EHx	6	30	2	10	12	60	20	100
	ECh	11	55	3	15	6	30	20	100
	EAc	12	60	1	5	7	35	20	100
	EAq	11	55	1	5	8	40	20	100
Test antifongique	EBr	4	40	2	20	4	40	10	100
	EHx	6	60	1	10	3	30	10	100
	ECh	7	70	0	0	3	30	10	100
	EAc	7	70	1	10	2	20	10	100
	EAq	8	80	0	0	2	20	10	100
Bactéries	<b>Souches microbiennes</b>								
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	64	2	8	7	28	25	100
	<i>Bacillus cereus</i>	6	24	3	12	16	64	25	100
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	40	5	20	10	40	25	100
	<i>Escherichia coli</i>	14	56	1	4	10	40	25	100
Champignons	<i>Aspergillus niger</i>	18	72	1	4	6	24	25	100
	<i>Penicillium digitatum</i>	14	56	3	12	8	32	25	100

N : nombre de tests.

avec quatre spots chacun, tandis que trois spots seulement sont mis en évidence chez EAq. Avec un rapport frontal (Rf : 0,24), la catéchine est probablement présente dans EHx, le quercétol (Rf : 0,30) dans EBr. Les autres spots ne correspondent à aucun des témoins utilisés.

## Discussion

L'EBr représente le meilleur rendement en flavonoïdes, il est suivi respectivement par l'EHx, l'extrait d'acétate d'éthyle,

l'extrait chloroformique et l'extrait aqueux. Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement d'extraction n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques de l'espèce utilisée, à la nature des organes pour une même espèce [8], à l'origine géographique [36], aux conditions de récolte [23] et aux méthodes d'extraction appliquées [26].

Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait en préservant la bioactivité de ses constituants. De même, le

déroulement de cette extraction à température ambiante, ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite, permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leurs dénaturations ou modifications probables dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

EBr est le seul extrait qui contient des composés autres que les flavonoïdes, à savoir les tanins condensés et hydrolysables. Cela peut être expliqué par le solvant utilisé pour l'extraction, qu'est le méthanol. Ce dernier étant le plus polaire par rapport aux autres solvants utilisés, et caractérisé par une bonne solubilité pour les composés, permet ainsi d'extraire, en plus des flavonoïdes hétérosides, de nombreux principes actifs appartenant à plusieurs classes chimiques (alcoïdes, tanins, acides aminés, etc.) [49]. Des résultats ont prouvé que le méthanol était le meilleur solvant utilisé pour extraire les composés phénoliques, suivi par l'éthanol et finalement par l'eau [30]. Les autres solvants organiques étant moyennement polaires (chloroforme et acétate d'éthyle) et apolaires (hexane) permettent de séparer les composés de l'EBr selon leurs structures chimiques. Ces solvants permettent d'extraire des composés tels que les flavonoïdes aglycones et quelques hétérosides (flavanes, flavanols et anthocyanes) [49].

Les souches bactériennes testées sont toutes sensibles à la pipéracilline. Cette sensibilité est due au fait que cet antibiotique a un large spectre d'action, agissant préférentiellement sur les bactéries Gram+ que sur les bactéries Gram- [39]. Cela est étayé par les diamètres d'inhibition constatés sur *Staphylococcus aureus* (30,3 mm) et *Bacillus cereus* (37,6 mm) par rapport à *Escherichia coli* (25 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (24,3 mm). Les bactéries testées se sont montrées sensibles à la kanamycine, excepté *Pseudomonas aeruginosa* qui s'en est révélée intermédiaire. Cela trouve probablement son explication dans le fait que cette bactérie possède une résistance naturelle à cet antibactérien [2,53]. L'ampicilline a généralement un spectre élargi sur les bactéries Gram- et limité sur les bactéries Gram+ [22], raison pour laquelle la sensibilité de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus* vis-à-vis de cet antibiotique est intermédiaire. *Escherichia coli* est sensible à l'égard de l'ampicilline, alors que *Pseudomonas aeruginosa* présente une sensibilité intermédiaire due à sa résistance naturelle à l'ampicilline [35].

*Aspergillus niger* et *Penicillium digitatum* sont sensibles au nitrate d'éconazole, ce qui est vérifié dans les travaux de Guibaud [17]. Elles sont également sensibles à l'amphotéricine B2 (50 µg/ml) dont le spectre d'activité s'étend à la plupart des champignons saprophytes et pathogènes. La sensibilité des deux champignons testés est intermédiaire vis-à-vis de l'amphotéricine B1 (100 µg/ml) et de l'amphotéricine B3 (20 µg/ml). Cette différence de sensibilité s'explique par la concentration de l'amphotéricine B.

L'activité antibactérienne des extraits flavonoïques et les tests de sensibilité réalisés permettent de classer les extraits flavonoïques selon leurs effets. EHx et EBr sont les extraits les plus actifs puisqu'ils induisent chez les souches bactériennes des taux de sensibilité respectivement de 60 et

50 %. EBr a entraîné des zones d'inhibition importantes sur *Bacillus cereus* (15,6, 20 et 31,6 mm), *Staphylococcus aureus* (18 et 27 mm) et, à un degré moindre, sur *Escherichia coli* (11,6 et 16 mm). EHx est actif sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, donnant des diamètres compris entre 5,3 et 29,6 mm, tandis qu'il est moins actif sur *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition maximal de 18 mm. Cependant, ces deux extraits sont beaucoup moins actifs sur *Pseudomonas aeruginosa* enregistrant des diamètres d'inhibition ne dépassant pas les 16 mm.

EAc ayant induit un pourcentage de sensibilité de 40 % chez les bactéries testées présente un effet modéré ou acceptable sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, se traduisant par des diamètres d'inhibition situés entre 8 et 17,6 mm.

EAc est moyennement actif par rapport aux extraits précédents en procurant un taux de sensibilité de 35 % chez les souches bactériennes utilisées, se traduisant par des auréoles ne dépassant pas les 17,3 mm. Cependant, ECh est le moins actif parmi les extraits flavonoïques avec un taux de sensibilité de 30 % et des diamètres d'inhibition ne dépassant pas les 14,3 mm.

Par ailleurs, sur l'ensemble des extraits flavonoïques, les bactéries Gram+ sont plus sensibles que les bactéries Gram-. En effet, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* présentent des taux de sensibilité respectivement de 64 et 40 % par rapport à *Escherichia coli* (40 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (28 %). Plusieurs travaux mettent en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram+ par rapport aux bactéries Gram- [18,20,48,50]. Cela peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram- par rapport aux bactéries Gram+. En effet, les bactéries Gram- possèdent une couche additionnelle à la membrane externe, composée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides, formant une barrière imperméable à la plupart des molécules hydrophobes [16].

En comparant les résultats de l'activité antibactérienne des extraits testés avec ceux de l'antibiogramme, il ressort que les diamètres des zones d'inhibition fournis par les extraits flavonoïques vis-à-vis des souches bactériennes Gram+ sont plus ou moins comparables à ceux engendrés par les antibiotiques utilisés. À titre d'exemple, l'effet de la pipéracilline (100 µg/ml) est presque identique à celui de l'EBr (100 µg/ml) contre *Bacillus cereus*, donnant des diamètres d'inhibition respectifs de 37,6 et 31,6 mm. Par contre, chez les bactéries Gram-, les diamètres induits par les différents extraits flavonoïques restent inférieurs à ceux donnés par les antibiotiques.

Les extraits flavonoïques de *Marrubium vulgare* sont plus efficaces sur les bactéries que sur les champignons testés. En effet, vis-à-vis de ces extraits, *Aspergillus niger* et *Penicillium digitatum* manifestent des taux de résistance de 72 et 56 %. Néanmoins, quelques zones d'inhibition modérées, dont les diamètres sont compris entre 7,6 et 19,3 mm, sont enregistrées par EBr et EHx sur *Penicillium digitatum*. Ces diamètres restent toutefois moins importants par rapport à ceux fournis par l'antifongogramme.

Globalement, les diamètres des zones d'inhibition enregistrés par les extraits flavonoïques sont proportionnels à leurs concentrations. Nous avons remarqué que la majorité des extraits flavonoïques testés sont inactifs à de faibles concentrations (20 et 40 µg/ml), excepté l'effet de l'EBr et de l'EHx vis-à-vis de *Bacillus cereus*, et l'effet de l'EHx chez *Staphylococcus aureus*.

Les CMI enregistrées par tous les extraits flavonoïques (excepté l'ECh) vis-à-vis de toutes les souches microbiennes testées (sauf *Aspergillus niger*) varient entre 6,25 et 50 µg/ml. Selon la classification faite par Aligiannis et al. [1], cette inhibition est forte (CMI < 500 µg/ml).

La CCM a permis de séparer quantitativement (nombre de constituants) et qualitativement (identification des composés flavonoïques), caractérisant les différents extraits, comme la catéchine dans EHx et le quercétol dans EBr. La présence de ces deux types de flavonoïdes connus pour leurs activités pharmacologiques [48] est probablement à l'origine des différentes vertus médicinales attribuées à *Marrubium vulgare*.

Enfin, il est à noter que les différences trouvées dans l'évaluation du pouvoir antibactérien et antifongique des différents extraits peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que la nature de l'espèce, les conditions ambiantes, les facteurs écologiques, les variations saisonnières, les méthodes d'extraction [11,32,45,50], la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, la sensibilité des bactéries, la concentration de l'extrait [25,51] et l'organe de la plante utilisé [37].

## Conclusion

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L., plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle dans de nombreux pays au monde.

À la lumière des résultats obtenus, il ressort que les extraits flavonoïques de *Marrubium vulgare* L. exercent des effets antibactériens et antifongiques sur les souches microbiennes testées. Ces effets varient en fonction du type d'extrait flavonoïque et de ses concentrations, de la résistance ou la sensibilité des souches utilisées. L'EBr et l'EHx se sont avérés de bons bactériostatiques et fongostatiques enregistrant des diamètres d'inhibition allant de 5,3 à 31,6 mm, ce qui a produit des taux de sensibilité variant entre 30 à 60 % chez les souches microbiennes étudiées. Les CMI enregistrées justifient, d'une part, l'importante activité antimicrobienne des flavonoïdes du marrube blanc et, d'autre part, son efficacité thérapeutique.

Par ailleurs, le screening phytochimique et la CCM ont permis d'apporter un complément sur le profil phytochimique de l'espèce étudiée, marqué par la présence de deux classes flavonoïques, la catéchine et le quercétol, qui seraient responsables du pouvoir antimicrobien du marrube blanc.

Ces résultats confortent l'utilisation du marrube blanc en médecine traditionnelle comme antiseptique et offrent à la médecine occidentale un potentiel qui peut être valorisé dans plusieurs domaines tels que les industries pharmacologiques.

## Remerciements

Nous savons gré à M. le directeur du laboratoire central du centre hospitalo-universitaire Abdelkader-Hassani de Sidi Bel Abbés pour les informations fournies, et à M. le doyen de la faculté de médecine de l'université Djillali-Liabès de Sidi Bel Abbés pour notre accueil au laboratoire de bactériologie et la mise à notre disposition du matériel et des produits nécessaires à la réalisation de ce travail.

**Conflit d'intérêt :** les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

## Références

- Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 40: 4168–70
- Auajjar N, Attarassi B, Elhaloui NE, Badoc A (2006) Multirésistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus aureus* et survie sur divers tissus hospitaliers. *Bull Soc Pharm Bordeaux* 145: 61–76
- Belhatab R, Larous L (2006) Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria. *J Essent Oil Res* 18: 369–73
- Bellahdar J (1997) Médecine arabe ancienne et savoirs populaires : la pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press, Paris
- Billerbeck VG, Roques C, Vanière P, Marquier P (2002) Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiène* 3: 248–51
- Bonnet R, Cavallo JD, Chardon H, et al. (2010) Communiqué du comité de l'antibiogramme. Société française de microbiologie, p. 49
- Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, et al. (2012) Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia* 2: 286–92
- Bruneton J (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3<sup>e</sup> Ed Technique et Documentation, Paris
- Bssaïbis F, Gmira N, Meziane M (2009) Activité antibactérienne de *Ditrichia viscosa* L. W. Greuter. *Rev Microbiol Ind San Environn* 3: 44–55
- Cavallo JD, Chardon H, Chidiac C, et al. (2006) Communiqué du comité de l'antibiogramme. Société française de microbiologie, p. 42
- Celiktas OY, Hames Kocabas EE, Bedir E, et al. (2007) Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., depending on location and seasonal variations. *Food Chem* 100: 553–9
- De Jesus RA, Cechinel Filho V (2000) Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare* L. *Phytomedicine* 7: 111–5
- Dohou N, Yamni K, Tahrouch S, et al. (2003) Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroïdes*. *Bull Soc Pharm Bordeaux* 142: 61–78
- El Bardai S, Morel N, Wibo M, et al. (2003) The vasorelaxant activity of marubienol and marubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Med* 69: 75–7
- Elbashiti TA, Elmanama AA, Masad AA (2010) The antibacterial and synergistic effects of some Palestinian plants extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Funct Plant Sci Biotechnol* 5: 57–62

16. Georgantelis D, Ambrosiadis I, Katikou P, et al. (2007) Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Sci Elsevier* 76: 172–81
17. Guibaud JF (1975) Traitement des candidoses digestives et cutanéomucosales par l'ultraviolette à haute dose. *Vie Med* 8: 628–30
18. Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M (2007) The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem* 14: 249–61
19. Kanyonga PM, Faouzi MA, Meddah B, et al. (2011) Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for antiinflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *J Chem Pharm Res* 3: 199–204
20. Koné WM, Kamanzi Atindehou K, Terreaux C, et al. (2004) Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 93: 43–9
21. Kurbatova NV, Muzychikina RA, Mukhitdinov NM, Parshina GN (2003) Comparative phytochemical investigation of the composition and content of biologically active substances in *Marrubium vulgare* and *Marrubium altemidens*. *Chem Nat Comp* 39: 501–2
22. Le Minor L, Sansonetti P, Richard C, et al. (1989) Entérobactéries. In: Le Minor L, Veron M (eds) *Bactériologie médicale*. Flammarion-Sciences, Paris, pp. 409–72
23. Lin JK, Weng MS (2006) Flavonoids as nutraceuticals. In: Grotwold E (ed) *The science of flavonoids*. Springer, Columbus, Ohio, pp. 213–39
24. Loubaki BC, Ouattara AS, Ouattara CAT, et al. (1999) Activités antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de *Detarium microcarpum* [Cesalpiniaceae (Guil et Perr)] sur huit espèces bactériennes impliquées dans certaines maladies infectieuses au Burkina Faso. *Sci Med* 1: 66–73
25. Loziene K, Venskutonis PR, Sipailienė A, Labokas J (2007) Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem* 103: 546–59
26. Markham KR (1982) *Techniques of flavonoid identification*. Ed Academic Press, London
27. Matkowski A, Piotrowska M (2006) Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia* 77: 346–53
28. Merghem R, Jay M, Viricel MR, et al. (1995) Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry* 38: 637–40
29. Meyre-Silva C, Yunes RA, Schlemper V, et al. (2005) Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *Il Farmaco* 60: 312–26
30. Mohsen SM, Ammar ASM (2009) Total phenolic contents and antioxidant activity of com tassel extracts. *Food Chem* 112: 595–8
31. Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MC, Vargas-Villarreal J (2006) Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res* 37: 45–9
32. Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE, Roura SI (2005) Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT Food Sci Technol* 38: 565–70
33. Moussaid M, Elamrani A, Berhal C, et al. (2012) Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: *Marrubium vulgare* (L.) and *Origanum majorana* (L.). *Int J Nat Prod Res* 1: 11–3
34. Mubashir HM, Bahar A, Iqbal MZ, et al. (2008) Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *Afr J Biotechnol* 7: 86–7
35. Naas T, Sougakoff W, Casetta A, Nordmann P (1998) Molecular characterization of OXA-20, a novel class D  $\beta$ -lactamase and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2074–83
36. Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishina DR (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol* 33: 2–16
37. Natarajan D, John Britto S, Srinivasan K, et al. (2005) Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*: a rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol* 102: 123–6
38. Nawwar-Mahmoud AM, El-Mousallamy AMD, Barakat HH, et al. (1989) Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry* 28: 3201–6
39. Peyret M (1991) Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. *Lyon Pharmaceutique Elsevier* 42: 31–41
40. Pukalskas A, Rimantas Venskutonis P, Salido S, et al. (2012) Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food Chem* 130: 695–701
41. Riou J, Gottlieb HE (2006) Metabolism of auxin in pine tissues: indole-3-acetic acid conjugation. *Physiol Plant* 50: 347–52
42. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, et al. (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem* 91: 621–32
43. Sahpas S, Hennebelle T, Bailleul F (2002) Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Nat Prod Lett* 16: 195–9
44. Sahpaz S, Garbacki N, Tits M, Bailleul F (2002) Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J Ethnopharmacol* 79: 389–92
45. Sagdic O, Ozcan M (2003) Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control Elsevier* 14: 141–3
46. Sarac N, Ugur A (2007) Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *Eur Asian J Biosci* 4: 28–37
47. Senhadji O, Faid M, Elyachoui M, Dehhaoui M (2005) Étude de l'activité antifongique des divers extraits de cannelle. *J Mycol Med* 15: 220–9
48. Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H (2007) The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microbiol* 117: 112–9
49. Snyder LR, Kirk J (1979) *Introduction to modern liquid chromatography*. 2<sup>e</sup> Ed Wiley J & Sons Inc, New York
50. Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G (2007) Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules* 12: 484–96
51. Ulukanli Z, Akkaya A (2011) Antibacterial Activities of *Marrubium catarifolium* and *Phlomis pungens* var. *Hirta* Grown Wild in Eastern Anatolia, Turkey. *Int J Agric Biol* 13: 105–9
52. Vergara-Galicia J, Aguirre-Crespo F, Tun-Suarez A, et al. (2012) Acute hypoglycemic effect of ethanolic extracts from *Marrubium vulgare*. *Phytopharmacology* 3: 54–60
53. Véron M (1989) Pseudomonadaceae. In: Le Minor L, Véron M (eds) *Bactériologie médicale*. Flammarion-Sciences, Paris, pp. 555–87
54. Yakhlef G, Laroui S, Hambaba L, et al. (2011) Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie* 9: 209–18
55. Warda K, Markouk M, Bekkouche K, et al. (2009) Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*. *Afr J Pharm Pharmacol* 3: 101–4
56. Zarai Z, Kadri A, Ben Chobba I, et al. (2011) The in vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids Health Dis* 10: 161–9

## Publication N° 3

**Karim Bouterfas**, Zoheir Mehdadi, Djamel Benmansour, Meghit Boumedién Khaled, Mohamed Bouterfas, Ali Latreche. Optimization of Extraction Conditions of Some Phenolic Compounds from White Horehound (*Marrubium vulgare* L.) Leaves. **International Journal of Organic Chemistry**, 2014, 4, 292-308. Site : <http://www.scirp.org/journal/ijoc>. <http://dx.doi.org/10.4236/ijoc.2014.45032>

# Optimization of Extraction Conditions of Some Phenolic Compounds from White Horehound (*Marrubium vulgare* L.) Leaves

Karim Bouterfas<sup>1\*</sup>, Zoheir Mehdadi<sup>1</sup>, Djamel Benmansour<sup>2</sup>, Meghit Boumedien Khaled<sup>3</sup>, Mohamed Bouterfas<sup>4</sup>, Ali Latreche<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Vegetal Biodiversity: Conservation and Valorization, Faculty of Life and Natural Sciences, Djillali Liabes University, Sidi Bel-Abbes, Algeria

<sup>2</sup>Laboratory of Statistics and Random Model, Faculty of Natural and Universe Sciences, Abou-Bekr Belkaid University, Tlemcen, Algeria

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbes, Algeria

<sup>4</sup>Laboratory of Microscopy, Microanalysis of the Matter and Molecular Spectroscopy, Faculty of Exact Sciences, Djillali Liabes University, Sidi Bel-Abbes, Algeria

Email: \*[bouterfas\\_karim@yahoo.fr](mailto:bouterfas_karim@yahoo.fr)

Received 12 October 2014; revised 28 November 2014; accepted 13 December 2014

Copyright © 2014 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

---

## Abstract

This research was aimed to optimize the extraction conditions of three phenolic compounds: total phenolics, flavonoids and condensed tannins, from White Horehound's leaves (*Marrubium vulgare* L.). Distilled water and different organic solvents such as: methanol, ethanol and acetone, were used, with various concentrations (20% - 80%, v/v), temperatures (20°C - 60°C) and extraction times (30 - 450 min). Results showed that the maximum total phenolics amounts (293.34 ± 14.60 mg gallic acid equivalent/g dry weigh), were obtained with 60% aqueous methanol at 25°C for 180 min; total flavonoids (79.52 ± 0.55 mg catechin equivalent/g dry weigh) with 80% aqueous methanol at 20°C for 450 min, and condensed tannins (28.15 ± 0.80 mg catechin equivalent/g dry weigh) with 60% aqueous acetone at 50°C and for 180 min. ANOVA test showed the significant effect (\*\*\*) ( $P < 0.001$ ) of the extraction conditions tested on phenolic compounds. The Principal Component Analysis (PCA) exhibited the positive effect of low temperatures on total phenolics and flavonoids extraction, and the effect of high temperatures on the condensed tannins extraction. The Response Surface Methodology (RSM) provided predicted values of extraction conditions and maximum polyphenols amounts similar to those obtained experimentally.

---

\*Corresponding author.

## Keywords

***Marrubium vulgare*, Phenolic Compounds, Optimization, Extraction Conditions**

## 1. Introduction

Polyphenols constitute one of the most common and widespread groups of substances in flowering plants, occurring in all vegetative organs, as well as in flowers and fruits. These molecules are involved in many physiological processes such as cell growth, root formation, seed germination and fruit ripening [1]. Moreover, these compounds are considered secondary metabolites involved in the chemical defense of plants against predators, pathogens, environmental stresses and in plant-plant interferences [2].

Nowadays, phenolic compounds represent a unique and a functional place, composed of bioactive products, present in plant-derived foods and beverages and included in the formulations of well-marketed cosmetic and parapharmaceutical products [3]. Furthermore, polyphenols exhibit various biological activities such as anti-cancer [4], antioxidant [5], antimicrobial [6] and anti-inflammatory activities [7]. Therefore, in recent years, the determination of phenolic compounds concentrations in fruits [8] [9], vegetables [10] and some aromatic and medicinal plants [11] [12] has been of increasing interest in the scientific community as well as among health professionals and business partners.

It is well known that the content of phenolic compounds could be influenced by environmental conditions, such as season [13] [14], sampling period and geographic origin [15], precipitations and temperatures [16], and soil type [17]. Additionally, there are several experimental factors that can influence the rate of extraction and the quality of extracted bioactive phenolic compounds. These factors include extraction method, solvent type used and concentration [18], particle size of medicinal plants, temperature and pH of extraction [19], extraction time [20], number of extractions repetition [1] and solvent-to-sample ratio [21].

In order to recover bioactive compounds from plant raw materials, extraction is widely used and it constitutes the first important step [22]. Different solvents and techniques are used for the extraction of polyphenols from plants [23] [24]. However, there is no one standard extraction method used to extract phenolic compounds from plant materials because of their complexity and their interaction with other bioactive compounds [25]. Furthermore, each plant material has its unique properties, in term of phenolic extraction; different plants may require different extraction conditions to achieve the optimum recovery of phenolic compounds [26].

The family Lamiaceae includes aromatic and medicinal plants, which are used in traditional medicine, although Lamiaceae species are well known for their volatile oil content, their therapeutic activities and other properties. This reflects the existence of other chemical components, such as the polyphenols. *Marrubium vulgare* L. commonly known in Europe as “White horehound”, and in the Mediterranean region as “Marute” or as “Merriouet” in Algeria, is a perennial herb of Lamiaceae family, naturalized in North and South America, and Western Asia [27]. In Algeria, *M. vulgare* is used in folk medicine to treat several digestive diseases, diarrhea, as well as diabetes, rheumatism, acute or chronic bronchitis, cough, asthma and other respiratory infections [28]. Earlier, phytochemical investigation of *M. vulgare* have led to the characterization of a very complex metabolic pattern, containing, among other secondary metabolites, diterpenes [29], phenyl propanoids esters [30], tannins [31] and flavonoids [32]. Several activities, traditionally attributed to *M. vulgare*, were approved by intensive modern research and clinical trials, such as hypoglycemic [33], vasorelaxant and antihypertensive [29], analgesic [34], antidiabetic [35], anti-inflammatory [36], and antioxidant properties [37].

However, to the best of our knowledge, optimizing the extraction of phenolic compounds from *M. vulgare* leaves, using different extraction conditions and response surface methodology (RSM), has not been reported yet. Hence, the purpose of the current study was to investigate the effects of different extracting conditions (organic solvent type, concentration of organic solvent, temperature and time) on the extraction of phenolic compounds (total phenolic content, TPC; total flavonoid content, TFC; and condensed tannins content, CTC) from *M. vulgare* leaves.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Plant Material

Leaves of *M. vulgare* were collected in April 2012, from Tessala Mountain (north-western Algeria, semi-arid

climate) at the level of a station which latitudinal coordinates 35°16'33"N, and longitudinal 0°46'27"W, altitude 596 m. The identification of plant specimen was done by Professor Z. Mehdadi and put at the Laboratory of Vegetal Biodiversity: Conservation and Valorization (Faculty of Natural and Life Sciences, Djillali Liabes University of Sidi Bel-Abbes, Algeria).

Upon arrival at the laboratory, samples were thoroughly rinsed with distilled water, dried in the dark for three weeks at room temperature and crushed with the cutting mill. The powdered samples were packaged into a linear-low-density polyethylene (LLDPE) film and stored in dark at room temperature for further experiments.

## 2.2. Extract Preparation

Two grams of leaf powder *M. vulgare* were extracted using 20 ml of extraction solvent with different concentrations, introduced in conical flask of capacity 100 ml sealed with parafilm and wrapped with aluminum foil to prevent solvent loss and exposure to light. Therefore, the mixture was stirred at 150 rpm in bath water with controlling temperature at a constant speed (level 8) for a particular duration. After completing the extraction process, the *M. vulgare* extract was filtered using Whatman No. 1 filter paper into amber bottle for analysis without storage overnight, in order to obtain a clear crude extract solution.

To determine the optimal conditions for phenolic extraction from *M. vulgare* leaves, the extraction conditions were set according to the experimental design described below:

- *Organic solvents type*: three kinds of organic solvents (methanol, ethanol and acetone) were selected. Distilled water was tested as control. The selection of the three extraction solvents is made firstly after several (about one hundred) referenced protocols in terms of quantification of phenolic compounds and secondly from the viewpoint of the availability of the chemicals used;
- *Solvent concentrations*: four concentrations (20%, 40%, 60% and 80%; v/v) were prepared in distilled water;
- *Extraction temperatures*: six temperatures (20°C, 25°C, 30°C, 40°C, 50°C and 60°C) were used;
- *Extraction times*: six different times (30, 90, 180, 270, 360 and 450 min) were chosen.

## 2.3. Total Phenolic Contents (TPC)

TPC of *M. vulgare* extracts was determined using Folin-Ciocalteu reagent, according to method suggested by Li *et al.* [38] and slightly modified by Chew *et al.* [39]. Crude extracts were diluted 50 times with deionized water prior to analysis. 1 ml of diluted extract was mixed with 1 ml of diluted Folin-Ciocalteu reagent (10 times diluted with deionized water). After incubating the mixture at room temperature for 4 min, 0.8 ml of 7.5% (w/v), sodium carbonate anhydrous solution was added. The mixture was then vortexed for 10 s and incubated in the dark at room temperature during 2 h. The absorbance of the mixture was measured against blank at 765 nm using UVi light spectrophotometer. Gallic acid with different concentrations (0-100-200-300-400-500 mg/l) was used to calibrate the standard curve. The calibration equation for gallic acid was  $Y = 0.0042X - 0.0178$  ( $R^2 = 0.9992$ ). Each crude extract was analyzed in triplicate and the results were expressed in milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

## 2.4. Total Flavonoids Contents (TFC)

TFC was determined using procedures described by Tan *et al.* [21]. The crude extract was diluted 10 times. An amount of 1.25 ml deionised water followed by 75  $\mu$ l of 5% sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>), was added to 0.25 ml of diluted crude extract in an aluminium foil-wrapped 15 ml test tube. The mixture was left standing for 6 min before adding 150  $\mu$ l of 10% (w/v) aluminium chloride (AlCl<sub>3</sub>). The mixture was left standing for 5 min before adding 0.5 ml of 1 M sodium hydroxide (NaOH) and 275  $\mu$ l of deionised water. The tip of the test tube was covered with parafilm and then mixed using vortex mixer for approximately 10 s. The absorbance of the mixture was determined at 510 nm versus the prepared blank using Uvi light spectrophotometer. Catechin with different concentration (0 - 100 - 200 - 300 - 400 - 500 mg/l) was used for calibration. The calibration equation for catechin was calculated as follow:  $Y = 0.0035X - 0.0062$  ( $R^2 = 0.9995$ ). Each crude extract was analyzed in triplicate and the results were expressed in milligrams of catechin equivalents per gram of dry weight (mg CE/g DW). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

## 2.5. Total Flavonoid Contents (TFC)

TFC was determined using procedures described by Tan *et al.* [21]. The crude extract was diluted 10 times. An

amount of 1.25 ml deionised water followed by 75  $\mu$ l of 5% sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ), was added to 0.25 ml of diluted crude extract in an aluminium foil-wrapped 15 ml test tube. The mixture was left standing for 6 min before adding 150  $\mu$ l of 10% (w/v) aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3$ ). The mixture was left standing for 5 min before adding 0.5 ml of 1 M sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ ) and 275  $\mu$ l of deionised water. The tip of the test tube was covered with parafilm and then mixed using vortex mixer for approximately 10 s. The absorbance of the mixture was determined at 510 nm versus the prepared blank using Uvi light spectrophotometer. Catechin with different concentration (0 - 100 - 200 - 300 - 400 - 500 mg/l) was used for calibration. The calibration equation for catechin was calculated as follow:  $Y = 0.0035X - 0.0062$  ( $R^2 = 0.9995$ ). Each crude extract was analyzed in triplicate and the results were expressed in milligrams of catechin equivalents per gram of dry weight (mg CE/g DW). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

## 2.6. Condensed Tannins Contents (TFC)

CTC assay was performed according to the method described by Chew *et al.* [39]. 0.5 ml undiluted crude extract was firstly mixed with 3 ml of vanillin reagent (4%, w/v, in absolute methanol), followed by addition of 1.5 ml of concentrated HCl (37%). After that, the mixture was stored in the dark at room temperature for 15 min. The absorbance of mixture was measured at 500 nm against blank using Uv light spectrometer. Each undiluted crude extract was measured in triplicate. Catechin with different concentrations (0 - 100 - 200 - 300 - 400 - 500 mg/l) was used for calibration of standard curve. The calibration equation for catechin was calculated using the formula  $Y = 0.0021X - 0.0143$  ( $R^2 = 0.997$ ). Each crude extract was analyzed in triplicate and the results were expressed in milligrams of catechin equivalents per gram of dry weight (mg CE/g DW). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

## 2.7. Statistical Analysis

In order to control the influence of extraction conditions (solvent type, solvent concentration, extraction time, and extraction temperature) on the mean concentrations of each phenolic compound, ANOVA, with more classification criteria, using Fisher's least significant difference test and the significant differences at the 5% level, were calculated. The difference was considered as not significant when  $P > 0.05$ , significant when  $^*P \leq 0.05$ , and highly significant for  $^{**}P \leq 0.01$  and extremely significant for  $^{***}P \leq 0.001$ . These analyzes were performed using Minitab 16. Tukey's test was also performed for pair-wise comparisons at the 5% level.

To determine possible correlation among polyphenols concentrations and extraction conditions, PCA was used. This statistical tool is dedicated for data exploration, which allows the reduction of the number of quantitative variables to a small number of components. Moreover, using PCA, interrelationships between different variables could be seen, and detected and sample patterns, groupings, similarities or differences could be interpreted [40]. A matrix is prepared using XLSTAT 2012 software, by taking polyphenols concentrations as observations and extraction conditions as variables.

Optimal conditions for the extraction of phenolic compounds from *M. vulgare* leaves were obtained using response surface methodology (RSM) [41] [42]. This method is adopted for each type of phenolic compound with the solvent giving the highest experimental concentration. The independent variables studies were solvent concentration ( $X_1$ ), extraction temperature ( $X_2$ ) and extraction time ( $X_3$ ); while the dependent variable ( $Y$ : response variable) measured was the contents of phenolic compound. To obtain the best combination of independent variables giving a maximum percentage of adjusted  $R^2$ , a best subsets regression is performed using Minitab 16 software. Thus, the regression equation of the model is obtained by an analysis of general regression. Finally, the optimum polyphenols contents and extraction conditions are obtained by introducing the regression equation in Maple 6 software. The experimental and predicted values of polyphenols contents and extraction conditions were compared, in order to determine the validity of the model.

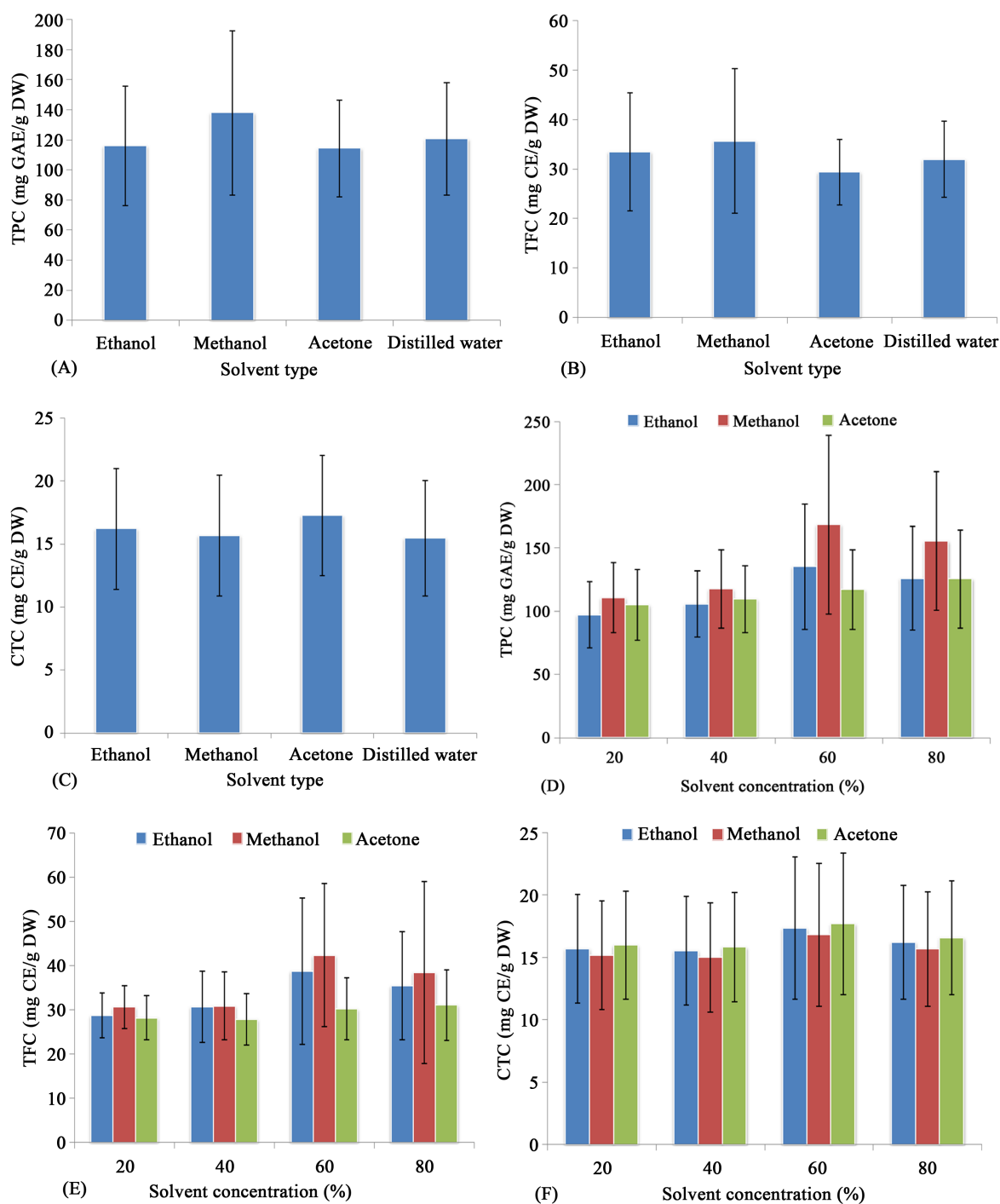
## 3. Results and Discussion

Results of total phenolic, total flavonoids, and condensed tannins amounts are shown in **Figure 1** and **Figure 2**. The influence of extraction's conditions used on phenolic compounds amounts obtained using ANOVA, with more classification criteria, is presented in **Table 1**.

**Table 1.** Analysis of variance (ANOVA) with more classification criteria of quantified phenolic compounds.

Source	Degree of freedom	Sum of Squares	Mean squares	F-value	P-value
{1}Solvent type	2	40326.1 <sup>TPC</sup>	20163.1 <sup>TPC</sup>	262.15 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		2326.12 <sup>TFC</sup>	1163.06 <sup>TFC</sup>	274.61 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		43.14 <sup>CTC</sup>	21.57 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{2}Solvent concentration	4	107832.8 <sup>TPC</sup>	26958.2 <sup>TPC</sup>	350.49 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		5132.83 <sup>TFC</sup>	1283.21 <sup>TFC</sup>	302.98 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		257.24 <sup>CTC</sup>	64.31 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{3}Extraction time	5	45983.2 <sup>TPC</sup>	9196.6 <sup>TPC</sup>	119.57 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		111.09 <sup>TFC</sup>	22.22 <sup>TFC</sup>	5.25 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		592.16 <sup>CTC</sup>	118.43 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{4}Extraction temperature	5	553938.7 <sup>TPC</sup>	110787.7 <sup>TPC</sup>	1440.39 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		39821.11 <sup>TFC</sup>	7964.22 <sup>TFC</sup>	1880.44 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		10589.43 <sup>CTC</sup>	2117.89 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{1}*{2}	8	31097.1 <sup>TPC</sup>	3887.1 <sup>TPC</sup>	50.54 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		1654.30 <sup>TFC</sup>	206.79 <sup>TFC</sup>	48.82 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		10.91 <sup>CTC</sup>	1.36 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{1}*{3}	10	7922.1 <sup>TPC</sup>	792.2 <sup>TPC</sup>	10.30 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		54.86 <sup>TFC</sup>	5.49 <sup>TFC</sup>	1.30 <sup>TFC</sup>	=0.235 <sup>NS</sup>
		2.59 <sup>CTC</sup>	0.26 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{1}*{4}	10	14801.5 <sup>TPC</sup>	1480.1 <sup>TPC</sup>	19.24 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		2422.48 <sup>TFC</sup>	242.25 <sup>TFC</sup>	57.20 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		0.00 <sup>CTC</sup>	0.00 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{2}*{3}	20	35664.5 <sup>TPC</sup>	1783.2 <sup>TPC</sup>	23.18 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		599.22 <sup>TFC</sup>	29.96 <sup>TFC</sup>	7.07 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		100.97 <sup>CTC</sup>	5.05 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{2}*{4}	20	48446.9 <sup>TPC</sup>	2422.3 <sup>TPC</sup>	31.49 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		7603.54 <sup>TFC</sup>	380.18 <sup>TFC</sup>	89.76 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		233.26 <sup>CTC</sup>	11.66 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{3}*{4}	25	18241.9 <sup>TPC</sup>	729.7 <sup>TPC</sup>	9.49 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		767.42 <sup>TFC</sup>	30.70 <sup>TFC</sup>	7.25 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		92.06 <sup>CTC</sup>	3.68 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{1}*{2}*{3}	40	8775.9 <sup>TPC</sup>	219.4 <sup>TPC</sup>	2.58 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		314.37 <sup>TFC</sup>	7.86 <sup>TFC</sup>	1.86 <sup>TFC</sup>	=0.003 <sup>**</sup>
		1.26 <sup>CTC</sup>	0.03 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{1}*{2}*{4}	40	18002.2 <sup>TPC</sup>	450.1 <sup>TPC</sup>	5.85 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		3061.91 <sup>TFC</sup>	76.55 <sup>TFC</sup>	18.07 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		0.00 <sup>CTC</sup>	0.00 <sup>CTC</sup>	0.00 <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{1}*{3}*{4}	50	5440.4 <sup>TPC</sup>	108.8 <sup>TPC</sup>	1.41 <sup>TPC</sup>	=0.050 <sup>*</sup>
		272.27 <sup>TFC</sup>	5.45 <sup>TFC</sup>	1.29 <sup>TFC</sup>	=0.116 <sup>NS</sup>
		0.00 <sup>CTC</sup>	0.00 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{2}*{3}*{4}	100	46098.9 <sup>TPC</sup>	461.0 <sup>TPC</sup>	5.99 <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		1176.72 <sup>TFC</sup>	11.77 <sup>TFC</sup>	2.78 <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		176.67 <sup>CTC</sup>	1.77 <sup>CTC</sup>	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
{1}*{2}*{3}*{4}	200	15383.0	76.09	UD <sup>TPC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		847.06	4.24	UD <sup>TFC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>
		0.00	0.00	UD <sup>CTC</sup>	<0.0001 <sup>***</sup>

UD: undefined (the denominator of Fisher's test is null or undefined).

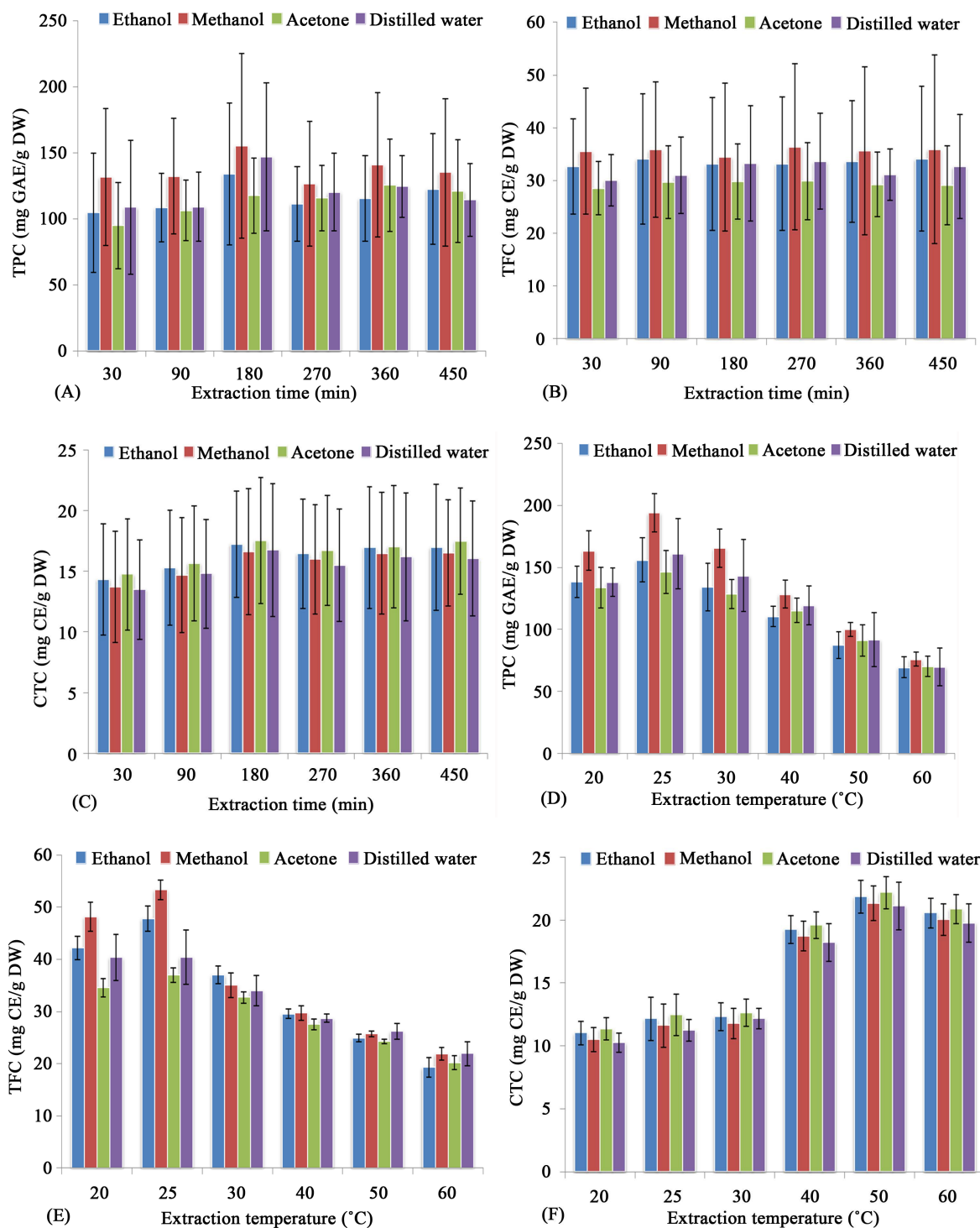


**Figure 1.** Effects of solvent type ((A), (B), (C)) and solvent concentration ((D), (E), (F)) on TPC, TFC and CTC extracted from *M. vulgare* leaves.

### 3.1. Effect of Solvent Type on Extraction of Phenolic Compounds

The choice of extraction solvents is important for complex food samples. They allow determining the amount and the type of phenolic compounds to extract. Organic solvents, particularly acetone, ethanol and methanol are the most commonly used in polyphenols extraction from botanical materials [43].

Our results showed that methanol ( $137.79 \pm 54.62$  mg GAE/g) was significantly high effective ( $***P < 0.001$ )



**Figure 2.** Effects of extraction time ((A), (B), (C)) and extraction temperature ((D), (E), (F)) on TPC, TFC and CTC extracted from *M. vulgare* leaves.

when compared with all other solvent systems used in extracting TPC from *M. vulgare* leaves, as shown in **Figure 1(A)**. Methanol has been considered as an ideal solvent for the TPC extraction from green walnut fruits [44], *Zingiber officinalis* leaves [45], *Tamarix aphylla* leaves [46] and *Artemisia annua* leaves [47]. Several studies confirmed that TPC depends on organic solvent polarity and methanol is one of the most suitable solvents for

the extraction of TPC from plants [48] [49]. Mohammadi and Atik [46] reported that the high polarity of methanol, estimated at 6.6, compared to other organic solvents, plays a key role in increasing phenolic solubility. However, Kong *et al.* [50] found that TPC in methanolic extracts, obtained from *Pouteria campechiana* fruit parts, was about 23 % to 45 % lower than the ethanolic extracts.

Methanol permitted to obtain the highest extraction levels of TFC ( $35.64 \pm 14.61$  mg CE/g) from *M. vulgare* leaves (Figure 1(B)). Furthermore, a significant difference ( $***P < 0.001$ ) was found between the type of organic solvents used. Similar results were observed for *Moringa oleifera* and *Aloe barbadensis* leaves [51], *Euphorbia helioscopia* leaves, stems and flowers [52]. Our results agree with previous studies, which found that ethanol was less effective than methanol for extracting TFC [53] [54]. In contrast, Settharaksa *et al.* [55] have found that using water to extract solvent from some Thai medicinal plants, was better than using ethanolic and methanolic solvents to extract TFC. Ghasemzadeh *et al.* [45] reported that extraction of TFC from *Zingiber officinale* leaves, using methanol, was about 3 times higher when using acetone and 4 times higher when using hexane. Spigno *et al.* [56] suggested that high level of TPC obtained using methanol, could be explained by the fact that this solvent allows a good solubility of flavonoids' hydroxyl groups.

A maximum level of CTC ( $17.24 \pm 4.77$  mg CE/g) was reached using acetone, as shown in Figure 1(C). There was a high significant difference between the four tested solvents ( $***P < 0.001$ ). Our results agree with those of Trabelsi *et al.* [18] who found that maximum CTC level, from *Limoniastrum monopetalum* leaves, was obtained when acetone solvent was used. Similarly, in other studies performed by Wina *et al.* [57] and Mazandarani *et al.* [58], acetone was found to be the most effective solvent extracting CTC from *Acacia mangium* barks and *Onosma dichroanthum* roots, respectively. According to Antwi-Boasiako and Animapauh [59], the four solvents tested in the current study, especially acetone and methanol were the best extraction solvents of CTC from the barks of three tropical hardwoods. Additionally, Uma *et al.* [60] showed that acetone was the most effective solvent for extraction of condensed tannins as tannins have a relatively high molecular weight.

### 3.2. Effect of Solvent Concentration on Extraction of Phenolic Compounds

Mixtures of alcohols with different proportions of water have shown to be more effective in extracting phenolic compounds compared to mono-component solvent system [25]. Addition of small quantity of water to organic solvent usually leads to a more polar medium, which facilitates the polyphenols extraction [56].

We observed that maximum rate of TPC ( $168.41 \pm 70.60$  mg GAE/g), extracted from *M. vulgare* leaves, was obtained when aqueous methanol was used at 60% (Figure 1(D)). However, there were high significant differences ( $***P < 0.001$ ) in TPC among the various concentrations. Our results are in line with those found by Chan *et al.* [61] and Chew *et al.* [39] who found that 60% aqueous methanol gave the best effectiveness extracting TPC from *Citrus hystrix* peels and *Centella asiatica* leaves, respectively. Yilmaz and Toledo [62] reported that aqueous mixtures of methanol, ethanol or acetone were better than a mono-component solvent for the extraction of TPC from Muscadine seeds.

The highest value of TFC ( $42.40 \pm 16.22$  mg CE/g), as shown in Figure 1(E), was obtained, when we used 60% of aqueous methanol and was significantly different ( $***P < 0.001$ ) compared to the other studied concentrations. In contrast, aqueous methanol at 80% was the best concentration for *Calendula officinalis* flowers [63] and aqueous ethanol at 80% from the leaves of *Limoniastrum monopetalum* [18], *Bauhinia monandra* [64] and *Callicarpa nudiflora* [41]. Musa *et al.* [65] confirmed that the mixture of an aqueous solvent (distilled water) with an organic solvent (methanol and ethanol) improves the flavonoids yield comparing to water or organic solvent used separately.

Sixty percent (60%) acetone in water gave the highest value of CTC, which was  $17.68 \pm 5.69$  mg CE/g (Figure 1(F)). Moreover, there were high significant ( $***P < 0.001$ ) differences in CTC values among the different concentrations used. Our data are in agreement with those reported by Downey and Hanlin [66] on grape skin. In other studies, it has been noticed that 80% aqueous acetone was the best concentration for CTC extraction from *Limonium densiflorum* shoots [67], 60% aqueous methanol from *Cichorium intybus* L. roots, leaves, stems and seeds [68], and 80% aqueous ethanol from the Chinese chestnut [69].

### 3.3. Effect of Extraction Time on Extraction of Phenolic Compounds

Extraction time represents another key parameter in optimizing the phenolic compounds extraction. In the literature, this parameter might be as short as few minutes or long up to 24 hours, depending on the phenolic com-

pounds present in samples [70].

In this study, extraction time showed a significant effect ( $***P < 0.001$ ) on the extraction of TPC from *M. vulgare* leaves. As shown in **Figure 2(A)**, the highest value of TPC ( $155.16 \pm 69.83$  GAE/g) was recorded using methanol for 180 min. Chan *et al.* [61] demonstrated that 180 min represented the best extraction time for TPC from the peels of *Citrus hystrix*. In other studies, the best extraction time of TPC was estimated to 18 hours for black tea, *Camellia sinensis* [49], 90 min from grape pomace extracts [71], 45 min from *Areca catechu* seeds [72] and *Azadirachta indica* leaves [70]. Increased time of extraction beyond 180 min (270, 360 and 450 min) induced a loss in TPC. Dent *et al.* [73] highly recommended that the extraction time, should not exceed 3 h for the extraction of TPC from *Salvia officinalis* leaves. Several authors stated that more the extraction time is long, less the content of polyphenols is obtained. This could be the result of loss of phenolic compounds, via oxidation, which might polymerize into insoluble compounds [26] [74]. Therefore, extraction time of TPC depends, not only, on maceration or agitation times, but also on several factors such as filtration time or the time spent during the evaporation of solvents [75].

The maximum of TFC concentration ( $39.95 \pm 17.90$  mg CE/g) was obtained using methanol for 450 min as illustrated in **Figure 2(B)**. Extraction time showed significant effect ( $***P < 0.001$ ) in TFC. However, 3 hours was considered to be the best extraction time for TFC from *Callicarpa nudiflora* leaves [46] and from some thyme varieties [76]. Additionally, 30 min has been shown to be the most favorable extraction time for TFC from *Gynura medica* leaves [77].

180 min was the longest extraction time, using acetone, for CTC (**Figure 2(C)**) with a maximum rate of  $17.51 \pm 5.18$  CE/g. A high significant difference ( $***P < 0.001$ ) was obtained in CTC among different extraction times. Our results agree with those obtained by Zhekova and Pavlov [76] on some thyme varieties. In other works, the best extraction time was of 120 min for mangosteen fruits [78], 150 min for *Parkia clappertoniana* husks [79], 80 min for *Cichorium intybus* different organs [67], and 20 min for *Punica granatum* peels [80].

### 3.4. Effect of Extraction Temperature on Extraction of Phenolic Compounds

The effectiveness of extraction process of phenolic compounds is largely regulated by different experimental parameters particularly by the extraction temperature [81]. An increase of temperature is mainly due to an increase of the diffusion rate and solubility of the extracted substances. On the other hand, it should be taken into account, that some important biological active substances, such as TPC are damaged at high temperatures [82].

The extraction of TPC, as shown in **Figure 2(D)**, was optimal when methanol was used at 25°C. In this case,  $194.16 \pm 15.45$  mg GAE/g DW were obtained with high significant difference ( $***P < 0.001$ ) and between different temperatures. Similar to our finding, 25°C was the most optimal extraction temperature for TPC from *Lawsonia inermis* leaves [60] and *Azadirachta indica* leaves [70]. Extension of extraction temperature beyond 25°C led to an important decrease in TPC. However, it should be noticed that increasing the extraction temperature, beyond certain values, might promote possible concurrent decomposition of phenolic compounds, which were already mobilized at lower temperature. Furthermore, this elevation of temperature can even lead to the breakdown of phenolic compounds that remained in the plant matrix [83] [84]. Hence, heating may affect the polyphenolic composition in many cases; therefore, high-temperature drying should be avoided as much as possible [2]. Usually, TPC extraction is used at room temperature ( $\approx 25^\circ\text{C}$ ) to avoid the degradation of phenolic compounds [25]. However, in other experiments, the optimal extraction temperature for TPC was found more elevated and estimated to 40°C for *Citrus hystrix* peels [61], 100°C for *Areca catechu* seeds [72], 65°C for *Centella asiatica* leaves [39] and *Orthosiphon stamineus* stems and leaves [85], and 90°C for *Moringa oleifera* leaves [86].

A maximum of TFC rate ( $53.31 \pm 1.83$  CE/g) was obtained at 25°C using methanol as solvent (**Figure 2(E)**). In the current investigation we found that extraction temperature significantly ( $***P < 0.001$ ) affected the TFC extraction. However, in other researches, the highest extraction temperature was fixed at 90 °C for *Callicarpa nudiflora* leaves [41] and 60°C from some thyme varieties [76]. Like TPC, the extension of extraction temperature higher than 25°C led to an important decrease in TFC. However, the temperature conditions during the extraction procedures of flavonoids have to be carefully adjusted because of the possibility of thermal degradation of flavonoid derivatives, especially hydroxyl groups [87] [88]. In addition, mild heating was also found to have the ability to soften the plant tissues, to weaken the cell wall integrity, and thus to favor the release of bound phenolic compounds [56] [89].

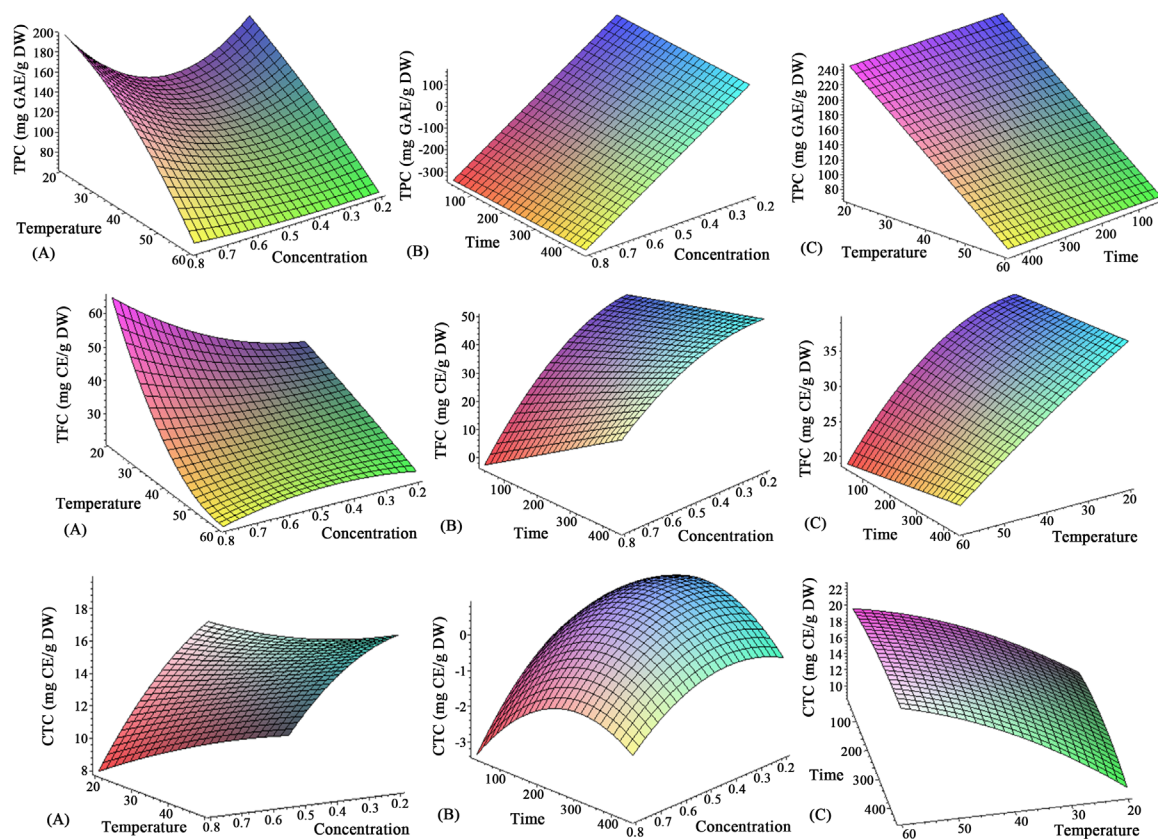


- Group 2 (Gr2) on the negative side of PC1, constituted by CTC with a contribution of  $-0.883$ . This phenolic compound was associated to ethanolic, acetonic and aqueous extracts at high temperatures  $50^{\circ}\text{C}$  and  $60^{\circ}\text{C}$ ; ET5, ET6, AT5, AT6, DWT5, and DWT6 with contributions of 2.473; 3.705;  $-2.506$ ;  $-3.661$ ;  $-2.089$  and  $-3.290$ , respectively.
- Moreover, considering the contributions of observations and variables on PC1, we defined two gradients:
- A horizontal gradient, moving from right to left of PC1, formed by the extraction temperature used, which explains the position of TPC and TFC right of PC1, correlated with low temperatures and the location of CTC to the left of PC1 in conjunction with high temperatures;
- A vertical gradient from the bottom to the top of PC1, constituted by the organic solvent concentration and the extraction time. This gradient explains the position of the three phenolic compounds measured at the top of PC1, correlated with high solvent concentrations (60% for TPC and CTC, 80% for TFC) and high times (180 min for TPC and CTC, 270 min for TFC).

### 3.6. Response Surface Methodology (RSM)

The Response Surface Methodology (RSM) was plotted to study the effects of extraction conditions on phenolic compounds extraction from *M. vulgare* leaves. 3 D response surface plots are illustrated in **Figure 4**. The regression equation of the model selected, for each phenolic compound measured and their adjusted  $R^2$  was as follow:

- $\text{TPC} = 323.205 - 827.094 X_1 - 4.2516 X_2 + 0.015029 X_3 + 843.115 X_{12} + 17.1341 X_{1X2} - 13.5293 X_{2X12} - 0.0615286 X_{1X22}$ , with adjusted  $R^2 = 82.03\%$ ,
- $\text{TFC} = 32.4239 + 31.9683 X_1 + 0.42576 X_2 + 0.0308808 X_3 + 98.4907 X_{12} - 0.0108914 X_{22} - 2.96617 X_{1X2} - 0.00163763 X_{3X2} - 0.00122396 X_{1X3X2} + 0.0702683 X_{3X12} - 2.22016 X_{2X12} + 2.10557e-5 X_{3X22} + 0.0492972 X_{1X32}$ , with adjusted  $R^2 = 77.61\%$ ,



**Figure 4.** The 3D response surface plots representing the effects of (A) solvent concentration and extraction temperature; (B) solvent concentration and time extraction and (C) extraction temperature and extraction time on the extraction of phenolic compounds from *M. vulgare* leaves.

- $CTC = -2.19999 + 7.81089 X_1 + 0.603279 X_2 + 0.01403 X_3 - 12.395 X_{12} - 0.00405521 X_{22} - 2.96468e - 5 X_{32} - 0.220734 X_1 X_2 + 0.00680008 X_3 X_{12} + 0.388604 X_2 X_{12} + 2.36161e - 7 X_2 X_{32}$ , with adjusted  $R^2 = 90.62\%$ .

The comparison between the maximum experimental values of phenolic compounds and extraction conditions, and the predicted ones (Table 2), showed that the two sets of values were close. Indeed, the maximum value of TFC (experimental: 79.52 mg CE/g; predicted: 79.46 mg CE/g) and CTC (experimental: 28.15 mg CE/g, predicted: 20.81 mg CE/g) were obtained by the same experimental and predicted extraction conditions (TFC: aqueous methanol 80% at 20°C and for 450 min; CTC: 60% at 50°C and for 180 min). Concerning TPC, the maximum values of experimental and predicted contents and extraction conditions were different. The experimental values were of 293.34 mg GAE/g, obtained with aqueous methanol 60% at 25°C and for 180 min. However, the predicted ones were of 204.75 mg GAE/g, obtained with aqueous methanol 80% at 20°C during 167 min. Both, accounting experimental and predicted results indicated that the experimental model was valid. This implied that there was a high fit degree between the values observed in experiment and those predicted from the regression model. Hence, the response surface modeling could be applied effectively to predict extraction of phenolic compounds from *M. vulgare* leaves.

#### 4. Conclusions

The results obtained in our study indicate that the experimental conditions tested (organic solvent type, solvent concentration, extraction time and extraction temperature) influence notably the values of TPC, TFC and CTC extracted from *M. vulgare* leaves, with extremely significant differences ( $^{***} P < 0.001$ ).

We were able to define the optimum extraction conditions too, for obtaining higher values of some phenolic compounds from *M. vulgare* leaves. Indeed, the optimum level of TPC ( $293 \pm 14.60$  mg GAE/g) was obtained using 60% aqueous methanol at 25°C for 180 min, TFC ( $79.52 \pm 0.55$  mg CE/g) using 80% aqueous methanol at 20°C for 450 min, and CTC ( $28.15 \pm 0.80$  mg CE/g) with 80% aqueous acetone at 50°C for 450 min. These levels highlight the richness of *M. vulgare* in these secondary metabolites. We conclude that this species remains poorly studied compared to other species belonging to the same taxonomic family (Lamiaceae) as thyme and sage.

Our results provide some confirmations on the effect of the variability of extraction procedures and assay on the amount of phenolic compounds recorded and reinforce previous works in this context.

This work is far from exhaustive as other experimental conditions can be tested, as the solid-to-solvent ratio, the number of extractions and the nature of the extraction method. Also, other extraction solvents (ethylene glycol, acetic acid and ethyl acetate), fractional extraction for many times or multistage extraction can be taken into consideration in our future works.

The impact of environmental conditions as the geographical region, altitude, exposure and the harvest season on the levels of polyphenols in *M. vulgare* is a promising perspective to this study and is still under investigation in our laboratory.

#### Acknowledgements

This research is a part of the Algerian National Project Research (entitled “Flora of Tessala Mountains: inventory, valorization and conservation”, code 1/u22/397), financially supported by the Algerian Ministry of High

**Table 2.** Optimum values of experimental and predicted polyphenols contents and extraction conditions.

	Polyphenols concentrations		Solvent type		Solvent concentration ( $X_1$ )		Extraction temperature ( $X_2$ )		Extraction time ( $X_3$ )	
	EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV
TPC	293.34	204.75	Methanol		60	80	25	20	180	167
TFC	79.52	79.46	Methanol		80	80	20	20	450	450
CTC	28.15	20.81	Acetone		60	60	50	50	180	180

EV: experimental values; PV: predicted values.

Education and Scientific Research. Also, the authors are grateful to Dr. Amel Latifi, Bacterial Chemistry Laboratory (Marseille, France), for valuable editorial assistance during the drafting of this manuscript.

## References

- [1] Khoddami, A., Wilkes, M.A. and Roberts, T.H. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, **18**, 2328-2375. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18022328>
- [2] Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, **2**, 1231-1246. <http://dx.doi.org/10.3390/nu2121231>
- [3] Ferrazzano, G.F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G. and Pollio, A. (2011) Plant Polyphenols and Their Anti-Carcinogenic Properties: A Review. *Molecules*, **16**, 1486-1507. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16021486>
- [4] Berghe, W.V. (2012) Epigenetic Impact of Dietary Polyphenols in Cancer Chemoprevention: Lifelong Remodeling of Our Epigenomes. *Pharmacological Research*, **65**, 565-576. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.03.007>
- [5] Kazeem, M.I., Akanji, M.A., Hafizur, R.M. and Choudhary, M.I. (2012) Antigliycation, Antioxidant and Toxicological Potential of Polyphenol Extracts of Alligator Pepper, Ginger and Nutmeg from Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2**, 727-732. [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60218-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60218-4)
- [6] Konaté, K., Hilou, A., Mavoungou, J.F., Lepengué, A.N., Souza, A., Barro, N., Datté, J.Y., M'Batchi, B. and Nacoulma, O.G. (2012) Antimicrobial Activity of Polyphenol-Rich Fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against Cotrimoxazol-Resistant Bacteria Strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **11**, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-11-5>
- [7] Lolayekar, N. and Shanbhag, C. (2012) Polyphenols and Oral Health. *RSBO*, **9**, 74-84.
- [8] Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D. and Boras, M. (2007) The Content of Polyphenols and Carotenoids in Three Apricot Cultivars Depending on Stage of Maturity and Geographical Region. *Food Chemistry*, **102**, 966-975. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.001>
- [9] Ignat, I., Volf, I. and Popa, V.I. (2011) A Critical Review of Methods for Characterisation of Polyphenolic Compounds in Fruits and Vegetables. *Food Chemistry*, **126**, 1821-1835. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- [10] D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. and Masella, R. (2007) Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, **43**, 348-361.
- [11] N'Guessan, A.H.O., Déliko, C.E.D., Mamyrbékova-Békro, J.A. and Békro, Y.A. (2011) Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Revue de Génie Industriel*, **6**, 55-61.
- [12] Okuda, T. and Ito, H. (2011) Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, **16**, 2191-2217. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16032191>
- [13] Cosmulescu, S. and Trandafir, I. (2011) Seasonal Variation of Total Phenols in Leaves of Walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 4938-4942.
- [14] Generalic, I., Skroza, D., Surjaka, J., Mozinab, S.S., Ljubenkovc, I., Katalinic, A., Simate, V. and Katalinic, V. (2012) Seasonal Variations of Phenolic Compounds and Biological Properties in Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & Biodiversity*, **9**, 441-456. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201100219>
- [15] Raal, A., Orav, A., Pussa, T., Valner, C., Malmiste, B. and Arak, E. (2012) Content of Essential Oil, Terpenoids and Polyphenols in Commercial Chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) Teas from Different Countries. *Food Chemistry*, **131**, 632-638. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.042>
- [16] Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Ebrahimzadeh, M.A. and Pourmorad, F. (2011) Influence of Environmental Factors on Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoids Contents of Walnut (*Juglans regia* L.) Green husks. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 1128-1133.
- [17] Bruni, R. and Sacchetti, G. (2009) Factors Affecting Polyphenol Biosynthesis in Wild and Field Grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules*, **14**, 682-725. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14020682>
- [18] Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., Hajlaoui, H. and Abdelly, C. (2010) Solvent Effects on Phenolic Contents and Biological Activities of the Halophyte *Limoniastrum monopetalum* Leaves. *LWT-Food Science and Technology*, **43**, 632-639.
- [19] Gironi, F. and Piemonte, V. (2011) Temperature and Solvent Effects on Polyphenol Extraction Process from Chestnut Tree Wood. *Chemical Engineering Research and Design*, **89**, 857-862. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2010.11.003>
- [20] Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.E., Abdelly, C. and Magné, C. (2012) Ultrasound-Assisted Extraction: Effect of Extraction Time and Solvent Power on the Levels of Polyphenols and Antioxidant Activity of *Mesembryanthemum edule* L. *Aizoaceae* Shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **11**, 243-249.

- <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v11i2.10>
- [21] Tan, P.W., Tan, C.P. and Ho, C.W. (2011) Antioxidant Properties: Effects of Solid-to-Solvent Ratio on Antioxidant Compounds and Capacities of Pegaga (*Centella asiatica*). *International Food Research Journal*, **18**, 557-562.
- [22] Santana, C.M., Ferrera, Z.S., Padrón, M.E.T. and Rodríguez, J.J.S. (2009) Methodologies for the Extraction of Phenolic Compounds from Environmental Samples: New Approaches. *Molecules*, **14**, 298-320. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14010298>
- [23] Stalikas, C.D. (2010) Phenolic Acids and Flavonoids: Occurrence and Analytical Methods. *Methods in Molecular Biology*, **610**, 65-90. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8_5)
- [24] Jace, D.E. and Shahidul, I. (2012) Effects of Extraction Procedures, Genotypes and Screening Methods to Measure the Antioxidant Potential and Phenolic Content of Orange-Fleshed Sweetpotatoes (*Ipomoea batatas* L.). *American Journal of Food Technology*, **7**, 50-61. <http://dx.doi.org/10.3923/ajft.2012.50.61>
- [25] Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. (2010) Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, **15**, 8813-8826. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15128813>
- [26] Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y. (2007) Optimisation of Extraction Conditions of Antioxidant Phenolic Compounds from Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) Tubers. *Journal of Separation and Purification Technology*, **55**, 217-225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2006.12.005>
- [27] Kanyonga, P.M., Faouzi, M.A., Meddah, B., Mpona, M., Essassi, E.M. and Cherrah, Y. (2011) Assessment of Methanolic Extract of *Marrubium vulgare* for Antiinflammatory, Analgesic and Anti-Microbiologic Activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **3**, 199-204.
- [28] Belhattab, R. and Larous, L. (2006) Essential oil Composition and Glandular Trichomes of *Marrubium vulgare* L. Growing Wild in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, **18**, 369-373. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2006.9699116>
- [29] El Bardai, S., Morel, N., Wibo, M., Fabre, N., Liabres, G., Lyoussi, B. and Quetin-Leclercq, J. (2003) The Vasorelaxant Activity of Marrubenol and Marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Medica*, **69**, 75-77. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-37042>
- [30] Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M. and Bailleul, F. (2012) Isolation and Pharmacological Activity of Phenylpropanoid Esters from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 389-392. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00415-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00415-9)
- [31] Kurbatova, N.V., Muzychkina R.A., Mukhitdinov, N.M. and Parshina, G.N. (2013) Comparative Phytochemical Investigation of the Composition and Content of Biologically Active Substances in *Marrubium vulgare* and *Marrubium alternidens*. *Chemistry of Natural Compounds*, **39**, 501-502. <http://dx.doi.org/10.1023/B:CONC.0000011128.64886.f4>
- [32] Nawwar Mahmoud, A.M., El-Mousallamy, A.M.D., Barakat, H.H., Buddrus, J. and Linscheid, M. (1989) Flavonoid Lactates from Leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, **28**, 3201-3206. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80307-3](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(89)80307-3)
- [33] Vergara-Galicia, J., Aguirre-Crespo, F., Tun-Suarez, A., Crespo, A.A., Estrada-Carrillo, M., Jaimes-Huerta, I., Flores-Flores, A., Estrada-Soto, S. and Ortiz-Andrade, R. (2012) Acute Hypoglycemic Effect of Ethanolic Extracts from *Marrubium vulgare*. *Phytopharmacology*, **3**, 54-60.
- [34] Meyre-Silva, C., Yunes, R.A., Schlemper, V., Campos-Buzzi, F. and Cechinel-Filho, V. (2005) Analgesic Potential of Marrubiin Derivatives, a Bioactive Diterpene Present in *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *Il Farmaco*, **60**, 312-326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.farmac.2005.01.003>
- [35] Boudjelal, A., Henchiri, C., Siracusa, L., Sari, M. and Ruberto, G. (2012) Compositional Analysis and *in Vivo* Anti-Diabetic Activity of Wild Algerian *Marrubium vulgare* L. Infusion. *Fitoteparia*, **2**, 286-292.
- [36] De Jesus, R.A. and Cechinel Filho, V. (2000) Analysis of the Antinociceptive Properties of Marrubiin Isolated from *Marrubium vulgare* L. *Phytomedicine*, **7**, 111-115. [http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80082-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80082-3)
- [37] Pukalskas, A., Rimantas Venskutonis, P., Salido, S., De Waard, P. and Van Beek, T.A. (2012) Isolation, Identification and Activity of Natural Antioxidants from Horehound (*Marrubium vulgare* L.) Cultivated in Lithuania. *Food Chemistry*, **130**, 695-701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.112>
- [38] Li, H., Wong, C., Cheng, K. and Chen, F. (2008) Antioxidant Properties *in Vitro* and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, **41**, 385-390.
- [39] Chew, K.K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan Aida, W.M. and Ho, C.W. (2011) Effect of Ethanol Concentration, Extraction Time and Extraction Temperature on the Recovery of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of *Centella asiatica* Extracts. *International Food Research Journal*, **18**, 571-578.
- [40] Ceto, X., Gutiérrez, J.M., Gutiérrez, M., Céspedes, F., Capdevila, J., Manguez, S., Jiménez-Jorquera, C. and Del Valle,

- M. (2012) Determination of Total Polyphenol Index in Wines Employing a Voltammetric Electronic Tongue. *Analytica Chimica Acta*, **732**, 172-179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.02.026>
- [41] Liao, L., Yin, X. and Wang, Z. (2012) Optimization of Total Flavonoid Extraction in *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. Using Response Surface Methodology. *Journal of Medicinal Plants Research*, **6**, 5038-5047.
- [42] Zheng, N., Wang, Z., Shi, Y. and Lin, J. (2012) Evaluation of the Antifungal Activity of Total Flavonoids Extract from *Patrinia Villosa* Juss and Optimization by Response Surface Methodology. *African Journal of Microbiology Research*, **6**, 586-593. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR11.1393>
- [43] Naczki, M. and Shahidi, F. (2004) Extraction and Analysis of Phenolics in Food. *Journal of Chromatography*, **1054**, 95-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>
- [44] Jakopic, J., Veberic, R. and Stampar, F. (2009) Extraction of Phenolic Compounds from Green Walnut Fruits in Different Solvents. *Acta Agriculturae Slovenica*, **93**, 11-15. <http://dx.doi.org/10.2478/v10014-009-0002-4>
- [45] Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E. and Rahmat, A. (2011) Effects of Solvent Type on Phenolics and Flavonoids Content and Antioxidant Activities in Two Varieties of Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 1147-1154.
- [46] Mohammedi, Z. and Atik, F. (2011) Impact of Solvent Extraction Type on Total Polyphenols Content and Biological Activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **2**, 609-615.
- [47] Iqbal, S., Younas, U., Chan, K.W., Zia-Ul-Haq, M. and Ismail, M. (2012) Chemical Composition of *Artemisia annua* L. Leaves and Antioxidant Potential of Extracts as a Function of Extraction Solvents. *Molecules*, **17**, 6020-6032. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules17056020>
- [48] Lapornik, B., Prosek, M. and Wondra, A.G. (2005) Comparison of Extracts Prepared from Plant By-Products Using Different Solvents and Extraction Time. *Journal of Food Engineering*, **71**, 214-222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036>
- [49] Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, S. (2006) Effect of Extraction Solvents on Concentration and Antioxidant Activity of Black and Black Mate Polyphenols Determined by Ferrous Tartrate and Folin-Ciocalteu Methods. *Food Chemistry*, **99**, 838-841. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.034>
- [50] Kong, K.W., Khoo, H.E., Prasad, N.K., Chew, L.Y. and Amin, I. (2013) Total Phenolics and Antioxidant Activities of *Pouteria campechiana* Fruit Parts. *Sains Malaysiana*, **42**, 123-127.
- [51] Sultana, B., Anwar, F. and Ashraf, M. (2009) Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*, **14**, 2167-2180. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14062167>
- [52] Ben Mohamed Maoulainine, L., Jelassi, A., Hassen, I. and Ould Mohamed Salem Ould Boukhari, A. (2012) Antioxidant Properties of Methanolic and Ethanolic Extracts of *Euphorbia helioscopia* (L.) Aerial Parts. *International Food Research Journal*, **19**, 1125-1130.
- [53] Pérez, M.B., Calderón, N.L. and Croci, C.A. (2007) Radiation-Induced Enhancement of Antioxidant Activity in Extracts of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chemistry*, **104**, 585-592. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.009>
- [54] Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R. and Jaafar, H.Z.E. (2010) Evaluation of *Crocus sativus* L. Stigma Phenolic and Flavonoid Compounds and Its Antioxidant Activity. *Molecules*, **15**, 6244-6256. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15096244>
- [55] Setharaksa, S., Jongjareonrak, A., Hmadhlu, P., Chansuwan, W. and Siripongvutikorn, S. (2012) Flavonoid, Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Thai Hot Curry Paste Extract and Its Ingredients as Affected of pH, Solvent Types and High Temperature. *International Food Research Journal*, **19**, 1581-1587
- [56] Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M. (2007) Effects of Extraction Time, Temperature and Solvent on Concentration and Antioxidant Activity of Grape Marc Phenolics. *Journal of Food Engineering*, **81**, 200-208.
- [57] Wina, E., Susana, I.W.R. and Tangendjaja, B. (2010) Biological Activity of Tannins from *Acacia mangium* Bark Extracted by Different Solvents. *Media Peternakan*, **33**, 103-107. <http://dx.doi.org/10.5398/medpet.2010.33.2.103>
- [58] Mazandarani, M., Zarghami Moghaddam, P., Zolfaghari, M.R., Ghaemi, E.A. and Bayat, H. (2012) Effects of Solvent Type on Phenolics and Flavonoids Content and Antioxidant Activities in *Onosma dichroanthum* Boiss. *Journal of Medicinal Plants Research*, **6**, 4481-4488. <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR11.1460>
- [59] Antwi-Boasiako, C. and Animapau, S.O. (2012) Tannin Extraction from the Barks of Three Tropical Hardwoods for the Production of Adhesives. *Journal of Applied Sciences Research*, **8(6)**, 2959-2965.
- [60] Uma, D.B., Ho, C.W. and Aida, W.M.W. (2010) Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolic Compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) Leaves. *Sains Malaysiana*, **39**, 119-128.
- [61] Chan, S.W., Lee, C.Y., Yap, C.F., Wan Aida, W.M. and Ho, C.W. (2009) Optimisation of Extraction Conditions for Phenolic Compounds from Limau Purut (*Citrus hystrix*) Peels. *International Food Research Journal*, **16**, 203-213.

- [62] Yilmaz, Y. and Toledo, R.T. (2005) Oxygen Radical Absorbance Capacities of Grape/Wine Industry Byproducts and Effect of Solvent Type on Extraction of Grape Seed Polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 41-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2004.10.009>
- [63] Butnariu, M. and Coradini, C.Z. (2012) Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers Using Spectrophotometry. *Chemistry Central Journal*, **6**, 35-42. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-153X-6-35>
- [64] Fernandes, A.J.D., Ferreira, M.R.A., Randau, K.P., De Souza, T.P. and Soares, L.A.L. (2012) Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). *The Scientific World Journal*, **2012**, Article ID: 923462.
- [65] Musa, K.H., Abdullah, A., Jusoh, K. and Subramaniam, V. (2011) Antioxidant Activity of Pink-Flesh Guava (*Psidium guajava* L.): Effect of Extraction Techniques and Solvents. *Food Analytical Methods*, **4**, 100-107. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-010-9139-3>
- [66] Downey, M.O. and Hanlin, R.L. (2010) Comparison of Ethanol and Acetone Mixtures for Extraction of Condensed Tannin from Grape Skin. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **31**, 154-159.
- [67] Medini, F., Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N. and Abdelly, C. (2011) Effects of Physiological Stage and Solvent on Polyphenol Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Limonium densiflorum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 6719-6730.
- [68] Shad, M.A., Nawaz, H., Rehman, T., Ahmad, H.B. and Hussain, M. (2012) Optimization of Extraction Efficiency of Tannins from *Cichorium intybus* L.: Application of Response Surface Methodology. *Journal of Medicinal Plants Research*, **6**, 4467-4474.
- [69] Zhao, S., Liu, J.Y., Chen, S.Y., Shi, L.L., Liu, Y.J. and Ma, C. (2011) Antioxidant Potential of Polyphenols and Tannins from Burs of *Castanea mollissima* Blume. *Molecules*, **16**, 8590-8600. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16108590>
- [70] Hismath, I., Wan Aida, W.M. and Ho, C.W. (2011) Optimization of Extraction Conditions for Phenolic Compounds from Neem (*Azadirachta indica*) Leaves. *International Food Research Journal*, **18**, 931-939.
- [71] Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sanchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., Costoya, N. and José Nunez, M. (2008) Polyphenols from Plant Materials: Extraction and Antioxidant Power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **7**, 3210-3216.
- [72] Sardsaengjun, C. and Jutiviboonsuk, A. (2010) Effect of Temperature and Duration Time on Polyphenols Extract of *Areca catechu* Linn. Seeds. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, **5**, 14-17.
- [73] Dent, M., Dragovi-Uzelac, V., Peni, M., Brncic, M., Bosiljkov, T. and Levaj, B. (2013) The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technology and Biotechnology*, **51**, 84-91.
- [74] Naczki, M. and Shahidi, F. (2006) Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1523-1542. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>
- [75] Garcia-Marquez, E., Roman-Guerrero, A., Perez-Alonso, C. and Cruz-Sosa, F. (2012) Effect of Solvent-Temperature Extraction Conditions on the Initial Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Mistle Extracts and Their Decay upon Storage at Different pH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, **11**, 1-10.
- [76] Zhekova, G. and Pavlov, D. (2012) Influence of Different Factors on Tannins and Flavonoids Extraction of Some Thyme Varieties Representatives of Thymol, Geraniol and Citral Chemotype. *Agricultural Science and Technology*, **4**, 148-153.
- [77] Liu, W., Yu, Y., Yang, R., Wan, C., Xu, B. and Cao, S. (2010) Optimization of Total Flavonoid Compound Extraction from *Gynura medica* Leaf Using Response Surface Methodology and Chemical Composition Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 4750-4763. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms11114750>
- [78] Moosophon, K., Wetthaisong, T., Seeratchakot, L. and Kokluecha, W. (2010) Tannin Extraction from Mangosteen Peel for Protein Precipitation in Wine. *KKU Research Journal*, **15**, 377-385.
- [79] Mustapha, M.B., Adefisan, H.A. and Olawale, A.S. (2012) Studies of Tannin Extract Yield from *Parkia clappertoniana*'s Husk. *Journal of Applied Sciences Research*, **8**, 65-68.
- [80] Zam, W., Bashour, G., Abdelwahed, W. and Khayata, W. (2012) Effective Extraction of Polyphenols and Proanthocyanidins from Pomegranate's Peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**, 675-682.
- [81] Druzynska, B., Stepniewska, A. and Wolosiak, R. (2007) The Influence of Time and Type of Solvent on Efficiency of the Extraction of Polyphenols from Green Tea and Antioxidant Properties Obtained Extracts. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, **6**, 27-36.
- [82] Jokic, S., Velic, D., Bilic, M., Bucic-Kojic, A., Planinic, M. and Tomas, S. (2010) Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Czech Journal of Food Sciences*, **28**, 206-212.

- [83] Perva-Uzunalic, A., Skerget, M., Knez, Z., Weinreich, B., Otto, F. and Grucher, S. (2006) Extraction of Active Ingredients from Green Tea (*Camellia sinensis*), Extraction Efficiency of Major Catechins and Caffeine. *Food Chemistry*, **96**, 597-605. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.015>
- [84] Akowuah, G.A., Mariam A. and Chin, J. H. (2009) The Effect of Extraction Temperature on Total Phenols and Antioxidant Activity of *Gynura procumbens* Leaf. *Pharmacognosy Magazine*, **5**, 81-85.
- [85] Chew, K.K., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan Aida, W.M. and Ho, C.W. (2011) Effect of Ethanol Concentration, Extraction Time and Extraction Temperature on the Recovery of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of *Orthosiphon stamineus* Extracts. *International Food Research Journal*, **18**, 427-1435.
- [86] Naeem, S., Ali, M. and Mahmood, A. (2012) Optimization of Extraction Conditions for the Extraction of Phenolic Compounds from *Moringa oleifera* Leaves. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **25**, 535-541.
- [87] Davidov-Pardo, G., Arozarena, M.R.I. and Marin-Arroyo, M.R. (2011) Stability of Polyphenolic Extracts from Grape Seeds after Thermal Treatments. *European Food Research and Technology*, **232**, 211-220. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-010-1377-5>
- [88] Biesaga, M. and Pyrzynska, K. (2013) Stability of Bioactive Polyphenols from Honey during Different Extraction Methods. *Food Chemistry*, **136**, 46-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.095>
- [89] Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F. and Siebenhandl, S. (2006) The Application of Response Surface Methodology to the Production of Phenolic Extracts of Lemon Grass, Galangal, Holy Basil and Rosemary. *International Journal of Food Science and Technology*, **41**, 121-133. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00987.x>
- [90] Al-Farsi, M.A. and Lee, C.Y. (2007) Optimization of Phenolics and Dietary Fibre Extraction from Date Seeds. *Food Chemistry*, **108**, 977-985. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.009>
- [91] Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. and Li, X. (2008) Optimisation of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Wheat Bran. *Food Chemistry*, **106**, 804-810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.062>

Scientific Research Publishing (SCIRP) is one of the largest Open Access journal publishers. It is currently publishing more than 200 open access, online, peer-reviewed journals covering a wide range of academic disciplines. SCIRP serves the worldwide academic communities and contributes to the progress and application of science with its publication.

Other selected journals from SCIRP are listed as below. Submit your manuscript to us via either [submit@scirp.org](mailto:submit@scirp.org) or [Online Submission Portal](#).

