

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

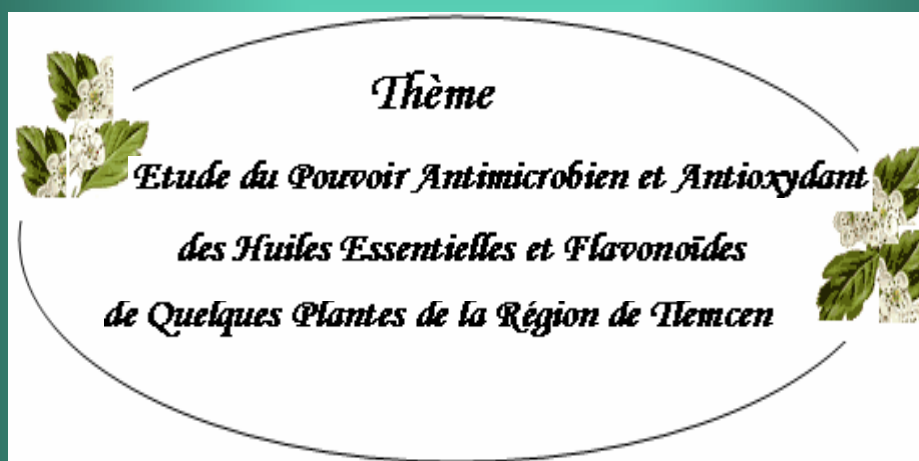
Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen

Faculté des Sciences

Département de Biologie

Laboratoire Produits Naturels

**Thèse pour l'obtention du diplôme de Magistère
En Biologie Option: Produits Naturels, Activités biologiques
et Synthèse**



Présenté par :

Mohammedi Zohra

Soutenu le :

Devant le Jury composé de:

Mr. Taleb Bendiab S.A.	Président	Professeur
Mr. Moussaoui A.	Examineur	Maître de Conférences
Mr. Benmansour A.	Examineur	Maître de Conférences
Mme. Bendimerad N.	Examinatrice	Chargée de Cours
Mme. Atik Bekkara F.	Promotrice	Maître de Conférences

Année Universitaire 2005-2006



Dédicace

Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études.

A mes sœurs et mes frères

A mes neveux : Alaa Eddine Mohammed el Habib,

Zakaria, Abd el Hadi Feth Allah et Abd el Illah

A ma nièce Douaa Fatima Zohra

A tous mes collègues et amies





Remerciements

J exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Mme. Atik Bekkara F. Maître de Conférences à la faculté des sciences, université ABB de Tlemcen pour avoir accepté de m'encadrer. Qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude et de déférence.

Je remercie Monsieur le Professeur Taleb Bendiab S.A. à l'université ABB de Tlemcen d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de ma thèse de magistère.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mr. Moussaoui A. Maître de Conférences à la faculté des sciences, université ABB de Tlemcen pour son aide et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie monsieur Benmansour A. Maître de Conférences à l'université ABB de Tlemcen d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je remercie également Mme Bendimerad N. Chargée de Cours au département de Biologie, faculté des sciences, université ABB de Tlemcen d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

J exprime mes vifs remerciements à monsieur le professeur Casanova J. de l'université de corse (France) pour sa contribution et son aide concernant la réalisation des analyses par CPG / RMN des huiles essentielles.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail. Je ne saurais remercier ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de certaines étapes de ce travail sans citer les noms, en particulier Mr Guermouche H.; Mr Chaabane sari D. ; Bouabdallah H. ; Mme Bekhchi C. ; Mohammedi B. ; Kholkhal Y. ; Djedid Z et Mme Stambouli H.

Je remercie mes collègues et mes amis pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes et des capacités antioxydantes.

Les huiles essentielles de *L. stoechas L* et *S. olusatrum L* se sont analysées par CPG/RMN ¹³C. Les constituants majeurs sont Fenchone (24,6 – 27,6%) ; 1,8 Cineole (18,9 -24,2%) ; camphène (17,7 – 22,5 %) pour la Lavande. Le Furanodiène ; Furanoélémente (46%) pour la partie aérienne de *Smyrniium* avec en plus un autre composé terpénique, en teneur notable, le furanoeremophillone (12,2%).

Différentes classes de composés phénoliques ont été identifiés par CCM avec les solvants : (chloroforme / méthanol / eau) ; (acétone / eau) ; BAW avec une prépondérance d'une classe par rapport à une autre suivant l'origine végétal de l'extrait. Dans celui de *L. stoechas*, nous avons identifié la rutine et l'acide ferulique. Dans l'extrait de *C. ladaniferus*, nous avons identifié le catéchol, alors que l'hydroquinone a été identifiée dans l'extrait de *C. oxyacantha* et la rutine dans *S. olusatrum*.

Des activités antimicrobiennes variables avec les flavonoïdes et les huiles essentielles se sont révélées sur 11 souches de bactéries; 7 espèces de moisissures et une souche de levure *C. albicans*. Alors qu'aucune activité n'a été signalée sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* (p4) et *Citrobacter* pour l'ensemble des extraits naturels.

In vitro les extraits méthanoliques flavonoïdiques ont présenté de fortes propriétés de piéger les molécules du radical libre DPPH. Les EC50 dans l'ordre du pouvoir antioxydant était : *C. oxyacantha* (2,75 µg/ml) > *L. stoechas* (5,29 µg/ml) > *S. olusatrum* (9,68 µg/ml) > *C. ladaniferus* (11,42 µg/ml).

Nous avons conclu aussi dans cette étude que les huiles essentielles possèdent la capacité antioxydante mais faible en comparaison avec les extraits flavoniques.

Mots clés : plantes médicinales, huile essentielle, flavonoïdes, pouvoir antimicrobien, DPPH, CPG, RMN-¹³C.

Abstract

The natural extracts resulting from the plants contain a variety of phenolic compounds and oils essential to which we allot an inhibiting capacity of the micro-organisms and antioxidant capacities.

Essential oils of *L. stoechas* and *S. olusatrum* were analyzed by CPG/RMN-¹³C. The major components are Fenchone (24,6 – 27,6%); 1,8 Cineole (18,9 -24,2%); camphene (17,7 – 22,5 %) for the Lavender and Furanodiène; Furanoelemene (46%) for the air part of *Smyrniium* with in more, notable content another terpenic compound, the furanoeremophillone (12,2%).

Various classes of phenolic compounds were identified by CCM with solvents: (chloroform / methanol / water); (acetone / water); BAW with a preponderance of a class compared to another according to the origin plant of the extract. In the extract of *L. stoechas*, we identified rutin and the ferulic acid. In the extract of *C. ladaniferus* we identified the catéchol, whereas hydroquinone was identified in the extract of *C. oxyacantha* and rutin in *S. olusatrum*.

Variable antimicrobial activities with the flavonoïds and essential oils appeared on 11 strains of bacteria; 7 species of moulds and a one strain of yeast *C. albicans*. Whereas no activity was announced on the strain *Pseudomonas aeruginosa* (p4) and *Citrobacter* for the whole of the natural extracts.

In vitro, the metabolic extracts presented strong properties to scavenge the molecules of free radical DPPH. The EC50 in the order of the antiradical capacity were: *C oxyacantha* (2, 75 µg/ml) > *L stoechas* (5, 29 µg/ml) > *S. olusatrum* (9, 68 µg/ml) > *C ladaniferus* (11, 42 µg/ml).

In this study, we also concluded that essential oils have the antioxidant capacity but low in comparison with the extracts flavonic.

Key words: medicinal plants, essential oil, flavonoïds, antimicrobial activity, DPPH, CPG, ¹³C-RMN

Liste des abréviations

Abs :	Absorbance
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AlCl ₃ :	Chlorure d'aluminium
ARP :	Puissance Anti-Radicalaire (ou Puissance Antioxydante)
BAW :	Butanol ; Acide Acétique ; Eau
Bu OH :	Butanol
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CDCl ₃ :	Chloroforme deutéré
cfu :	Nombre de colonie formant des unités
cm :	centimètre
CPG :	Chromatographie en Phase Gazeuse
DL :	Dose Létale
DMSO :	Diméthyl Sulfoxyde
EF :	Extrait flavonique (= Extrait Flavonoïdique= Extrait Brut)
eq :	équivalent
ERO :	espèces réactives de l'oxygène
HCl :	Acide Chlorhydrique
HE :	Huile Essentielle
HIV :	Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)
HOAc :	Acide Acétique
MC :	Milieu de Culture
Me :	Methyl
MeOH :	Méthanol
MH :	mueller Hinton
MS :	Matière Sèche
NO :	Nitric Oxide
PDA :	Potatoes Dextrose Agar
ppm :	partie par million
Qté :	quantité
Rf :	Rapport Frontal
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
TGEA :	Tryptone Glucose Extract Agar
TMS :	Trimethylsilyl
UI :	Unité Internationale
UV :	Ultra Violet
% :	Pourcentage
µg :	Microgramme
µl :	Microlitre
[] :	Concentration

Glossaire

Akène : fruit sec et indéhiscent ne contenant qu'une graine. Le nom peut aussi s'écrire achaine.

Allelopathie : C'est un phénomène où de nombreuses espèces végétales synthétisent des molécules capables d'agir sur le développement des plantes avoisinantes.

Allopathique : l'allopathie est le nom donné par Hahnemann à la médecine "classique".

Alzheimer : la maladie d'Alzheimer (MA) est une démence neurodégénérative à prédominance corticale qui touche en premier lieu les fonctions cognitives et se répercute sur le comportement et l'adaptation sociale des patients.

Analgésique : antidouleur

Androcée : ensemble des étamines (pièces mâles) d'une fleur.

Anesthésique : substance qui provoque une anesthésie

Anthère : partie de l'étamine qui contient les grains de pollen

Antidisentérique : contre la dysenterie (dysenterie : infection intestinale avec diarrhée grave).

Anti-inflammatoire : qui fait dégonfler, et diminuer l'irritation. La plupart des anti-inflammatoires sont aussi des antidouleurs.

Antiscorbutique : qui s'oppose au développement du scorbut.

Antispasmodique : substance qui permet de lutter contre les spasmes, agit généralement en empêchant la contraction des fibres musculaires de l'intestin et des voies urinaires

Anxiolytique : tranquillisant, contre les angoisses

Arbrisseau : plante ligneuse à tiges ramifiées dès la base et en général d'un mètre maximum.

Arbuste : petit arbre (en général moins de 5 m à l'âge adulte), dont le tronc est plutôt grêle.

Astringent : qui resserre et raffermi les tissus.

Bractées : feuille fréquemment colorée qui accompagne une fleur ou une inflorescence. Les bractées se trouvent souvent à la base du pédoncule.

Carminatif : qui résorbe les gaz intestinaux.

Carpelle : constituant du gynécée, formé d'un ovaire, d'un style et d'un stigmate

Cataracte : la cataracte est une zone sombre ou opaque dans le cristallin de l'œil. Cette zone d'ombre provoque des troubles de la vue.

Corymbe : grappe dont les ramifications latérales sont inégales et étalées de sorte que toutes les fleurs se trouvent à la même hauteur

Diurétique : qui favorise l'élimination de l'urine.

Fébrifuge : qui enraye la fièvre.

Emétique : qui provoque des vomissements.

Expectorant : qui calme la toux, favorise l'expulsion des sécrétions bronchiques.

Glabre : dépourvu de toute pilosité

Immunostimulant : qui amplifie des réactions de défense de l'organisme.

Involucre : ensemble des bractées insérées à la base d'une inflorescence

Laxatif : qui purge légèrement.

Narcotique : (substance) qui provoque une anesthésie générale. Un narcotique est une substance chimique capable d'induire, chez l'homme et chez l'animal, un état proche du sommeil.

Œdème : hyperhydratation extra-cellulaire provoquée par une rétention de sodium et d'eau dans les espaces interstitiels.

Ombelle : inflorescence à fleurs pédicellées, toutes insérées au même niveau du sommet d'un axe et disposées sur un même plan

Pédoncule : terme désignant la tige (ou queue) d'une fleur, distincte de la tige de la plante.

Pétale : partie de la fleur située entre les sépales et les organes reproducteurs. Les pétales composent la corolle. Ils sont fixés au calice par un onglet.

Pivotant : se dit d'une racine très grosse par rapport aux racelles et s'enfonçant verticalement dans le sol.

Prébiotique : les prébiotiques sont des glucides non assimilables par notre organisme.

Psoriasis : affection de la peau (fréquente et tenace)

Sédatif : un sédatif est une substance qui a une action dépressive sur le système nerveux central et qui entraîne un apaisement, une relaxation, une réduction de l'anxiété, une somnolence, un ralentissement de la respiration, une démarche chancelante, des troubles jugement et une diminution des réflexes.

Sépale : chacune des pièces formant le calice d'une fleur. Moins apparents que les pétales, les sépales sont généralement de couleur verte ou brune. On les remarque surtout quand la fleur est en bouton.

Stomachique : qui favorise la digestion.

Styles : filament reliant l'ovaire au stigmate, au centre de la fleur.

Teinture : solution obtenue en laissant une certaine quantité de drogue desséchée au contact d'un solvant pour un temps plus ou moins long.

Liste des figures

Fig. 01: Structure de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles.....	8
Fig. 02 : Glande simple, entièrement chargée d'huile et en forme de dôme.....	9
Fig. 03 : Les poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'un origan.....	9
Fig. 04 : Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle à partir de l'acétyl CoA.....	11
Fig. 05 : Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes.....	12
Fig. 06 : Structure de quelques composés phénoliques.....	16
Fig. 07 : structure du flavylum.....	16
Fig. 08 : Squelette de base des flavonoïdes.....	18
Fig. 09 : Biosynthèse des flavonoïdes.....	19
Fig. 10: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	26
Fig. 11: Photo de la plante <i>L. stoechas</i> L poussant dans la région de <i>Oum El Alou</i>	30
Fig. 12: Photo <i>C. ladaniferus</i> de la région de Sidi M'hamed.....	34
Fig. 13: Photo <i>C. oxyacantha</i> L de la région de <i>Oum el Alou</i>	37
Fig. 14: Oligomères procyanidines.....	38
Fig. 15: Photo de <i>S. olusatrum</i> de la région de <i>Oum el Alou</i>	41
Fig. 16: Carte géographique de la région de Tlemcen montrant les trois stations de récolte (site web : www.profburp.free.fr/carte/).....	44
Fig. 17: Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle.....	46
Fig. 18: Schéma du dispositif de l'entraînement à la vapeur pour l'extraction des huiles essentielles.....	46
Fig. 19: Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	48
Fig. 20: Forme libre et réduite du DPPH.....	55
Fig. 21: Teneur en humidité des quatre plantes médicinales.....	58
Fig. 22: Rendement en huile essentielle obtenue par hydrodistillation.....	59
Fig. 23: Densité des huiles essentielles.....	60
Fig. 24: Rendement en extrait sec.....	60
Fig. 25a: Distribution en fonction du pourcentage des différents composants existant dans l'huile essentielle de la feuille de <i>Lavandula stoechas</i> de <i>Oum el Alou</i>	62
Fig. 25b: Distribution en fonction du pourcentage des différents constituants de l'huile essentielle extraite des feuilles et graines de <i>Lavandula stoechas</i> de <i>Oum el Alou</i>	63
Fig. 26: Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i> de <i>Aïn fezza</i> (feuilles et graines).....	63
Fig. 27: Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle de <i>Smyrniolum olusatrum</i> de <i>Oum el Alou</i> (partie aérienne).....	63
Fig. 28a: Courbe d'étalonnage des polyphénols.....	65
Fig. 28b: Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.....	66
Fig. 29: Teneur en polyphénols totaux (g/100g de poids sèche de la plante).....	66
Fig. 30: Teneur en flavonoïdes en mg/100g de plante sèche en poudre.....	67
Fig. 31: Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits bruts par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV).....	74
Fig. 32: Photos montrant l'effet de quatre solvant sur la culture de <i>Rhizopus stolonifer</i>	76
Fig. 33: Antibiogramme.....	77
Fig. 34: Antifongogramme.....	79

Fig. 35: Photo montrant l'activité de la nystatine (30 ppm/disque) sur la levure <i>Candida albicans</i>	79
Fig. 36: Effet de l'extrait flavonique du Ciste (30 ppm/disque) sur la levure <i>Candida albicans</i>	82
Fig. 37: Résultat du criblage du pouvoir antimicrobien des extraits naturels réalisé par la méthode des disques.....	83
Fig. 38: Effet des extraits naturels sur la densité de croissance microbienne dans un milieu liquide.....	86
Fig. 39 : Exemples de l'effet des huiles essentielles sur la croissance des moisissures.....	90
Fig. 40: Activité des extraits flavonoïdiques sur la croissance des moisissures (exprimée en pourcentage d'inhibition).....	93
Fig.41: Photos démontrant l'activité des extraits flavonoïdiques sur la croissance mycélienne (annexes)	
Fig. 42 : La concentration de l'extrait flavonique qui réduit la colonie mycélienne de 50%.....	94
Fig. 43: Résultat du test antioxydant au DPPH.....	99
Fig. 44 : Réduction du DPPH dans le temps.....	102
Fig. 45: Histogrammes de comparaison.....	103
Fig. 46: Histogrammes de comparaison de la puissance antioxydante.....	103

Liste des tableaux

Tableau 01 : Bioactivité de quelques principes des huiles essentielles.....	14
Tableau 02 : Sources alimentaires des flavonoïdes.....	20
Tableau 03 : Contenu en flavonoïdes dans quelques aliments végétaux.....	21
Tableau 04: Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	23
Tableau 05: Profils aromatique des espèces de <i>Lavandula</i>	32
Tableau 06: Composants chimiques de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i>	36
Tableau 07: Composition de l'huile essentielle de <i>Smyrniolum olusatrum</i>	42
Tableau 08: Situation géographique des stations de récolte.....	43
Tableau 09: Organes végétaux destinés pour l'extraction.....	43
Tableau 10: La source des souches concernées par les tests.....	51
Tableau 11: Liste des antibiotiques et des valeurs de références.....	11
Tableau 12: Concentrations expérimentées pour l'essai antifongique.....	54
Tableau 13: Concentrations testées dans le test antioxydant.....	56
Tableau 14 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i> de deux régions différentes.....	61
Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Smyrniolum olusatrum</i> de la région de <i>Oum el Alou</i>	62
Tableau 16: Les classes des composés phénoliques identifiés dans les extraits flavoniques - Système solvant : BAW.....	69
Tableau 17: Résultat de la chromatographie sur couche mince des extraits bruts flavoniques - Système solvant : Acétone / Eau.....	71
Tableau 18: Les composés phénoliques identifiés dans l'extrait brut de <i>Lavandula</i> , <i>Cistus</i> et <i>Crataegus</i> - Système solvant : Chloroforme/Méthanol/Eau.....	72
Tableau 19: Influence des solvants sur la croissance de <i>Rhizopus stolonifer</i>	75
Tableau 20: Résultat de l'Antibiogramme.....	77
Tableau 21a: Antifongigramme représentant le diamètre de la colonie mycélienne en cm.....	78
Tableau 21b : Antifongigramme : activité de la Mycostatine sur la croissance de la levure.....	78
Tableau 22 : Activité des huiles essentielles et extraits flavoniques.....	80
Tableau 23: Les concentrations inhibant 50% la population microbienne.....	87
Tableau 24a: Effet de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> sur le diamètre (cm) des colonies mycéliennes.....	88
Tableau 24b: Effet de l'huile essentielle de <i>C. ladaniferus</i> sur le diamètre (cm) des colonies mycéliennes.....	88
Tableau 25 : Activité des extraits flavonoïdiques sur la croissance des moisissures.....	91
Tableau 26 : Valeur des IC50 en µl/ml.....	94
Tableau 27: Résultat du test fongistatique / fongicide.....	96
Tableau 28 : Résultat de l'essai antioxydant (annexes)	
Tableau 29: EC50 et puissance antioxydante (ARP) des extraits naturels et les standards.....	29

Sommaire

Partie bibliographique

Introduction.....	1
1^{er} Chapitre : I - Les plantes et la médecine	
I-1. Historique.....	3
I-2. Domaines d'application.....	4
2^{ème} Chapitre : II - Les substances actives : huiles essentielles et flavonoïdes	
II-1. Les huiles essentielles.....	6
II-1-1. Définition.....	6
II-1-2. Rôle physiologique.....	6
II-1-3. Méthodes d'extraction.....	6
II-1-4. Composition chimique des huiles essentielles.....	7
II-1-5. Localisation et lieu de synthèse.....	7
II-1-6. Biosynthèse.....	9
II-1-7. Facteurs influençant la composition chimique.....	12
II-1-8. Activités biologiques.....	13
II-2. Les composés phénoliques.....	15
II-2-1. Généralités.....	15
II-2-2. Rôle physiologique.....	17
II-2-3. Les flavonoïdes.....	18
II-2-3-1. Structure des flavonoïdes.....	18
II-2-3-2. Biosynthèse des flavonoïdes.....	18
II-2-3-3. Localisation des flavonoïdes.....	20
II-2-4. Intérêt biologique des flavonoïdes et composés phénoliques.....	23
3^{ème} Chapitre : III- Le stress oxydatif	
III-1. Définition.....	24
III-2. Origine du stress.....	24
III-3. Les radicaux libres.....	24
III-3-1. Définition.....	24
III-3-2. Principaux radicaux libres.....	24
III-3-3. Origine des radicaux.....	25
III-4. Conséquences du stress oxydant.....	25
4^{ème} Chapitre : IV- Les antioxydants	
IV-1. Définition.....	27
IV-2. Les antioxydants endogènes.....	27
IV-3. Les antioxydants naturels.....	28
5^{ème} Chapitre : V- Les plantes médicinales sélectionnées	
V-1. <i>Lavandula stoechas</i> L.....	30
V-2. <i>Cistus ladaniferus</i> L.....	34
V-3. <i>Crataegus oxyacantha</i> L.....	37

V-4. <i>Smyrniium olusatrum</i> L.....	40
--	----

Partie pratique

6^{ème} Chapitre : Matériel et méthodes

I- Matériel végétal.....	43
I-1. Récolte des plantes.....	43
I-2. Conservation.....	43
I-3. Détermination de l'humidité.....	43
II- Les huiles essentielles.....	45
II-1. Procédé d'extraction.....	45
II-2. Calcul du rendement.....	45
II-3. Mesure de la densité.....	46
II-4. Analyse de la composition chimique de l'huile par CPG et ¹³ C-RMN.....	47
II-4-1. Principe.....	47
II-4-2. Conditions opératoires.....	47
III- Les flavonoïdes.....	48
III- 1. Protocole d'extraction.....	48
III- 2. Détermination du rendement.....	48
III- 3. Mise en évidence des flavonoïdes.....	49
III- 4. Dosage des polyphénols.....	49
III-5. Dosage des flavonoïdes.....	49
III-6. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince "CCM".....	49
IV- Tests microbiologiques.....	50
IV- 1. Les souches tests.....	50
IV-2. Conservation des souches.....	50
IV-3. Les milieux de cultures.....	50
IV-4. Préparation des précultures.....	50
IV-4-1. Précultures des levures et bactéries.....	50
IV-4-2. Précultures des moisissures.....	51
IV- 5. Techniques microbiologiques.....	52
IV- 5-1. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques.....	52
IV-5-1-1. Principe.....	52
IV-5-1-2. Choix des antifongiques et antibiotiques.....	52
IV-5-1-3. Méthodes d'étude.....	52
IV-5-2. Test du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et flavonoïdes.....	53
IV-5-2-1. Test préliminaire.....	53
IV-5-2-2. Essai antifongique et antimicrobien.....	53
IV-5-3. Mesure spectrophotométrie de l'activité antimicrobienne.....	55
V- Test antioxydant Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH.....	55
V-1. Préparation de la solution DPPH.....	56
V-2. Solution d'extrait.....	56
V-3. L'essai au DPPH.....	56
V-4. Expression des résultats.....	57
VI- Etude statistique.....	57

7^{ème} Chapitre : Résultats et Discussion

I- Résultats de l'étude phytochimique.....	58
1- Le taux d'humidité.....	58
2- Le rendement en huile essentielle.....	58
3- Densité de l'huile essentielle.....	59
4- Extraction des flavonoïdes : rendement en extrait sec.....	60
5- Composition chimique des huiles essentielles : analyse par CPG et RMN- ¹³ C.....	61
6- Teneur en polyphénols et flavonoïdes.....	65
7- Résultat de la chromatographie sur couche mince des extraits bruts méthanoliques....	67
II- Résultats du test du pouvoir antimicrobien.....	75
1- résultat du test préliminaire.....	75
2- Résultat de l'Antibiogramme et l'Antifongigramme.....	77
3- Résultat du test du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et flavonoïdes.....	80
A/ résultat de l'activité antimicrobienne (bactéries et levure) testée par la méthode des disques.....	80
B/ Résultat de l'étude spectrophotométrique du pouvoir antimicrobien.....	83
C/ Résultat de l'activité antifongique (moisissures) testée par la méthode de contact direct.....	88
D/ Activité fongistatique/fongicide.....	95
III- Résultats du test du pouvoir antioxydant.....	97
Conclusion.....	140

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Un grand nombre de plante, aromatiques, médicinales, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folklorique. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font et reste l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles.

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes et dérivés, des terpènes, stéroïdes et des composés polyphénoliques (**Bahorun, 1997**).

Beaucoup de métabolites secondaires sont également important pour notre alimentation (goût, couleur), alors que d'autres parmi alcaloïdes, anthocyanines, flavonoïdes, quininés, lignanes, les stéroïdes, et les terprnoïdes ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des drogues, colorants, arômes, parfums et des insecticides (**Teixeira da Silva, 2004**).

Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde, avec une avalanche de beaucoup de plantes utilisées comme herbes, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. C'est en grande parti dû à la géographie vaste englobant une masse de terre approximativement de 216, 634.000 hectares de secteurs forestiers fermés. Plus de 5.000 de substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entres elles se sont avérées utile dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies. Malgré la nature hétérogène du continent, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents chimiothérapeutiques et prophylactiques de ces plantes (**Farombi, 2003**).

C'est pourquoi, nous nous somme intéressé à étudier certaines plantes, poussant à l'état spontané dans les monts de la région de Tlemcen, et qui sont moins fréquemment employé ou sans application par la popu

Ce travail vise à étudier l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits de quatre plantes, à savoir les huiles essentielles et les flavonoïdes. Ces plantes sont *Lavandula stoechas L* ; *Cistus ladaniferus L* ; *Crataegus oxyacantha L* et *Smyrniolum olusatrum L*.

Notre travail sera donc réparti en sept chapitres, initié par une recherche bibliographique où nous apportons dans le premier chapitre un abrégé de l'histoire de l'utilisation des plantes médicinales au cours des siècles. Le deuxième chapitre élucide la composition, la biosynthèse et les activités biologiques de deux groupes importants des métabolites secondaires produits par ces plantes et qui sont les huiles essentielles et les flavonoïdes. Le troisième et quatrième chapitre définissent le stress oxydant et les antioxydants et donnent leur relation avec les radicaux libres, ainsi le quatrième chapitre explique pourquoi les substances phytochimiques spécialement les flavonoïdes font l'objet récemment de recherches très poussées dans la médecine. Le dernier chapitre de la partie bibliographique expose les plantes médicinales choisies pour l'étude du pouvoir antimicrobien et antioxydant. La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier (6^{ème} chapitre) présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir :

- Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation et entraînement à la vapeur. Extraction des composés phénoliques par macération douce par des solutions alcooliques.
- Les analyses de la composition chimique par CPG / RMN-¹³C pour les huiles volatiles et des CCM pour les flavonoïdes.
- Les méthodes du test de sensibilité des bactéries et mycètes vis-à-vis des extraits naturels.
- Estimation au moyen du DPPH de la capacité des extraits végétaux à piéger les radicaux libres.

En fin le septième chapitre discute les résultats obtenus dans cette étude.

Nous rapportons aussi une étude comparative sur les propriétés antimicrobienne et antioxydante des différents extraits obtenus afin de choisir les composés les plus efficaces.

Bibliographie

I- Les plantes et la Médecine

I-1. Historique

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (**Nostro et al., 2000**) et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes normaux sans effets secondaires et bien sûr coût élevé de médecine conventionnelle (**Schnaubelt, 1998**).

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le *métabolisme secondaire*. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (8000 ans av. J.C.). L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade (**Fouché et al., 2000**).

Dans les civilisations chinoise, indienne (médecine ayurvédique) ou aztèque, on trouve la trace d'utilisations médicinales très anciennes. Le premier livre de matière médicale, le Shen Nung Ben Cao jing ("Traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung"), fut rédigé vers 2900 avant J.-C. 4000 ans avant J.-C., les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner : 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrits par les Egyptiens (**Fouché et al., 2000**). Le soin de la peau a commencé 3.000 ans avant naissance du Christ, quand les Egyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphique le soin de la peau sur des peintures de mur de temple (**Dweck, 2002**).

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5^e siècle av. J.-C.), utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou des émétiques (vomitifs). Théophraste (370-285 av. J.-C.) classe les plantes dans son ouvrage *Historia plantarum* (**Fouché et al., 2000**).

A l'apogée de l'empire arabe (dont les frontières allaient de l'Inde à l'Espagne), tous les documents écrits furent réunis à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque (entre le 7^e et 9^e siècle). Les Arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie : Abu Bakr al-Razi ou Rhazès (865-925), fut l'un des grands médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina ou Avicenne (980-1037) qui écrivit le "*Canon de la médecine*". Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650. Ibn al Baytar (1197-1248) rédigea le très complet Somme des Simples : ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier étaient connues des auteurs grecs (**Fouché et al., 2000**).

I-2. Domaines d'application des plantes médicinales

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi synthèse (**Bahorun, 1997**).

Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement, parce que les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable. Ainsi, une recherche de nouvelles drogues est un choix normal (**Scientific Correspondence, 2003**).

- ❖ Utilisation en médecines en tant que médicament pour l'homme ; exemple :
 - en urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux, (**Svoboda et Hampson, 1999**).
 - systèmes cardiovasculaires, ex : Flavocoe est un médicament constitué par la flavone non substitué en combinaison avec la rutine et isoquercétine est utile dans le traitement de l'athérosclérose (**Narayana et al., 2001**).
 - drogues immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoires (*Melaleuca alternifolia*, *Echinacea angustifolia*, *Chrysanthemum parthenium*, *Achillea millefolium*,...etc.) (**Svoboda et Hampson, 1999 ; Pedneault et al., 2001; Amjad Hossain, 2005**).
 - contre le diabète (*Azadirachta indica*) (**Amjad Hossain, 2005**).
 - les maladies du stress, des activités antioxydantes ; tels le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composé phénoliques, parmi lesquels theaflavine, le resveratrol, le gallate et epigallocatechine procyanidine, très étudié en raison de leur rôle en tant qu'agent chemopréventifs basés sur leurs capacités antioxydantes (**Lee et al., 2003**). D'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives ont été mises en évidence pour les huiles essentielles de romarin, sauge, thym, origan, sarriette, clou de girofle, gingembre et curcuma (**Cuvelier et al., 1990, 1992, 1996**).
 - Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire: Les produits naturels des plantes depuis des périodes très anciennes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ex: la quinine obtenue à partir du quinquina "*Cinchona*" a été avec succès employée pour traiter le malaria (**Dastidar et al., 2004**), l'arbre de thé (*Melaleuca alternifolia*) est renommé pour ses propriétés : antibactériennes, anti-infectieux, antifongiques, antivirales (**Svoboda et Hampson, 1999**), aussi comme antiviral (*Azadirachta indica*, *Aloe vera*, *Andrographis paniculata*, *Withania somnifera*, *Astragalus membranaceus*, *Curcuma longa*...etc.) (**Amjad Hossain, 2005; Lyons et Nambiar, 2005**) mais aucune plante n'est aussi efficace que les médicaments antirétroviraux pour arrêter la réplication du VIH (**Lyons et Nambiar, 2005**), antibactérienne (*Azadirachta indica*), antifongiques (*Adenocalyma alleaceum*, *Allium ampeloprasum*, *Allium ramosum*, *Allium sativum*, *Tulbaghia violacea*, *Capsicum annum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens*) (**Wilson et al., 1997**).

❖ En Agriculture exemple : l'arbre *Azadirachta indica*, qui se développe dans tout le subcontinent indien, est une des plantes médicinales les plus importantes au Bangladesh, de 12 à 18 mètres de hauteur avec un périmètre atteignant jusqu'à 1,8 à 2,4 mètres. Les huiles de cet arbre ont des utilisations dans l'agriculture dans le contrôle de divers insectes et nématodes (vers parasites) (**Amjad Hossain, 2005**).

❖ En alimentation

- assaisonnements, des boissons, des colorants (**Svoboda et Hampson, 1999; Porter, 2001**) et des composés aromatiques (**Smallfield, 2001**). Les épices et les herbes aromatiques utilisées dans l'alimentation sont pour une bonne part responsables des plaisirs de la table (**Delaveau, 1987**), considérées comme condiments et aromates. La popularité des épices et herbes aromatiques a été et reste très liée à leurs propriétés organoleptiques. La notion de flaveur des épices et aromates recouvre l'ensemble des perceptions olfacto-gustatives. Ces perceptions résultent de stimuli générés par une multitude de composés organiques dont certains sont volatils et constituent ce qu'on appelle en général l'huile essentielle, les autres non volatils, sont plus particulièrement responsables de la saveur et de la couleur (**Richard et Multon, 1992; Takeoka, 1998; Belitz et Grosch, 1999**).

❖ En cosmétique

- des produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène (**Porter, 2001**).

❖ Des suppléments diététiques (**Smallfield, 2001**).

II- les substances actives (huiles essentielles et flavonoïdes)

II-1. Les huiles essentielles

II-1-1. Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur ou des solvants (**Smallfield, 2001**). Pour la 8^e édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont : «des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenu dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. » (**Bruneton, 1993**).

II-1-2. Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (**Rai et al., 2003**).

Il y a beaucoup de spéculation au sujet du " rôle " d'huiles essentielles des plantes. Certainement plusieurs effets apparent " utiles " ont été décrits: réduction de la compétition des autres espèces de plante (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, et protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides, et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux (**Porter, 2001**).

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservent l'humidité des plantes dans les climats désertiques (**Belaïche, 1979**).

II-1-3. Méthodes d'extraction

(**Alkire et Simon, 1992; Bruneton, 1993; Parfum – L'expo, 2002; Sousa et al., 2002 ; Adio, 2005**)

❖ Enfleurage et Macération

Cette technique, la plus ancienne, très coûteuse et peu employée aujourd'hui. On l'emploie pour des fleurs sensibles, ne supportant pas un chauffage trop élevé, comme par exemple le jasmin, la violette et la rose. Les fleurs sont mises à macérer dans des graisses ou des huiles et chauffées (bain-marie ou soleil) et étalées sur des châssis en bois pendant plusieurs jours. Une fois gorgés de parfum, les corps gras sont filtrés au travers de tissus de lin ou de coton. Les huiles sont ensuite lavées à l'alcool pur, filtrées et évaporées.

❖ Expression

C'est une technique simple où les écorces des agrumes sont pressées à froid pour extraire leurs huiles essentielles.

❖ Distillation : Hydrodistillation

La distillation est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles.

Les extraits végétaux sont chauffés jusqu'à ébullition; l'huile essentielle s'évapore alors avec les vapeurs dégagées, puis est condensée (elle redevient liquide lorsqu'on la refroidit) et séparée de l'eau.

❖ L'entraînement à la vapeur sèche

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur sèche a été mis au point. La masse végétale repose sur une grille vers laquelle la vapeur sèche est pulsée. Les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent. Ces dernières sont alors vaporisées et condensées dans un serpentin réfrigéré. La récupération de l'huile essentielle est la même que dans le cas de l'hydrodistillation.

❖ L'extraction aux solvants volatils

Cette technique est elle aussi utilisée avec des fleurs ne supportant pas la chaleur, la distillation ne convient que pour les végétaux dont le rendement en huile essentielle est suffisamment important, les solvants très volatils par exemple l'éther, et l'hexane qui s'évaporent rapidement sont employées. Le solvant lave la matière première qui subira après décantation et concentration, une distillation partielle. Ce solvant volatil est alors séparé de la "concrète" par filtrage, puis glaçage de -12°C à -15°C . La précieuse substance ainsi obtenue est à nouveau filtrée et concentrée à faible pression.

❖ L'extraction au CO_2 supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique : le CO_2 . Sous pression et à température supérieure à 31°C , le gaz carbonique se trouve dans un état "supercritique", la matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO_2 est introduit sous pression et réfrigéré. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO_2 reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé. L'extrait végétal est isolé, les matières premières ainsi obtenues sont proches du produit naturel d'origine sans trace résiduelle de solvant.

II-1-4. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles volatiles sont les mélanges très complexes, les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$. Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (**Svoboda et Hampson, 1999**). La **figure 01** présente la structure de quelques composants retrouvés dans l'huile essentielle.

II-1.5. Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, des rhizomes, fruits et des graines. La synthèse et l'accumulation sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (**fig. 02 et fig. 03**), souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à l'huile essentielles des Lauraceae ou des Zingiberaceae, poils sécréteurs des Lamiacées, des poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae (**Bruneton, 1993**). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe (**Fahn, 1979; Fahn, 1988**).

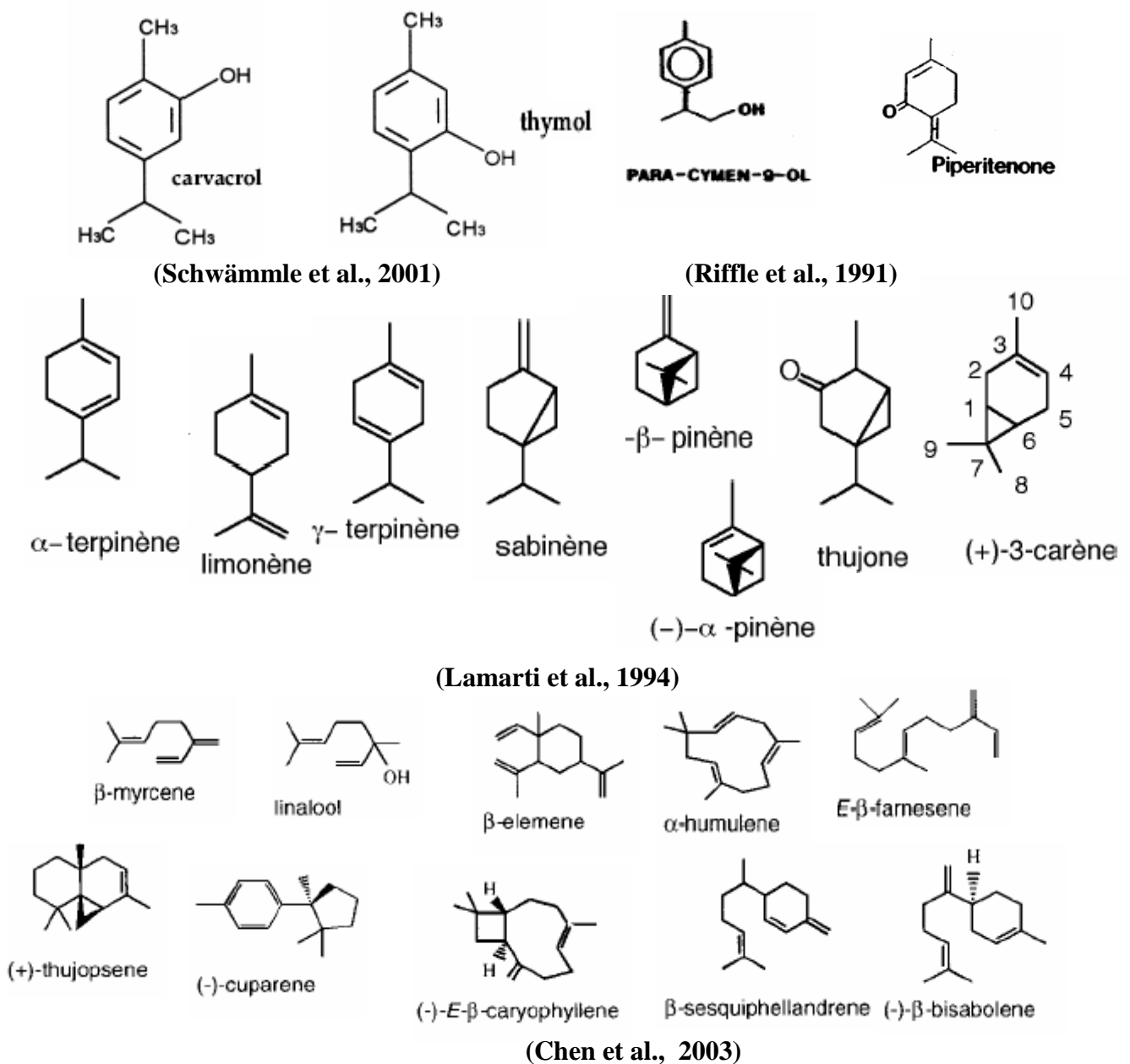


Fig. 01: Structure de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles.

Les trichomes glandulaires sont les sites primaires de la biosynthèse d'huile essentielle, et les plantes qui manquent de telles structures spécialisées synthétisent et amassent seulement des traces de monoterpènes. En conséquence, la dynamique du développement de ces structures ainsi que le process(s) sécrèteur d'huile et le mécanisme(s) ont une incidence directe avec la production de l'huile/ le potentiel du système producteur (Sharma et al., 2003).

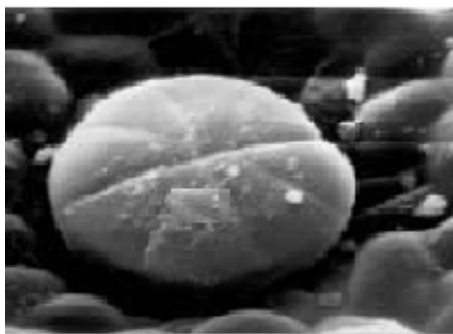


Fig. 02 : Glande simple, entièrement chargée d'huile et en forme de dôme (800 x) (Sharma et al, 2003).



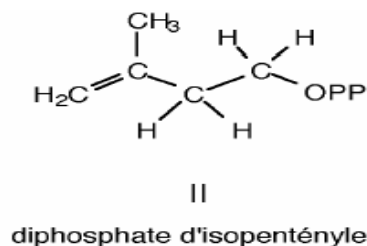
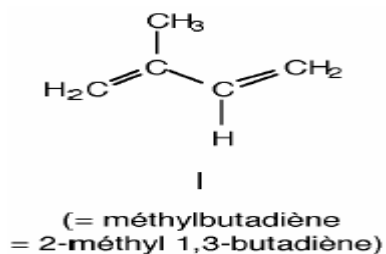
Fig 03 : Les poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'un origan (Porter, 2001).

II-1-6. Biosynthèse

Les huiles essentielles produits du métabolisme secondaire des plantes, se composent généralement de:

1. Les matériaux volatils synthétisés via le précurseur isopentenyl pyrophosphate (IPP), consistent en des mélanges complexes se composants des mono-sesquiterpène hydrocarbonés et des matériaux oxygénés dérivé d'eux.
2. phényl Propanoïdes de la voie acide shikimique, et leurs produits de biotransformation. (Hatanaka et al., 1987).

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈) reconnue par Wallach dès 1887. Cet isoprène (I) est à la base du concept de la "règle isoprénique" énoncée en 1953 par Ruzicka et complétée par Lynen et al. (1958) et Bloch et al. (1959). Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (II), désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique ; d'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel on les désigne également.



La voie la plus couramment admise pour la synthèse de la molécule d'IPP consiste à la condensation de deux molécules d'acétyl CoA pour former de l'acétoacétyl CoA (**fig. 04**). Cette réaction est d'abord catalysée par une acétoacétyl CoA thiolase, couplée à une Fe(2)quinone. Puis l'HMG CoA synthétase catalyse la fixation d'une troisième molécule d'acétyl CoA qui donne le β -hydroxy- β -méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA). L'HMG CoA est aussi un substrat pour 2 autres enzymes spécifiques, l'HMG CoA lyase (HMGL) et la 3-méthylglutaconyl CoA hydratase (MGH). Cette fixation d'un acétyl CoA sur un groupement carbonyle est semblable à la réaction permettant l'entrée de l'acétyl CoA dans le cycle de Krebs par condensation sur l'acide oxaloacétique. La réduction de la fonction acide (engagée dans une liaison thioester) en alcool est catalysée par l'HMG CoA réductase et donne l'acide mévalonique.

Un groupement diphosphate va ensuite être fixé sur la fonction alcool primaire de l'acide mévalonique. Le mévalonate 5-diphosphate ainsi formé va réagir avec une troisième molécule d'ATP ; cette réaction fournit un composé instable qui se décompose spontanément en perdant la fonction alcool tertiaire et le groupement carbonyle libre. Ainsi est élaboré un dérivé à 5 atomes de carbone, le diphosphate d'isopentényle (IPP), qui est la forme biologiquement active de la molécule isoprénique.

L'IPP est l'intermédiaire clé dans la formation des composés terpéniques (**fig. 05**). La première étape de la formation des diphosphates des prényles est l'isomérisation de l'IPP en diphosphate de diméthylallyle (DMAPP). Cette réaction est catalysée par une enzyme hydrosoluble, l'isopentényl diphosphate isomérase (**Lamarti et al., 1994; Dudareva et al., 2005**).

Les terpénoïdes sont classés selon le nombre d'unités isoprène en une série de structures homologues : hemiterpènes C5 (1 unité isoprène), monoterpènes C10 (2 unités isoprènes), sesquiterpènes C15 (3 unités isoprènes), diterpènes C20 (4 unités isoprènes), triterpènes C30 (6 unités isoprène), tetraterpène C40 (8 unités isoprène), polyterpènes (C5)_n où n peut être 9-30 000.

La biosynthèse des terpénoïdes implique l'addition de l'unité isoprène avec son isomère pour former le geranyl diphosphate (GPP, C10), condensé avec une autre unité IPP forment le diphosphate de farnesyl (FPP, C15) à l'origine des sesquiterpènes. Les précurseurs parentaux compte tenu de la modification structurale par l'oxydation, la réduction, l'isomérisation, l'hydratation, la conjugaison et/ou d'autres transformations donnent une variété de terpénoïdes (**Dubey et al., 2003**).

Les systèmes enzymatiques: les systèmes hydrosolubles et les systèmes membranaires permettent l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones (**fig. 05**). Les enzymes impliquées sont, d'une part, une isomérase et, d'autre part, une ou plusieurs prényltransférases (**Bruneton, 1993**).

Les monoterpènes sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des huiles essentielles (**Bruneton, 1993**).

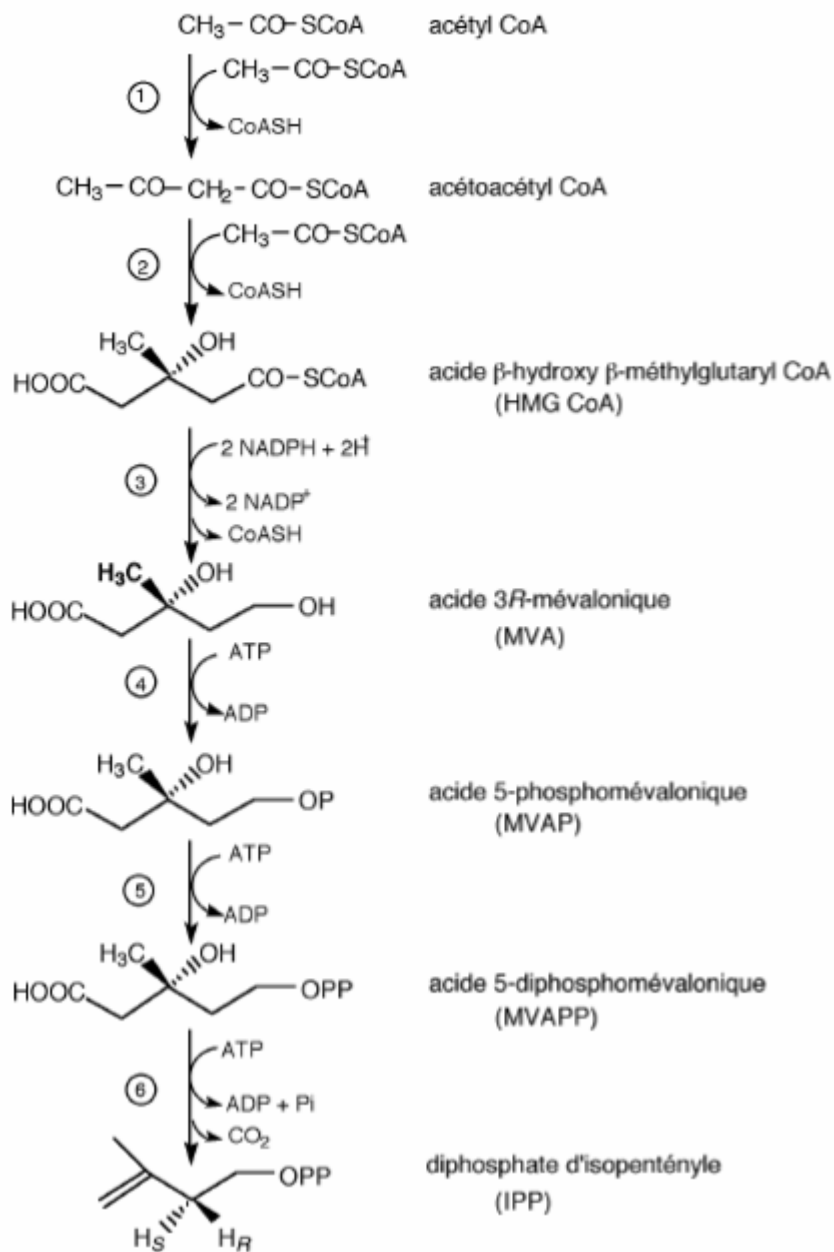


Fig. 04 : Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle à partir de l'acétyl CoA (Lamarti et al., 1994).

1 : acétoacétyl CoA thiolase
 2 : HMG CoA synthétase
 3 : HMG CoA réductase

4 : mévalonate kinase
 5 : mévalonate 5-phosphate kinase
 6 : mévalonate 5-diphosphate décarboxylase

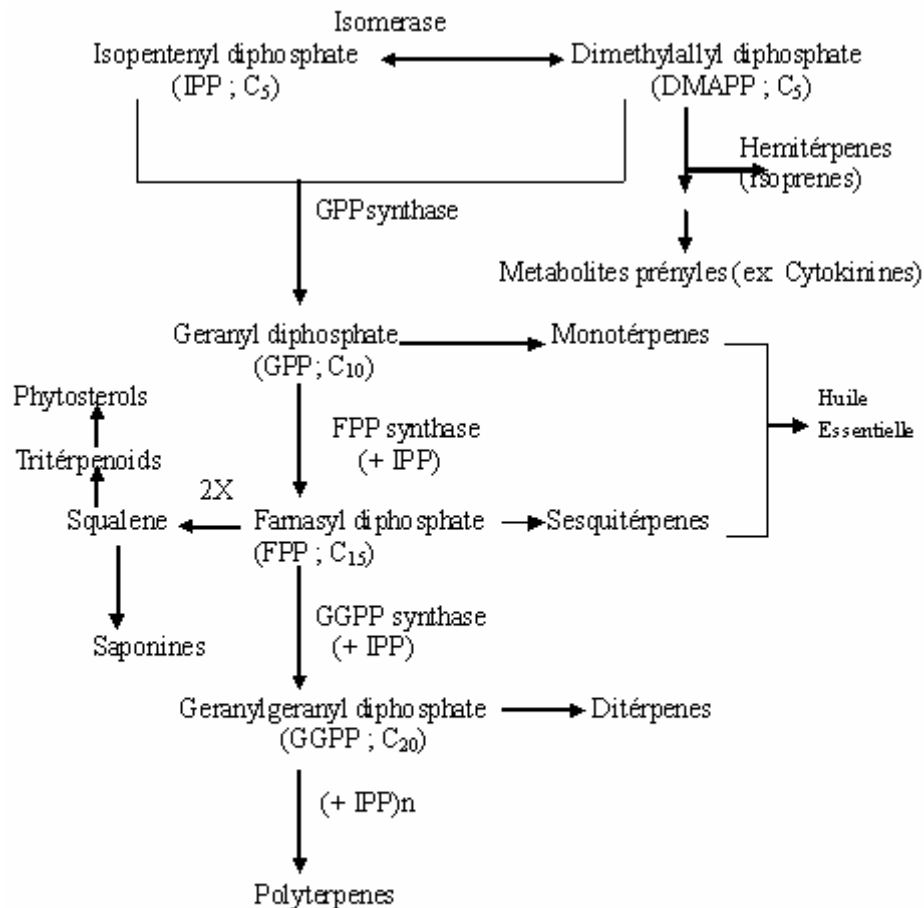


Fig. 05 : Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes (Dubey et al., 2003).

II-1-7. Facteurs influençant la composition

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : L'environnement, le génotype, origine géographique, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, la température et durée de séchage, les parasites, les virus et mauvaises herbes (Svoboda et Hampson, 1999; Smallfield, 2001). C'est ainsi que l'action des huiles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Svoboda et Hampson, 1999).

Ajouter à la complexité d'huiles volatiles (Svoboda et Hampson, 1999), les proportions des différents constituants d'une huile essentielle peuvent varier de façon importante tout au long du développement, aussi les chimiotypes ou races chimiques sont très fréquents chez les plantes aromatiques exemple, on compte pour *Thymus vulgaris* ; espèce morphologiquement homogène sept chimiotypes différents (Bruneton, 1993).

Les conditions principales requis pour une production rentable en huile essentielle sont: bon matériel végétal, variété de la plante, le sol, équipement de distillation, le climat, (Smallfield, 2001).

II-1-8. Activités biologiques

- les huiles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums (Smallfield, 2001).
- ont des propriétés antiseptiques pour les poumons (*Eucalyptus*), dépuratives ou cicatrisantes (Lavande) (Caillard, 2003), activité analgésique (Origan, Thym) (Schwämmle et al., 2001).
- Activité antimicrobienne et antiparasitaire : terpènes ou terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires. En 1977 a été signalé que 60% des dérivés des huiles essentielles examinés jusqu'au 1999 sont inhibiteurs de mycètes tandis que 30% inhibent les bactéries. Le triterpénoïde, l'acide betulinique est de juste un de plusieurs terpénoïdes qui ont montrés une action inhibitrice envers HIV. Le mécanisme de l'action des terpènes n'est pas entièrement compris mais on pense qu'il s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles (Cowan, 1999).

Le carvacrol, thymol possède une activité antibactérienne, activité antifongique contre les mycètes phytopathogène (Schwämmle et al., 2001), également l'huile essentielle de la Menthe pouliot dont le composé majoritaire est la R (+) Pulégone (82%) est dotée d'un fort pouvoir antifongique contre *Penicillium* et *Mucor* (Belghazi et al., 2002).

Le nérolidol, un sesquiterpène actif de la plante de l' Amazon *Viola surinamensis* possède une activité antimalaria, prouvé par les études de Lopes et al. (1999), dont l'huile essentielle cause l'inhibition à 100% du développement de l'agent infectieux, cette activité est liée à l'inhibition de la biosynthèse des glycoprotéines.

Chez *Inula helenium* (*Elecampane*, en anglais), l'alantolactone et son isomère sont les constituants majeurs de l'huile essentielle et ont des propriétés antibactériennes notamment contre *Mycobacterium tuberculosis*, anti-protozoaires contre *Entamoeba histolytica*, qui cause des amibiases et antifongiques contre des pathogènes opportunistes comme certains dermatophytes (Pedneault et al., 2001).

- Activité antioxydante : la capacité antioxydante de l'huile volatile est étroitement liée à tout le contenu phénol (Stefanovits-Bányai et al., 2003).

Le carvacrol est un des composants principaux des huiles essentielles de certaines labiaceae (lamiaceae), comme l'origan, thym dont la teneur peut atteindre jusqu'à 86%. L'activité antioxydante de ces herbes est dû au carvacrol, thymol et un autre phénol (Schwämmle et al., 2001). Ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux. Jukić et Miloš (2005) ont montrés dans une étude portant sur l'huile essentielle de *Thymus* (*Thymus vulgarae* L.), que les chemotypes phénoliques (thymol et carvacrol) et non phénoliques (linalool) sont capable de réduire le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl, avec un effet plus élevé enregistré pour les chemotypes phénoliques. Ces observation, l'on expliqué par la concentration élevé de thymol et carvacrol dans ces derniers.

L'activité de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles est résumée dans le **tableau 01**.

Tableau 01 : Bioactivité de quelques principes des huiles essentielles.

Le composé	Bioactivités	Référence
Acetate de bornyl	antibactérien; antispasmodique; antiviral; expectorant; saveur; insectifuge; myorelaxant; pesticide; sédatif	Teixeira da Silva (2004)
Camphre	Allelopathique; analgésique; anesthésique; antiacne; antidiarrhetique; antidysentérique; antioxydant; antiseptique; antispasmodique; stimulant- CNS; cancer-préventif; carminatif; produit de beauté; expectorant; fongicide; herbicide; insectifuge; nématicide; pesticide; stimule la respiration; vibriocide	
Carvone	antiacetylcholinestérase; antiseptique; CNS-stimulant; cancer-préventif; carminatif; saveur; insecticide; insectifuge; nématicide; parfumerie; pesticide; sédatif; trichomonicide; vermicide	
Sabinene	Parfumerie	
α - thujone	Antibactérienne ; insecticide ; larvicide ; pesticide	
1,8- cineole	Antimicrobienne	Svoboda et Hampson (1999)
Anethol/estragole	Antispasmodique	
Linalool	Antimicrobienne, hypnotique, hypothermique	
Beta asarone	Sédatif, hypnotique	

II-2. Les composés phénoliques

II-2-1. Généralités

Les polyphénols constituent un des groupe le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales: la voie shikimate et acétate (**Lugasi et al., 2003**).

Les polyphénols (**fig. 06**) possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (OH alcoolique, carboxyle,...). Dans cette catégorie, on trouve de nombreuses substances : les noyaux simples en C₆-C₁ et C₆-C₃, les noyaux dérivant de l'extension du phényl propane, en C₆-C₃-C₆ (**Dubois et al., 1977**).

Selon **Harborne (1989)**, les polyphénols peuvent être divisés en au moins 10 classes différentes selon leur structure chimique de base. Peuvent s'étendre de molécules simples, telles que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que des tannins (**Lugasi et al., 2003**).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidins) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (**Beta et al., 2005**).

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (**Psotová et al., 2003**). Comme exemple d'acide phénolique, on cite : acide chlorogénique, acide caffeique, acide protocatechique, acide vanillique, acide ferulique, acide sinapique et acide gallique (**Hale, 2003**).

Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prebiotique, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est faible et considéré non toxique. Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique (RA). (**Psotová et al., 2003**). Cet acide et l'acide férulique empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris, l'acide gallique inhibe la formation du cancer oesophagien chez les rats (**Hale, 2003**).

Les anthocyanidines sont des dérivés du flavylum ou 2-phényl- benzopyrylium (**fig. 07**), Ils portent des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (**Hadi, 2004**).

Les tannins sont des polyphénols polaires d'origines végétales (**Berthod et al., 1999**), existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines, leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3 000 (**Cowan, 1999**). Il est difficile de les séparer dans un extrait végétal, parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (**Berthod et al., 1999**).

Ils sont divisés en deux groupes, tannins hydrolysables et condensés, ils peuvent être constitués par la condensation des dérivés flavane qui ont été transportés aux tissus du bois des plantes. Alternativement, des tannins peuvent être constitués par polymérisation des unités de quinone (Cowan, 1999).

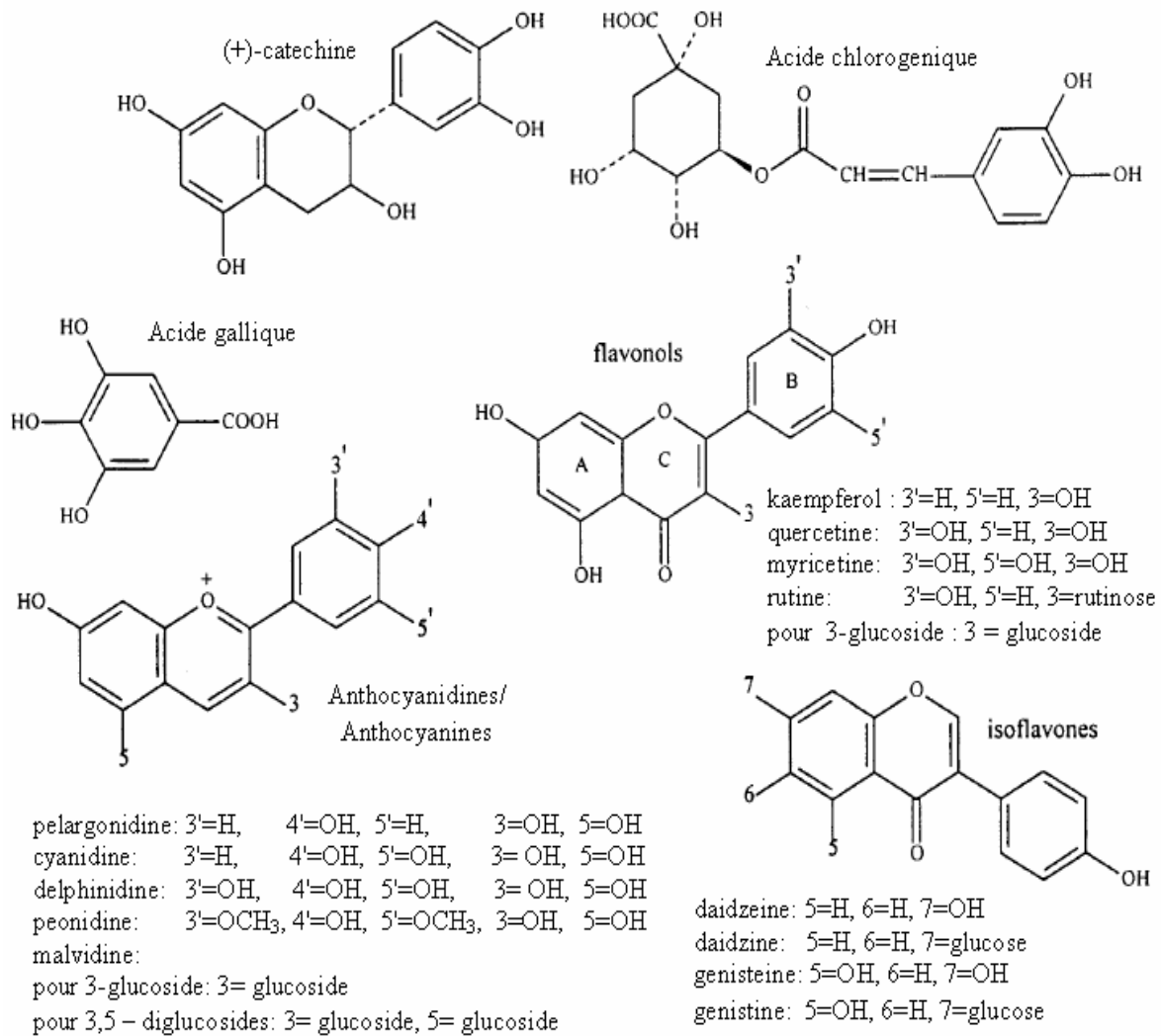


Fig. 06 : Structure de quelques composés phénoliques (Wang et Mazza, 2002).

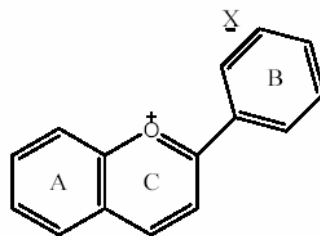


Fig. 07 : Structure du flavylum.

Les 4-oxo-Flavonoïdes sont les flavonoïdes vrais appelés dérivés flavoniques ou flavonoïdes, sont des dérivés du noyau Flavone ou 2-Phenyl Chromone, portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides.

L'intérêt nutritionnel des flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C, à la suite des travaux de Szent Gyorgyi en 1938. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de Paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque (**Hadi, 2004**).

II-2-2. Rôle physiologique des composés phénoliques

Les flavonoïdes et d'autres polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur des polyphénols (**Lugasi et al., 2003**).

L'astringence est due aux tannins catéchétiques qui précipitent les protéines salivaires, entraînant avec elles leur "cortège" de molécules d'eau qui lubrifiaient alors la muqueuse buccale (**Vergé et al., 1999**). Les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs, les flavanones sont responsables de l'amertume des Citrus et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydrochalcones à saveur sucrée (**Dubois et al., 1977**).

Des travaux plus anciens (**Nitsch et Nitsch, 1961; Alibert et al., 1977**) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogénèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation.

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (**Hadi, 2004**).

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des auronnes et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer, par co-pigmentation, la couleur des fleurs et fruits (**Brouillard et al., 1997**).

Les cellules végétales répondent au stimuli environnemental en synthétisant les métabolites secondaires qui peuvent les protéger contre les agents de l'agression (**Misirli et al., 2001**) lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques, des composés phénoliques et phénols simples sont synthétisés et l'activité peroxydase caractéristique des tissus en voie de lignification est stimulée. Ces réactions aboutissent à la formation au niveau de la blessure d'un tissu cicatriciel résistant aux infections (**Fleuriet et Macheix, 1977**).

L'attaque de microbe pathogène telle que le virus, les bactéries ou les mycètes induit une cascade de réactions qui peuvent mener à la résistance étant exprimée à l'emplacement de l'infection ou dans d'autres parties non infectées de la plante. Cette résistance systémique implique l'existence d'un signal endogène transféré de l'emplacement d'infection à d'autres parties de la plante. On pense que la première étape du mécanisme de la défense comporte une accumulation rapide des phénols à l'emplacement d'infection, qui fonctionnent pour ralentir la croissance du microbe pathogène (Misirli et al., 2001).

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Rees et Harborne, 1985). Les mécanismes de l'action et de l'interaction, et les produits chimiques qu'ils contiennent demeurent dans la plupart indéterminés. Des chercheurs deviennent graduellement intéressés dans l'identification des principes actifs dans les extraits avec l'étude complémentaire intensive de leurs mécanismes d'action (Sun et al., 2002).

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans l'interaction symbiotique entre bactéries de la famille des Rhizobiaceae et leurs plantes hôtes de la famille des légumineuses. Les bactéries reconnaissent des flavonoïdes et d'autres molécules sécrétées par la plante, ces molécules induisent la production de facteurs Nod par les *Rhizobia*, qui déclenchent le programme de nodogenèse chez la plante hôte (Mergaert et al., 2001). En effet, les travaux de recherche sur les composés inducteurs de gènes de nodulation impliqués dans la symbiose entre *Vicia faba* et *Rhizobium leguminosarum* ont démontré que les composés phénoliques sont responsables. Les composés identifiés dans les exsudats racinaires chez le cultivar Alfred sont la tricétine et la naringénine, alors que les inducteurs identifiés dans les hydrolysats de racines sont : le Me-3'ériodictyol et l'ériodictyol (Bekkara, 1999).

II-2-3. Les flavonoïdes

II-2-3-1. Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (Fig. 08) (Bruneton, 1999).

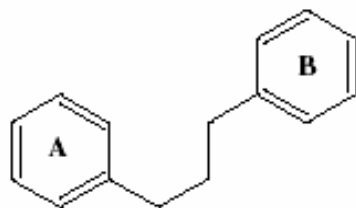


Fig. 08 : Squelette de base des flavonoïdes.

Il y a six classes des flavonoïdes, qui diffèrent par leur structure chimique : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Medić-Šarić et al., 2004).

II-2-3-2. Biosynthèse des flavonoïdes

Se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6' – tétrahydroxychalcone (**fig. 09**). Cette chalcone métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en naringénine (1). Sur cette dernière agit la flavone synthase pour donner : apigénine (2) ou le dihydroflavonol (3).

Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase, se métabolise en kaempférol (4) ou en leucoanthocyanidol. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3,4-ols (6) et anthocyanidols (7), ce dernier sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8) (**Marfak, 2003**).

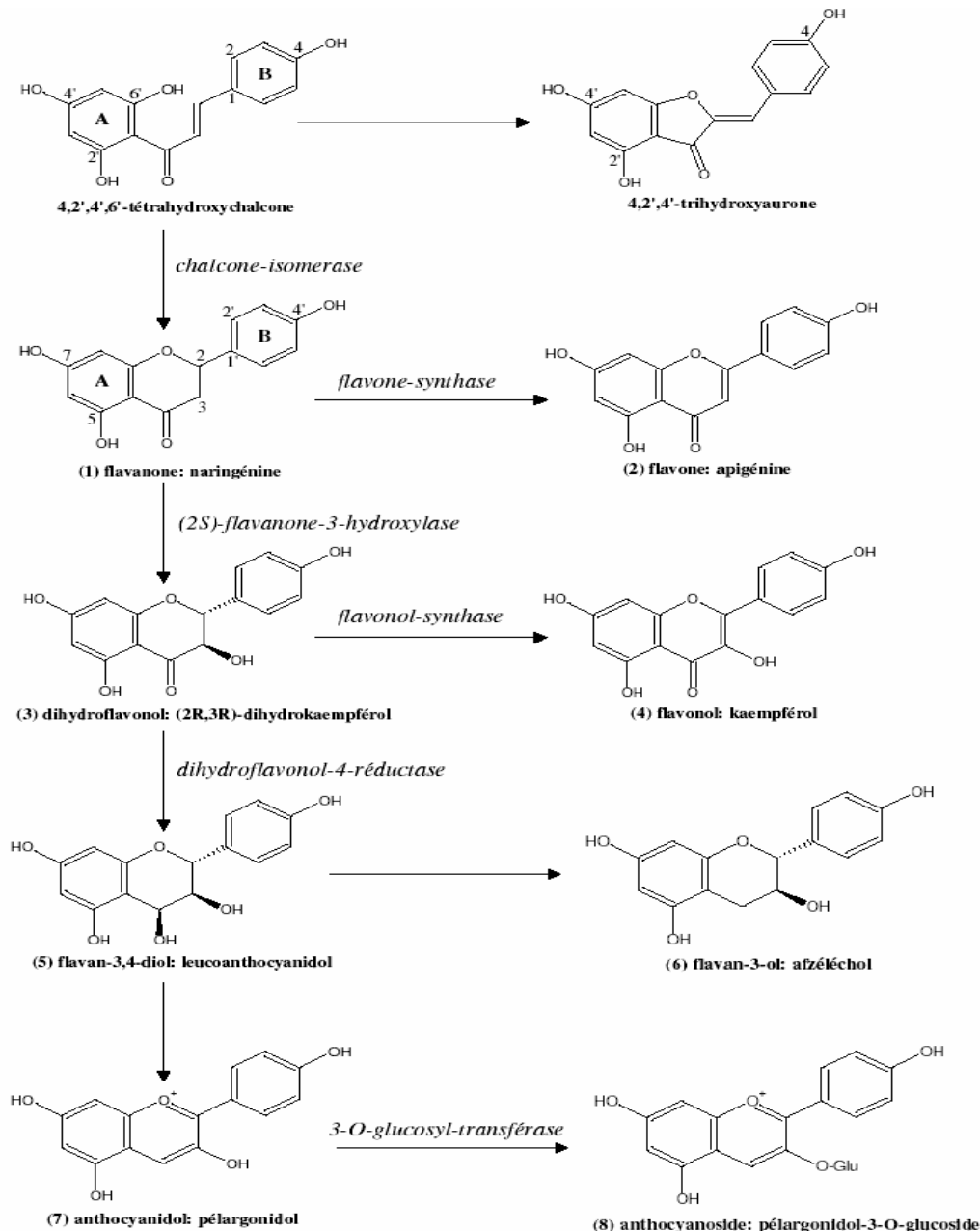


Fig. 09 : Biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

II-2-3-3. Localisation des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des membres d'une classe des composés naturels avec l'occurrence répandue dans le règne des végétaux. Largement distribué dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (Medić-Šarić et al., 2003), abondant dans les légumes feuilles (Marfak, 2003), présents dans les aliments de nature végétale (légumes, céréales, légumineuses, fruits,...etc.) et boissons vin, cidre, bière, thé, cacao, etc.). Cette présence est en grande partie influencée par des facteurs génétiques et des conditions environnementales.

D'autres facteurs tels que la germination, le degré de maturité, la variété, le traitement, et le stockage ont également une influence sur la teneur des composés phénoliques des plantes (Lugasi et al., 2003).

La plupart des flavonoïdes diététiques dans les aliments sont des 3 - O glycosides et des polymères, mais peuvent également exister sous des formes aglycones (Medić-Šarić et al., 2003). On estime que la prise moyenne des flavonoïdes par l'homme s'étend de 25 mg/jours à 1 g/jours (Wang et Mazza, 2002). Le Tableau 02 regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes.

Tableau 02 : Sources alimentaires des flavonoïdes (Marfak, 2003).

Flavonoïdes	Aliments
Flavanones naringénine	Fruits du genre citrus
Flavones chrysin apigénine lutéoline	Peau des fruits Persil, thym, romarin, céleri Persil, céleri
Flavonols kaempférol quercétine myricétine	Radis, brocoli, thé noir Oignon, pomme, olive, vin rouge, tomate Canneberge, vin rouge
flavan-3-ols épicatéchine catéchine épigallocatechine	Thé vert, thé noir Thé vert, thé noir Vin rouge
Anthocyanidols cyanidol malvidol apigénidol	Cassis, myrtilles Raisins, fraises, cassis Framboises, fraises

La teneur en flavonol et en flavone des aliments végétaux est fortement influencée par des facteurs tels que la variation du type et la croissance, la saison, le climat, et le degré de maturité (Lugasi et al., 2003). Ces derniers ont étudié la composition en flavonoïdes de quelques fruits et légumes (tableau 03).

Tableau 03 : Contenu en flavonoïdes dans quelques aliments végétaux (Poids à l'état frais en mg/kg) (Lugasi et al., 2003).

Echantillon végétal	Total des flavonoïdes
<i>légumes</i>	
Brocoli	46.2
Chou blanc	17.7
Oignon rouge	124.1
Oignon pourpre	195.6
poivre	20.1
épinards	338.6
Persil feuilles	80.8
Céleri feuilles	402.8
Céleri racine	25.9
<i>fruits</i>	
pastèque	18.4
cassis	52.8
fraises	1003
raisin	38.7
noix	4565
Kiwi	22.3
Banane	22.8
pomme	65.3
poire	24.7
prune	23.3
Abricot	11.5

II-2-4. Intérêt biologique des flavonoïdes et composés phénoliques

Plusieurs flavonoïdes ont montré des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, inhibitrices d'enzymes, et prévention des maladies cardiovasculaires (**Wang et Mazza, 2002**). Ils ont montré *in vivo* comme *in vitro* un certain nombre d'activités (**tableau 04**).

Particulièrement les aglycones sont pharmacologiquement efficaces. Plusieurs d'entre elles exercent des effets hépatoprotecteur, diurétiques, effet de vasodilatation, antibactériens et chemoprotectrice: effets anti-inflammatoires, antidiabétiques, antiallergique et autres, exemple de la Morine (3, 3', 5, 5', 7-pentahydroxyflavone) est la substance active de *Morus tinctoria L.* Elle appartient au groupe de flavonols dont le squelette de base est substitué par cinq groupes d'hydroxyle, les essais *in vitro* ont prouvé son activité chemoprotectrice, antimutagène, antivirale et antioxydante (**Bartošíková et al., 2003**).

Nakagawa et al. (2000) ont évalué l'efficacité antioxydante de la quercétine dans les fractions lysosomales hépatiques des souris à l'aide du générateur radical hydrophile AAPH (2,2' azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) et le générateur radical lipophile AMVN(2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile). La quercétine a empêché la peroxydation de lipide dans les fractions lysosomales, à inhiber la libération des enzymes lysosomales plus évidemment contre AAPH que contre AMVN. La rutine, un glycoside de quercétine, était moins efficace. Ces auteurs suggèrent que la quercétine pourrait avoir l'activité antioxydante efficace dans les espaces entre la phase aqueuse et la phase lipidique dans les systèmes biologiques dû à la localisation dans des membranes.

La plante de la Chine, *Ginkgo biloba*, possède un complexe de molécules appelé Ginkgolide. Cette plante est excellente pour la réduction de l'œdème, possédant des propriétés antiradicalaires (**Dweck, 2002**).

Les flavonoïdes montrent aussi une activité antimicrobienne. Exemple des travaux de **Harikrishna et al. (2004)**, ont démontré le pouvoir antimicrobien d'un flavonoïde glycoside "prunine-6"-O-p-coumarate" contre deux souches de bactéries gram+ (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus albus*) et deux bactéries gram- (*Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*).

Les flavonoïdes montrent plusieurs effets biologiques tels que des effets anti-ulcéreux, anti-inflammatoire et anti-hépatotoxique. Ils sont également inhibiteurs des enzymes telles que l'aldose réductase et xanthine oxydase. Ce sont des antioxydants efficaces, ayant la capacité de piéger les radicaux libres. Beaucoup ont des actions antiallergiques et antivirales et certains fournissent une protection contre les maladies cardiovasculaires. *In vitro*, chez les animaux de laboratoire, ils ont montré une inhibition de la croissance de diverses variétés de lignées de cellules cancéreuses (**Narayana et al., 2001**).

En règle générale, les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ERO.
- La protection des systèmes de défense antioxydants.
- L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ERO (**Halliwell, 1994**).

Tableau 04: Activités biologiques des composés polyphénoliques.

Polyphenols	Activités	Auteurs
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants	(Didry et al., 1982) (Ravn et al., 1984) (Hayase et Kato, 1984)
Coumarines	vasoprotectrices et antioedémateuses	(Mabry et Ulubelen, 1980)
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants	(Stavric et Matula, 1992) (Das et al., 1994) (Bidet et al., 1987) (Bruneton, 1993) (Aruoma et al., 1995)
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires	(Bruneton, 1993)
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires	(Masquelier et al., 1979) (Bahorun et al., 1996) (De Oliveira et al., 1972) (Brownlee et al., 1992) (Kreofsky et al., 1992)
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydants	(Okuda et al., 1983) (Okamura et al., 1993)

III- Le stress oxydatif

III-1. Définition

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (**Boyd et al., 2003**). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (**Morel et Barouki, 1999**).

III-2. Origine du stress

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé «stress oxydant » (**Favier, 2003**).

III-3. Les radicaux libres

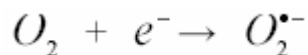
III-3-1. Définition

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif (**Vansant, 2004**). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé *espèces réactives de l'oxygène* (**fig. 10**) (**Favier, 2003**).

L'appellation “ dérivés réactifs de l'oxygène ” n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), peroxyde d'azote (ONOO⁻) (**Novelli, 1997**) .

III-3-2. Principaux radicaux libres

- l'anion superoxyde : la molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions.



- le radical hydroxyle : **OH[•]** . Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.

- le radical peroxyde : **ROO[•]**

- l'oxygène singulet : **O₂[•]**, forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité.

(**Hadi, 2004**).

III-3-3. Origine des radicaux

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques (**fig. 10**) 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 (**Favier, 2003**).

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.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées. Le monoxyde d'azote, est produit par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases, à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (**Favier, 2003**).

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 P450. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres (**Favier, 2003**).

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, également des antibiotiques, des anticancéreux (**Hadi, 2004**). L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme (**Hosein et Lytle, 2001**).

III-4. Les conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides.

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle, réaction appelée peroxydation lipidique. Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (**Favier, 2003**).

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins (**Hadi, 2004**). Ils inhibent la sécrétion d'insuline (**Krippeit-Drews et al., 1994**), modifient les structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines (**Pincemail et al., 1999**).

Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et $OH\bullet$, qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde.

Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

Le stress oxydant, principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003), maladie de Parkinson, les inflammations gastro-intestinale, ulcères (Atawodi, 2005), les oedèmes et vieillissement prématuré de la peau (Georgetti et al., 2003).

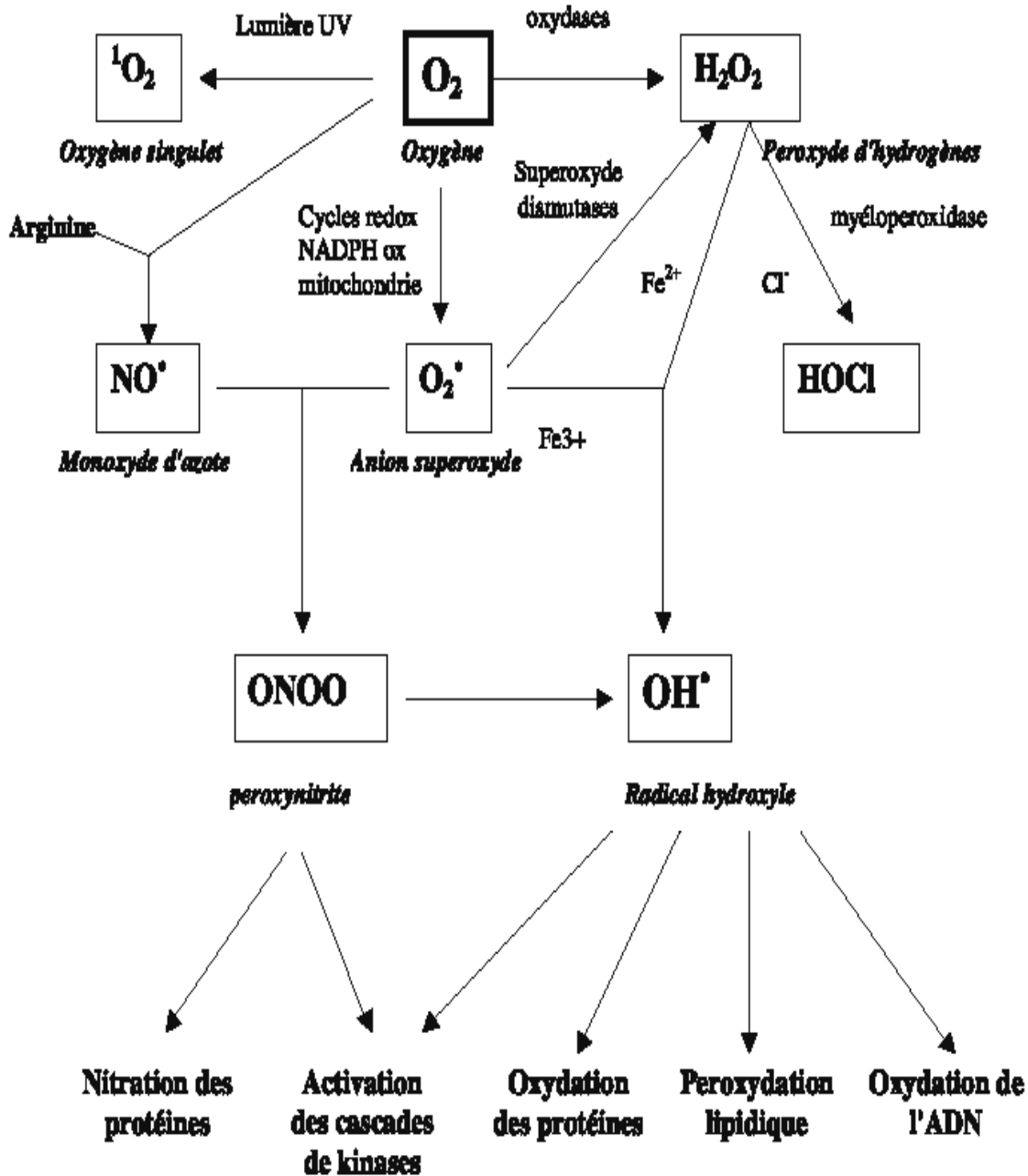


Fig. 10: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

IV- Les antioxydants

IV-1. Définition

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (**Boyd et al., 2003**), se sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (**Vansant, 2004**).

La raison pour laquelle les antioxydants sont importants vient du fait que l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peut être transformé en formes plus réactives telles que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyle, collectivement connu sous le nom d'oxygène actif (**Boyd et al., 2003**).

Ils 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 singlet pour la transformer en chaleur. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (**Vansant, 2004**).

D'un point de vue biologique les composés antioxydants peuvent protéger les systèmes cellulaires des effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation excessive, ils sont la stratégie préventive la plus prometteuse contre la formation des cataractes (**Hale, 2003**).

IV-2. Les antioxydants endogènes

Les défenses antioxydantes de l'organisme peuvent se diviser en :

- ❖ Un système de défense primaire : composé d'enzymes et de substances antioxydantes
 - la superoxyde dismutase (SOD) : diminue la durée de vie de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$
 - La catalase : transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau
 - La glutathion peroxydase (GPx) : détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques
 - Les molécules piègeurs : le glutathion (GSH), l'acide urique, les protéines à groupement thiols, ubiquinone,etc.

- ❖ Un système de défense secondaire : composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, des ADN endonuclease et ligase, des macroxyprotéinases (**Pincemail et al., 1998**).

IV-3. Les antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (**Svoboda et Hampson, 1999**).

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 (**Maydani, 2000**)^a et la diminution de l'athérosclérose (**Maydani, 2000**)^b. La vitamine E joue un rôle important dans l'agrégation de la β -amyloïde (A β), 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 (**Vansant, 2004**).

Les Caroténoïdes sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits, également dans le lait, 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.

Les exemples de caroténoïdes, incluent l'alpha carotène, bêta carotène, lycopène, phytofluène, phytoène, lutéine, neoxanthine, viloxanthine, anthéranxanthine, 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. 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 (**Vansant, 2004**). L'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 compléter des volontaires sains pendant 5 semaines avec de la vitamine C n'a aucun effet. 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 β -carotène (**Sarkar et al., 1995**) et de l'acide α -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 alphalipoïque fut identifié comme vitamine. Il a depuis été reclassé comme antioxydant et peut piéger les radicaux libres aux niveaux intracellulaire et extracellulaire. 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 insulinique (**Kahler et al., 1993**).

La prise de **composés phénoliques** a été largement rapportée pour protéger contre le développement de maladies coronariennes. De nombreuses preuves existent montrant que les composés phénoliques peuvent prévenir l'oxydation des LDL (**Meyer et al., 1997**).

Des flavanols (catéchine, flavan-3-ols), un groupe important de polyphénols de thé, en une grande partie existent sous forme d'esters de gallate, sont considérés par beaucoup comme responsable des effets anticarcinogénique du thé vert dont les principaux sont, (-)-epigallocatechine et ses esters gallate, et à moins degré (-)-epicatechine et ses esters gallate et (-)-catechine (**Basu et al., 1999**).

Des études en laboratoire présentées à une réunion de l'American Chemical Society en septembre 1997 ont démontré que le gallate d'épigallocatechine était 100 fois plus efficace que la vitamine C et 25 fois plus efficace que la vitamine E pour neutraliser les radicaux libres. La recherche semble indiquer que cette puissance antioxydante pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'immunité humaine. Dans le cadre d'études menées sur des animaux au Japon au début des années 1990, ont constaté que les polyphénols du thé vert augmentent l'activité des macrophages, des lymphocytes B, des lymphocytes T et des cellules tueuses naturelles. Toutes ces cellules sont des globules blancs (**Hegarty, 2000**).

Serafini et al. (2000) ont trouvé qu'à la fois le thé noir et le thé vert étaient capables d'inhiber l'oxydation des LDL, **Mcanlis et al. (1998)** ont échoué à trouver un effet significatif.

Ohran et al. (1999) ont examiné plusieurs composés naturels et synthétiques sur des cataractes induites par du sélénite chez le rat, et ont montré que du dicloferae (60 %), de la vitamine C (58 %) et de la quercétine (40 %) sont protecteurs.

Il semble que la capacité antioxydante d'un flavonoïde dépend de son affinité pour les radicaux libres et donc de sa structure : la présence de deux hydroxyles en ortho sur le noyau B, la conjugaison du noyau B au groupe oxo en 4 via la double liaison en 2,3 sont des éléments favorables (**Bruneton, 1993**).

Certaines **huiles volatiles** et leurs composants sont cytostatiques aux lignées de cellules de tumeur et peuvent offrir le potentiel comme agents antiprolifératifs. L'examen des huiles volatiles de *Pelargonium sp.*, *Monarda citriodora var. citriodora*, *Myristica fragrans*, *Origanum vulgare ssp. hirtum* et *Thymus vulgaris* pour leur effet antioxydant en utilisant le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) a montré une action hépatoprotéctrice (**Svoboda et Hampson, 1999**).

De récentes études ont suggéré que des suppléments glyconutritionnels (GN), jouant un rôle au niveau de la communication cellulaire et de la fonction immunitaire, ont des propriétés antioxydantes à la fois *in vitro* et *in vivo*. Des cellules de foie de rat, cultivées dans un milieu de culture contenant des suppléments GN, ont permis de mettre en évidence des niveaux plus élevés de glutathion réduit que dans des cellules témoins, démontrant ainsi une protection antioxydante accrue (**Boyd et al., 2003**).

V- Les plantes médicinales sélectionnées

V-1. *Lavandula stoechas* L

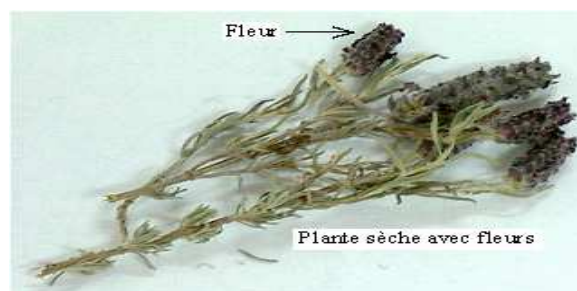
• Présentation et description

Le nom Lavande dérive du latin "lavare", qui signifie laver (Chu et Kemper, 2001).
Appartenant à la famille des Labiées (Fernandez, 2003).

Nom arabe : الكحيلية

Classification:

Règne: Plantes
Sous règne: plantes vasculaires
Embrenchement: Spermaphytes
Embrenchement: Angiospermes
Classe: Dicotyledones
Sous classe : Dialypétales
Ordre: Lamiales (Labiales)
Famille: Lamiaceae
Genre: *Lavandula*
Espèce : *Lavandula stoechas* L.



(Quezel et Santa, 1963)

Fig. 11: Photo de la plante *L. stoechas* L poussant dans la région de Oum el Alou

Le genre *Lavandula* se compose d'environ 28 espèces, qui sont dans la plupart d'origine méditerranéenne (Barrett, 1996 ; Maganga, 2004). *Lavandula* est un sous-arbrisseau à tige et feuilles persistantes, jusqu'à 1 mètre de longueur, étroit, vert pâle, peuvent s'étendre du gris bleuâtre profond au vert à brun pâle, fleurs de couleur bleu – violet. D'autres variétés sont à fleurs blanche et rose. L'ensemble de la plante très aromatique comprenant fleurs et feuilles (Allaby, 1992 ; Chu et Kemper, 2001).

Plusieurs espèces se développent à l'état sauvage dans le sol rocheux de l'Europe: L'Espagne, Portugal, la France, ... etc. dans l'Afrique, Russie, la Turquie, le Pakistan et l'Inde. Actuellement, sont cultivés dans le sol calcaire des pays méditerranéens aussi bien que d'autres régions, particulièrement la Bulgarie et les pays de l'ancienne Yougoslavie (Wiesenfeld, 1999; Chu et Kemper, 2001).

L. stoechas est une plante tendre, qui préfère les endroits ensoleillés et les sols riches, les tiges étroites sont quadrangulaires à feuilles opposées, tendent à être plus vertes que grises, à son extrémité une inflorescence terminée par un toupet de longues bractées violettes (Chu et Kemper, 2001). Largement distribué dans les îles canari, Islande et à travers tout le tell méditerranéen, l'Afrique du Nord, Sud West de l'Asie, Afrique tropical avec une disjonction vers l'Inde (Quezel et Santa, 1963; Upson et al., 2000).

• **Composition chimique**

Selon Ferreres et al. (1986) ; Lawrence (1996) ; Mastelic et Kustrak (1997) les constituants chimiques potentiellement actifs du genre *Lavandula* sont :

- Monoterpenes : α -pinene, β -pinene, β -ocimene, camphre, limonene, p-cymene, sabinene, terpinene
- Monoterpene alcools: α -terpineol, borneol, lavandulol, linalool, p-cymen-8-ol, transpivocarveol
- Monoterpene aldéhydes: aldéhyde de cumine
- Monoterpene ethers: 1,8-cineole
- Monoterpene esters: acetate de linalyl, acetate de terpenyl
- Monoterpene cétones: carvone, coumarine, cryptone, fenchone, methylheptenone, n-octanone, nopinone, p-methylacetophenone
- Benzenoïdes: eugenol, coumarine, carvacrol, acide hydroxycinnamique, acide rosmarinique, thymol
- Sesquiterpenes: caryophyllene, oxide de caryophyllene, α -photosantanol, α -santalal, α -norsantalenone
- Traces de nombreux autres composés, tels que flavonoïdes.

Lavandula stoechas L ou spanish lavender renferme comme composés phytochimiques : alpha pinène, bêta pinène, bêta santalene, borneol, camphre, caryophyllene, coumarine, geraniol, limonene, linalol, luteoline, 1,8-cineole, acide rosmarinique, tannin, umbelliferone, acide ursolique (Esiyok et al., 2004). Le tableau 05: donne la composition chimique de l'huile essentielle de quelques espèces de Lavande.

Lavandula de la Turquie possède un rendement en huile essentielle de 1.33%, de chémotype pulegone (40.37%) et avec comme autres composés majoritaire ; hexahydrothymol (menthol) (18.09%) et menthone (12.57%) (Gören et al., 2002).

L'huile essentielle de différentes populations biogénétiques de *Lavandula* de la Grèce, analysées au stade de pleine floraison ont α -pinène, fenchone, camphre et acetate de myrtenyl comme principaux constituants avec une variation quantitative considérable entre les différentes populations, trois d'entre elles étant de type fenchone/camphre et une de type 1,8-cineole/fenchone et que la variation de la composition quantitative en huile essentielle entre feuilles et les inflorescences étaient également significative. Les inflorescences ont plus de fenchone, acetate de myrtenyl et α -pinène, tandis que les feuilles ont plus de 1,8-cineole et de camphre (Skoula et al., 1996).

En ce qui concerne les flavonoïdes du genre *Lavandula*, aucune enquête n'a été encore entreprise, bien que quelques espèces aient été étudiées. Les flavonoïdes identifiés de *L. dentata* suivant Ferreres et al. (1986): genkwanin (apigénine 7-methyl éther), lutéoline, apigénine, lutéoline 7-glucoside, apigénine 7-glucoside, lutéoline 7-rutinoside, vitexine et vicenine-2. Les flavonoïdes principaux de *L. stoechas* : apigénine 7-glucoside, lutéoline, lutéoline 7-glucoside et lutéoline 7-glucuronide (Upson et al., 2000).

Tableau 05: Profils aromatique des espèces de *Lavandula* (Wiesenfeld, 1999)

Résultats exprimés en pourcentage - Espèce avec parfum 'typique'

Espèce	<i>angustifolia</i>	<i>dentata</i>	<i>stoechas</i>	<i>lanata</i>	<i>spica</i>	<i>viridis</i>	<i>heterophylla</i>	<i>pinnata</i>	<i>multifida</i>
Composé									
alpha-pinene	0.5	1.4	2.1	1.4	0.8	2	0.9	0.1	0.3
sabinene	0.7	3.6	0.7	0.8	5.4	2.8	1.5	<0.1	---
beta-pinene	0.2	5.1	0.4	1.1	1.2	1.9	1.3	<0.1	---
myrcene	2.8	1.2	0.8	1.1	2.9	2.6	0.7	5.8	2
cymenes*	3.8	0.4	0.7	0.2	0.7	7.5	0.3	0.5	0.2
pic multi composé **	20.5	43.4	20.8	10.8	27.1	24.9	7.7	2.2	1.2
ocimene	0.5	---	---	1.4	0.1	0.3	---	11	28.2
fenchone	---	3.4	33	<0.1	---	---	0.4	<0.1	---
alpha-terpinolene	1.1	---	0.8	2.1	0.6	0.3	---	12.8	8.3
linalool	0.5	3	0.6	4.2	2	14.7	9.3	0.1	---
camphre	1.7	2	26.2	39.2	10.9	12.4	14	0.1	---
cetones polycycliques*	---	1.5	0.6	---	1.9	1.3	0.5	---	---
borneol	4.6	---	---	1.2	0.5	1.3	<0.1	---	---
lavandulol	---	---	---	0.4	---	---	16.8	---	---
terpeneols*	---	1.4	0.2	0.6	6.7	4.7	---	0.3	---
methyl thymyl ether	---	---	---	---	---	---	---	0.5	3.3
acetate de linalyl	0.2	---	---	---	---	1.5	---	---	---
acetate de bornyl	0.4	---	0.3	0.3	0.6	0.1	0.3	---	---
Acetate de lavandulyl	---	---	---	---	---	---	---	---	---
carvacrol	---	---	---	<0.1	---	---	<0.1	27	12.8
Acetate de neryl/geranyl	0.2	---	---	---	0.1	1.3	0.3	---	---
caryophyllene	15.9	0.4	0.5	7.2	1.1	---	4.3	3.7	2.8
bergamotenes*	1.7	1.2	---	---	1.5	---	---	0.1	---
germacrenes*	---	---	---	1.9	4.3	0.6	2.1	---	1.5
selinenes*	---	1.6	0.2	---	0.3	1.8	1	---	---
farnesenes*	---	1	---	---	1.3	---	0.4	7	3
bisabolenes*	---	0.5	0.3	0.2	0.5	---	0.1	13.6	9.9
cadinenes*	7.1	0.4	0.2	---	1.2	---	---	---	---
selinadiene	---	---	---	---	---	4.9	---	---	---
Autres sesquiterpenes	3.5	3.4	0.4	3	4.5	8.3	9.4	1.2	---
Oxide de caryophyllene	2	0.3	---	0.7	0.7	0.1	4.4	---	---
diterpènes inconnu	---	---	<0.1	0.5	---	1.2	---	---	---
total sesquiterpenes	35.9	8.5	1.7	12.3	14.7	15.6	17.3	25.6	17.2

* somme des isomères

** peut inclure bêta-phellandrene, cis-ocimene, limonène, cineole

• **Domaines d'application et Intérêt en phytothérapie**

La Lavande a été traditionnellement utilisée comme plante aromatique, culinaire, décoratif, cosmétique et dans des buts médicinaux (**Maganga, 2004**).

La Lavande a une longue histoire en usage médicinal, beaucoup de variétés sont cultivés autours du monde mais au moins cinq espèces différentes sont employées en médecine, elle a été employé par les romain et l'Afrique du nord pour parfumé les bains et entretenir le linge, l'armée romaine l'utilisé comme désinfectant, on dit que les égyptiens employé la fleur dans le processus de momification, dans la médecine chinoise traditionnelle, la Lavande été utilisé pour traiter l'infertilité, l'infection, l'angoisse et la fièvre. La médecine arabe l'employé pour les problèmes des reins et comme stomachique. Aujourd'hui, la Lavande est généralement utilisé dans la préparation des parfums, les savons, les poudres de talc, les bougies parfumées, l'aromathérapie avec l'essence est recommandée pour traiter les dépressions, la fatigue, l'hypertension et stimuler l'appétit (**Chu et Kemper, 2001**).

Le genre *Lavandula* fournit plusieurs huiles essentielles importantes à l'industrie des parfums (**Wiesenfeld, 1999**). Les espèces communes censées pour avoir une valeur médicinale sont *Lavandula dentata* (French lavender), *L. angustifolia* ou *officinalis* ou *vera* (garden, English, pink, white, ou true lavender), *L. latifolia* ou *spica*, *L. intermedia* ou *hybrida reverchon* ou *hybrida burnamii* (lavandin, un hybride de *L. angustifolia* et *L. latifolia*), *L. stoechas* (Spanish, Italian, ou fringed lavender), et *L. dhofarensis* (Arabic lavender) (**Chu et Kemper, 2001**).

La plante est employée comme expectorant, antispasmodique, carminatif, bon désinfectant des plaies. L'huile employée comme remède contre les affections du colon, soulager les maux de tête (**Gören et al., 2002**). Elle est utilisée dans le cas des brûlures, dépressions, psoriasis, problème dermique (**Esiyok et al., 2004**), possède des propriétés antimicrobiennes et anti-carcinogènes (**Gören et al., 2002**), Sédatif, anxiolytique, analgésique, antidépresseur, antioxydant, anti-inflammatoire et insecticide (**Chu et Kemper, 2001**).

Les études sur les effets antioxydants de la Lavande ont eu des résultats variables, mais la plupart soutiennent un rôle modeste comme antioxydant, moins efficace que ce d'autres membres de la famille de Labiatae. Dans une étude sur *L. angustifolia*, aucun des six types différents d'extraits n'ont montré une activité antioxydante, alors qu'une autre étude signal que la Lavande présente des propriétés antioxydantes. L'essence de la Lavande et deux de ses constituants chimiques, cineole et bêta-pinène, ont ralenti le taux normal d'une réaction chimique d'oxydation en piégeant le radical hydroxyl. De même, un composé phénolique de *L. angustifolia* a empêché la rancidité des huiles végétales (**Chu et Kemper, 2001**).

V-2. *Cistus ladaniferus* L

• Présentation et description de l'espèce

Nom arabe : اركل

Systematique

Embranchement : Phanérogames

Sous Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Dialypétales

Ordre : Pariétales

Famille : Cistacées

Genre : *Cistus*

Espèce : *Cistus ladaniferus* L



Fig. 11 : Photo *C. ladaniferus* de la région de Sidi M'hamed

(Janot, 1965).

Cistaceae est une famille intermédiaire des arbrisseaux et sous arbrisseaux, c'est des herbes qui sont caractéristiques des habitats secs et ensoleillés (Proctor, 1978). Il est composé de 7 genres (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Tuberaria*, *Helianthemum*, *Hudsonia*, et *Lechea*) avec un total d'environ 175 espèces. La distribution de la famille est principalement dans les zones tempérée du nord, particulièrement dans la région de la méditerranée (100 espèces) et plus spécifiquement dans l'ouest, dans le tell et le littoral. En particulier, toutes les espèces des 4 premiers genres, mentionnés ci-dessus sont distribuées, presque exclusivement dans le bassin méditerranéen, ajoutant, presque la moitié des 110 espèces de *Helianthemum* sont également trouvées principalement dans la méditerranée (Quezel et Santa, 1963; Thanos et al., 1992). Le genre *Cistus* comprend 16 espèces, particulièrement prédominantes dans la méditerranée (Talavera et al., 1993). L'espèce *Cistus ladaniferus* est répandue dans le Portugal, l'Espagne, l'Italie, et l'Afrique du Nord (Algérie, Maroc) mais en France, seulement trouvée dans le massif d'Esterel (Mariotti et al., 1997).

Cistus ladaniferus est un arbrisseau aromatique, de 1 à 2 mètres, à feuilles vertes à la partie supérieure, blanchâtres à l'intérieur, planes ou ondulées, glabres luisantes, couvertes par des glandes sécrétrices d'une résine brunâtre. Les fleurs blanches jaunâtres, apparaissant en juin et ne durent que quelques heures, les fruits sont velus à 10 loges et s'ouvrent par 10 valves (Quezel et Santa, 1963 ; Naves, 1974 ; Bonnier, 1990 ; Kalpotzakis et al., 2001).

• Composition chimique

Selon Nagai et al. (2005), les hydrolysats du pollen de *C. ladaniferus* renferment : composés phénoliques environ 10.39 à 14.33 µg/mg de l'extrait sec, protéines 129.62- 137.35 µg/mg de l'extrait en poudre.

L'huile volatile des feuilles contient un certain nombre de monoterpènes comprenant le pinène, le camphène, le myrcène, le phellandrene, le limonène, le thujone, citral et géraniol, mais aucun composé ne prédomine (Koenigs et Guelz, 1974).

Le Ciste de Tlemcen (**tableau 06**) est de chimiotype Copraborneol/Borneol (12.5/9.32%) pour ce poussant dans la région de Zarifet et de chimiotype Bornéol/Camphéne (9.14/8.14%) pour le Ciste de Hafir (**Kaïd Slimane, 2004**).

La plante renferme également divers type de diterpénoïdes " labdane", qui est la source de la gomme ladanum (**Koenigs et Guelz, 1974**).

Le Ciste contient des tannins (**Pomponio et al., 2003**), des terpenoïdes, flavonoïdes aglycones, glycosides et proanthocyanidines (**Demetzos et al., 1994**).

De Pascual et al. (1982) Ont isolé trois nouveau acides diterpeniques de *Cistus ladaniferus*: 6,8(17) labdadien-15-oïque, 7-oxo-8-labden-15-oïque et 6 β -acetoxy-7-oxo-8-labden-15-oïque acide, beside labdanolique, 6-oxocativique, 7 α -hydroxy-8(17)-labden-15-oïque, 8 α -methoxy-labda-15-oïque et 8 α -hydroxy-13(E)-labden-15-oïque acide.

Mariotti et al. (1997) ont analysé l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* de Corse par CPG / RMN-¹³C. Parmi les 45 constituants identifiés, les principaux étaient : α pinène (39%), viridifloral (11.8%), ledol (3.3%) et bornyl acetate (3.1%).

• **Activités biologiques**

Le Ciste présente des effets : antifongique, antiviral, anti-inflammatoire, gastroprotecteur, antitumoral et prévention des maladies cardiovasculaires (**Pomponio et al., 2003**).

Dans une étude préliminaire réalisé sur les divers extraits du *Ciste ladanifère* (huile essentielle, concrète du Ciste, absolue du Ciste et résinoïde de ladanum), l'huile essentielle était la composante qui manifeste le pouvoir antibactérien et antifongique le plus efficace. La réponse des micro-organismes, diffère d'une souche à l'autre, d'une substance à l'autre et d'une concentration à l'autre. La classification des souches selon leur sensibilité à l'huile essentielle du *Ciste ladanifère*, par référence à une concentration faible (2000 ppm) ou moyenne (4000 ppm) montre un gradient de sensibilité croissant de *Aspergillus niger* (la plus résistante) à *Mucor* (la plus sensible) en passant par *Botrytis* et *Verticillium*. L'action inhibitrice des extraits du *Ciste ladanifère* est due, surtout, à leur composition chimique riche en composés sesquiterpéniques à structure de base labdanique (**Mrabet et al., 1999**).

L'étude des propriétés antioxydantes des hydrolysats enzymatiques du pollen de *Cistus ladaniferus* préparés par digestion par l'emploi de trois enzymes (pepsine, trypsine, et papaïne) a démontré qu'ils possédaient des capacités fortement antioxydantes contre des espèces réactives de l'oxygène. Les hydrolysats du pollen sont bénéfiques non seulement comme additif dans les aliments diététiques, mais également aux patients présentant les diverses maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, et le diabète (**Nagai et al., 2005**).

Tableau 06: Composants chimiques de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* (Kaïd Slimane, 2004).

Composé	Teneurs en %	
	Zarifet	Hafir
Camphene	1.18	8.14
Alpha terpinene	0.51	0.93
para cymene	0.91	1.30
cyclohexanone 2,2,6 trimethyl	7.53	6.81
cineol	0.50	0.71
NI	0.80	0.70
Gamma terpinene	1.00	1.45
NI	0.76	0.73
NI	0.65	0.30
NI	1.00	0.90
NI	0.90	0.45
NI	0.60	0.36
NI	0.80	0.57
NI	0.91	1.06
Trans pinocarveol	1.77	2.43
Menth-3-en-3ol	0.46	0.54
NI	1.31	1.20
borneol	9.32	9.14
NI	0.70	0.50
Terpineol-4	1.83	2.60
NI	0.60	0.45
NI	1.30	0.78
NI	0.42	0.35
NI	0.60	0.41
NI	1.62	0.30
NI	0.47	0.30
NI	0.44	0.45
NI	1.72	1.70
NI	0.76	0.53
Béta gurgunene	0.86	0.92
NI	1.47	1.61
NI	1.71	1.30
Gamma cadinene	0.63	0.77
NI	1.44	1.40
Delta cadinene	7.17	7.51
NI	0.51	0.53
NI	1.22	1.24
NI	1.62	0.60
Oxyde de caryophyllene	2.11	1.81
NI	1.45	1.37
Copraborneol	12.50	7.96
Epi cubenol	2.40	2.04
Trans cadinol	0.46	0.31
NI	0.80	0.67
Béta eudesmol	1.90	0.30
NI	1.52	0.53
NI	1.10	0.24

V-3. *Crataegus oxyacantha* L

● Présentation et description de la plante

Aubépine (*Crataegus oxyacantha* L.)

Épine blanche, épine de mai.

(Du latin «alba» blanche, et «spina» : épine)

(Fernandez, 2003).

Nom arabe: عين البقرة

Classification :

Règne:	Plantes
Sous règne:	Plantes vasculaires
Embranchement:	Spermaphytes
Sous-embranchement:	Angiospermes
Classe:	Dicotyledones
Sous classe:	Rosidae
Ordre:	Rosales
Famille:	Rosaceae
Genre:	<i>Crataegus</i> L
Espèce:	<i>Crataegus oxyacantha</i> L

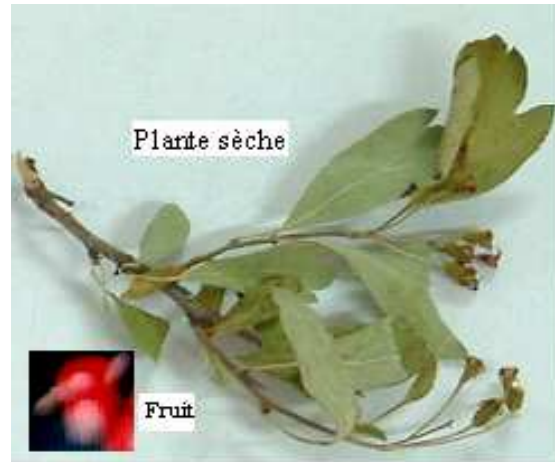


Fig. 13: Photo *C. oxyacantha* L de la région de Oum el Alou

(Quezel et Santa, 1963)

Crataegus laevigata (poiret) (= *C. oxyacantha* L., *C. oxyacanthoides* Thuill. *C. oxyacantha* L ssp *polygala* Lev, *C. oxyacanthoides* Thuill, et *Mespilus oxyacantha* (Gartn) Crantz) (Fong et Bauman, 2002).

Il y a plus de 1000 espèces et hybrides différents de *Crataegus* dans le monde entier. Les deux espèces le plus fréquemment utilisées sont *Crataegus monogyna* et *C. oxyacantha*. Médicalement, elles partagent beaucoup de caractéristiques semblables (Davies, 2000; Grieve, 1931).

Le nom botanique *Crataegus* a ses origines du grec : kratos qui signifie la " dureté " ou la " force " (du bois). Le nom de l'espèce provient également de la langue grecque: *oxyacantha* – *oxus* signifie " pointu", *acantha* signifie une " épine" (Davies, 2000; Grieve, 1931).

L'Aubépine, *Crataegus oxyacantha*, arbuste trouvé dans l'ensemble de l'Europe (Rose et Treadway, 1999), dans l'Algérie sauf les hauts plateaux (Quezel et Santa, 1963), de 3 à 5 mètres ; peut atteindre 10 mètres (Nemecz, 2001), fait parti des Rosacées (Fernandez, 2003), arbuste épineux, commun dans presque toutes les zones tempérées de l'hémisphère nord (Bruneton, 1993) y compris des régions de l'Amérique du Nord, de l'Amérique du Sud, l'Est de l'Asie et de l'Europe (Pizarro, 1966; Bruneton, 1995).

Les feuilles d'un vert brillant ont 3-5 lobes obtus peu profonds. Les fleurs, blanches se développent et fleurissent à partir du mois d'avril à juin (Nemecz, 2001), groupées en corymbes rameux, ont 5 sépales triangulaires, 5 pétales blancs, un androcée de 15-20 étamines insérées sur le bord d'un réceptacle brun vert 2-3 carpelle. Les pédoncules floraux et les sépales sont glabres, les étamines ont des anthères rouges et l'on démontre habituellement 2-3 styles, le fruit rouge foncé, globuleux ou ellipsoïde (Tutin, 1976; Nemecz, 2001). En poudre, le matériel végétal est d'une couleur vert jaunâtre (European pharmacopoeia, 2000).

• Composition

Principes actifs : pigments flavoniques, amines, dérivés terpéniques, histamine, tannin, vitamine C (Fernandez, 2003).

la drogue renferme des amines aromatiques, une trace d'huile essentielle, les majeurs constituants chimiques sont les flavonoïdes (1-2 %) et les proanthocyanidines (2-3 %), on rencontre de la rutine, hyperoside, vitexine, vitexine-2" rhamnoside, acetylvitexine-2" rhamnoside. Des flavonols glycosides dans l'inflorescence essentiellement hyperoside, spiraeroside et rutine sont présents. Dans les feuilles, des oligomères procyanidines, (-)-épicatechine et/ou (+)- catéchine, des acides phénols (acide chlorogénique, acide caféique). Les constituants non phénoliques sont les triterpènes pentacycliques comme l'acide ursolique, l'acide oleanolique et son dérivé le 2- α hydroxy connu sous le nom de l'acide crataegolique sont parmi les composés caractéristiques (Bruneton, 1993; Fong et Bauman, 2002).

Les flavonoïdes et les oligomères procyanidiques sont surtout dans les feuilles et les fleurs, cependant, ils sont plus faible dans les fruits : environ 0.1-0.5% flavonoïdes, ainsi la vitexine et la vitexine 2"- rhamnoside ne sont présent qu'à l'état de traces (Wichtl et Anton, 1999). Svedström et al. (2002) ont identifié deux oligomères procyanidines (fig. 14) ; un trimère (a) : epicatechine-(4 β →8)-epicatechine-(4 β →6)-epicatechine et un pentamère (b) constitué d'unités (-)-epicatechine liées par des liaisons C-4 β /C-8

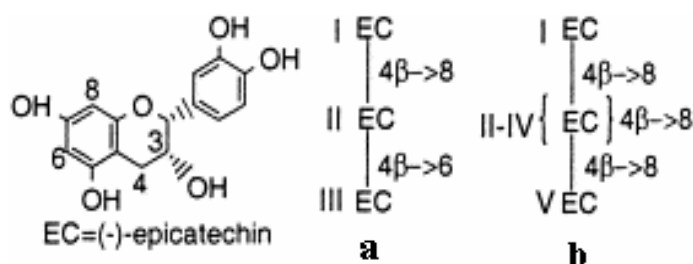


Fig. 14: Oligomères procyanidines (Svedström et al., 2002).

D'après Rose et Treadway (1999), les constituants thérapeutiques principaux qui ont été isolés de l'aubépine sont des flavonoïdes et des procyanidines. D'autres constituants incluent la catéchine, les triterpénoïdes, les acides carboxyliques aromatiques, les dérivés aminés et de purine, et divers autres composés. La teneur en flavonoïdes de la drogue brute est approximativement 1% pour les feuilles et fleurs mais seulement environ 0,1% pour les baies. La teneur des procyanidines oligomères dans les feuilles et les fleurs est environ 1-3%.

• Les activités biologiques

Seulement vers la fin de 1800, que les médecins européens commencèrent à expérimenter l'aubépine comme médicament pour les maladies cardiovasculaires, en utilisant seulement l'aubépine blanche pour des buts thérapeutiques (**Rose et Treadway, 1999**). Les fruits et feuilles de l'aubépine ont été considérés comme bons remèdes pour les douleurs de l'appareil digestif et urinaire (**Rose et Treadway, 1999**). Elle est antispasmodique, astringent, diurétique, fébrifuge, hypotensive, sédative (**Fernandez, 2003**).

L'aubépine renforce la contraction du myocarde (**Gruenwald et al., 1998**). Les extraits Procyanidines de l'aubépine aident à réduire les niveaux de cholestérol et à diminuer la taille des plaques athérosclérotique. Cette action est le résultat de la capacité de l'aubépine à maintenir l'intégrité de la matrice (collagène) des parois des vaisseaux, les rendant plus résistants, ce qui peut aider à empêcher le développement et la progression de la plaque athérosclérotique (**Rose et Treadway, 1999**). Les procyanidines oligomères sont responsables des actions cardiaques de *Crataegus*. Ils augmentent l'utilisation de l'oxygène par le cœur et aident le métabolisme enzymatique (**Davies, 2000**).

Selon les études de **Sun et al. (2002)**, les extraits de *Crataegus oxyacantha* ont montré des effets cardioprotecteurs via l'activité de piéger les radicaux et d'inhiber l'élastase. Dans une autre étude sur l'homme, comprenant 30 volontaires diagnostiqués en tant que hyperlipidémiques, après 1 mois de consommation d'Aubépine, les niveaux moyens de cholestérol ont diminué de $7,31 \pm 1,04$ mmol/l au $6,19 \pm 1,56$ mmol/l ($P < 0,001$) et les niveaux de triglycéride du sérum ont diminué de $1,93 \pm 0,92$ au $1,75 \pm 0,96$ mmol/l (**Zapatero, 1999**). La teinture de *Crataegus* empêche également l'accumulation du cholestérol dans le foie en augmentant la dégradation de cholestérol en acides biliaires et simultanément par suppression de la biosynthèse du cholestérol (**Rajendran et al., 1996**).

Les proanthocyanidines favorisent la relaxation et la dilatation des artères coronariennes, de ce fait augmentent l'irrigation cardiaque. Ils sont aussi très antioxydants, stoppent ou diminuent la détérioration des vaisseaux sanguins (**Chevallier, 1996**).

Les Amines cardiotoniques : triméthylamine ; dans les fleurs seulement, phénylalanine et tyramine, permettent une meilleure circulation, réduisent l'hypertension, et donc maintiennent l'équilibre cardiaque (**Davies, 2000**).

Les Acides phénoliques ; acide cratégolique, acide citrique, acide tartrique, acide chlorogénique et l'acide triterpénique augmentent et favorisent l'écoulement du sang. L'acide citrique équilibre les niveaux de l'acidité du corps, favorise également la fonction digestive en augmentant la production de bile (**Davies, 2000**).

La racine, feuille et fleur de *Crataegus* contiennent tous des composés cardioactifs (**McGuffin, 1997**), les extraits de *Crataegus* ont montré une basse toxicité, avec un LD 50 de 25mg/kg (**Ammon et Handel, 1981**).

V-4. *Smyrniium olusatrum L*

● Présentation et description de la plante

Nom commun :

Maceron, grande ache, persil de cheval, gros persil de Macédoine

Le nom arabe : الحيار

Nom espagnol : Apio caballar

Classification :

Règne: Plantes

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotyledones

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae

Genre : *Smyrniium*

Espèce : *Smyrniium olusatrum L.*

(Quezel et Santa, 1963)

Le Maceron, *Smyrniium olisatrum L.*, encore appelé persil de Macédoine, est une plante de la famille des Ombellifères qui vit à l'état sauvage en Europe méridionale (Mathon, 1986), dans le sud et l'ouest, particulièrement dans des secteurs des côtes des îles britanniques, la région méditerranéenne et s'étend au Caucase et les îles Canaries (Mölleken et al., 1998) et dans toute l'Algérie (Quezel et Santa, 1963).

Cultivé, en France, dans les jardins des monastères et des châteaux pendant quinze siècles, du début de l'ère chrétienne au XVII^e siècle (Mathon, 1986), les tiges cuites et les jeunes pousses aussi bien que les racines crues et cuites étaient consommé en tant que légumes (Mölleken et al., 1998), en plus le Maceron était consommé pour sa racine tubérisée à la manière de la carotte ou pour sa feuille, donnée comme ayant des propriétés antiscorbutiques (Mathon, 1986).

L'herbe était cultivée donc partout dans l'Europe (Mölleken et al., 1998). La fin du XVII^e siècle marque le déclin du Maceron, auquel le céleri se substituera définitivement. Aujourd'hui, aucune forme cultivée de Maceron n'existe (Mathon, 1986).

C'est une plante herbacée bisannuelle, à tige vigoureuse, creuse à l'intérieur, cannelée longitudinalement, qui peut atteindre 1,5 m de haut. Les feuilles, opposées, de couleur vert clair, relativement de grande taille, sont composées, à folioles larges et dentelées. Celles de la base sont complètement divisées trois fois. Les feuilles supérieures n'ont que trois folioles. La racine, charnue, est du type pivotant. Les fleurs, vert jaunâtre, sont groupées en ombelles composées, à involucre peu développé. Les fruits ont 4-5 mm de long et à maturité sont noirs. Période de floraison: avril à juillet. Fruit est de type: akène (Julve, 1998).



Les jeunes pousses de *S. olusatrum*



L'herbe sèche avec graines

Fig. 15: Photo de *S. olusatrum* de la région de Oum el Alou

• **Composition chimique**

Concernant la phytochimie de *S. olusatrum*, les tiges et feuilles ont été étudiées pour leur contenu en flavonoïdes et acides phénoliques. Les sesquiterpènes de la racine identifiés sont germacrone, isofuranogermacrone, furanodiène, glechomafurane, composé C18 acetylenique, 1(10)-époxygermacrone et furanoeremophil-1-one. Ce dans les fruits sont : le glechomafuran, furanodiène et 1 β -acétoxyfurano-4(15)-eudesmène (Mölleken et al., 1998).

L'étude phytochimique réalisée par Mölleken et al. (1998) sur les différentes parties de la plante a révélé les résultats suivants (tableau 07) : les huiles de la racine se composent de 49.54% sesquiterpènes oxygénés, la plupart sont des furanosésquiterpènes, 40.21% de monoterpènes hydrocarbonés, dont β -phellandrene et limonène constituants principaux avec de quantités mineures de myrcène, δ -3-carene et α -pinène.

L'huile de l'herbe renferme 44.74% furanosesquiterpene, comportant 34.89% furanodiene / isofuranogermacrene et 9.52% furanoeremophil-1-one, alors que les monoterpènes représentent 42.18% de l'huile. Les monoterpènes majoritaires sont : β -phellandrene, limonene, myrcene et δ -3-carene.

Tableau 07: Composition de l'huile essentielle de *Smyrniium olusatrum* Selon Mölleken et al. (1998).

Composés	Racines	herbes	Composés	Racines	herbes
α -Pinene	1.07	0.86	γ -Muurolene	0.05	0.07
α -Thujene	0.07	0.05	α -Terpineol	0.02	-
Toluene	-	0.05	Germacrene D	2.85	4.43
Camphene	-	-	Acetate de Neryl	0.63	1.12
β -Pinene	0.20	0.14	Bicyclogermacrene	0.04	0.06
Sabinene	0.15	0.18	(E)-Piperitol	-	-
δ -3-Carene	1.20	1.74	Acetate de Geranyl	-	-
Myrcene	3.69	5.80	δ -Cadinene	0.10	0.17
α -Phellandrene	0.85	0.72	γ -Cadinene	-	0.09
p-Mentha-1(7),8diene	0.08	0.09	Germacrene A	0.11	-
α -Terpinene	0.03	-	Citronellol	0.19	0.38
limonene	11.81	6.62	Cadina-1,4-diene	0.04	0.09
β -Phellandrene	20.35	24.92	Myrtenol	-	-
(z)- β -Ocimene	-	-	Acetate de 2-Phenylethyl	-	-
γ -Terpinene	0.09	0.07	Germacrene B	1.49	1.24
(E)- β -Ocimene	0.20	0.23	(E)-Carveol	-	-
p-Cimene	0.33	0.67	p-cymene-8-ol	-	-
Terpinolene	0.09	0.09	Isofuranogermacrene	20.51	20.51
1-Octen-3-yl acetate	-	-	Furanodiene	17.13	17.13
(E)-Sabinene hydraté	0.03	-	T-Cadinol	-	-
α -Copaene	0.04	0.07	T-Muurolol	-	-
Benzaldehyde/ β Bourborene	0.06	0.10	β -Elemenone	0.27	0.27
Linalool	-	-	Docosane	-	-
(E)-p-Menth-2-en-1-ol	0.06	0.07	Elemicine	0.34	0.34
acetate de Bornyl	0.04?	-	α -Cadinol	0.15	0.06
β -Elemene	0.73	0.79	Germacrene	0.13d	-
β -Caryophyllene	0.26	0.47	Tricosane	0.14	0.26
Terpinene-4-ol	-	-	Tetracosane	-	-
Myrtenal/(Z)-p-Menth-2-en-1-ol	0.04	0.05	Pentacosane	-	0.06
γ -Elemene	0.31	0.27	Phytol	0.30	0.55
Acetate de Citronellyl	0.32	0.46	Furano-4(15)-eudesmen-1-one	-	-
α -Humulene	0.08	0.11	Furanoeremophil-1-one	10.83	9.52
alcool Furfuryl	0.15	0.31	1 β -Acetoxifurano-4(15) eudesmene	0.19	0.13
(E)-Verbenol	-	-	1 β -Acetoxifurano-3 eudesmene	0.33	0.14

Matériel
et
Méthodes

I- Matériel végétal

I-1. Récolte des plantes

Les plantes ont été récoltées durant la période allant du mois de novembre 2004 jusqu'au juin 2005, de trois stations de la wilaya de Tlemcen (Algérie) (**fig. 16**).

- *Lavandula stoechas* : récolté de la région de Aïn fezza.
- *Smyrniium olusatrum* : région Oum el Alou.
- *Cistus ladaniferus* : région de Sidi M'hammed (station de Honaine).
- *Crataegus oxyacantha* : région de Oum el Alou.

Les situations géographiques de ces stations figurent dans le **tableau 08**.

Tableau 08: Situation géographique des stations de récolte.

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Oum el Alou	1 022 m	34°49' N	1°16' W	Semi-aride à hivers tempéré
Aïn fezza	1 000 m	34°50' N	1° 17' W	Semi-aride à hivers tempéré
Sidi M'hammed	380 m	35° 05' N	1° 27' W	Semi-aride à hivers frais

I-2. Conservation

Les plantes, fraîchement récoltées, sont lavées et laissées sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Devenues sèches, les parties utilisées (tableau 09) sont récupérées dans des sacs propres. Notant qu'avant le lavage, une certaine quantité des plantes sont récupérées pour la mesure du taux d'humidité.

Tableau 09: Organes végétaux destinés pour l'extraction.

L'espèce végétale	Les parties étudiées
<i>Lavandula stoechas</i>	Les feuilles
<i>Cistus ladaniferus</i>	Les feuilles
<i>Crataegus oxyacantha</i>	Les feuilles Les boutons floraux Les fleurs
<i>Smyrniium olusatrum</i>	La partie aérienne : Les feuilles Les fleurs Les tiges

I-3. Détermination de l'humidité

Le contenu en humidité des plantes a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve (**Twidwell et al., 2002 ; Simpson, 1999**).

Considérons ;

α → Poids de l'échantillon "plante fraîche".

β → poids de l'échantillon "plante sèche".

H% → taux d'humidité exprimé en pourcentage.

$$H\% = (\text{poids } \alpha - \text{poids } \beta) / \text{poids } \alpha \times 100$$



Fig. 16: Carte géographique de la région de Tlemcen montrant les trois stations de récolte.

Station de récolte

Pour plusieurs mesures, on calcule l'humidité moyenne :

$$H\%(moy.) = \frac{[\sum_{i=1}^n \alpha_i - \sum_{i=1}^n \beta_i] / \sum_{i=1}^n \alpha_i \times 100}{n}$$

Ou

$$H\%(moy.) = \frac{H_1\% + H_2\% + \dots + H_n\%}{n}$$

$i = 1, \dots, n$. n : nombre d'échantillon..

Moy. : Moyenne.

$H_1\%$: humidité de l'échantillon № 1

$H_2\%$: humidité de l'échantillon № 2

.....

 ↓

$H_n\%$: humidité de l'échantillon № n

n : nombre total des échantillon.

II- Les huiles essentielles

II- 1. Procédé d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation pour la Lavande, le Ciste et entraînement à la vapeur pour le *Smyrnum*.

- Hydrodistillation : 100g de plante sèche est introduite dans un ballon à 3 cols ou fiole de deux litres, imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 2 à 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité (**fig. 17**).

- Entraînement à la vapeur : 500g de matériel végétal sec est placé sur une grille, qui surmente l'eau en ébullition, les vapeurs ; en traversant la plante font éclater les cellules et entraînent avec elles l'huile. Après condensation et liquéfaction, l'huile surmente l'eau dans l'ampoule de décantation (**fig. 18**).

L'huile séparée de l'eau aromatique est déshydratée par congélation et/ou par le sulfate de sodium (Na_2SO_4), et conservée à + 5°C.

Vu le rendement très faible, on a arrêté l'extraction d'huile avec les deux plantes : *C. oxyacantha* et *S. olusatrum*.

II- 2. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter (**Carré, 1953**). Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante

$$R = \frac{P_B}{P_A} \times 100$$

Ou

$$R = \frac{[\sum P_B / \sum P_A] \times 100}{n}$$

R : Rendement de l'huile en %

P_B : poids de l'huile en g

P_A : poids de la plante en g

II- 3. Mesure de la densité

La densité relative de l'huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à 20°C (AFNOR , 1992).



Fig. 17: Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle.

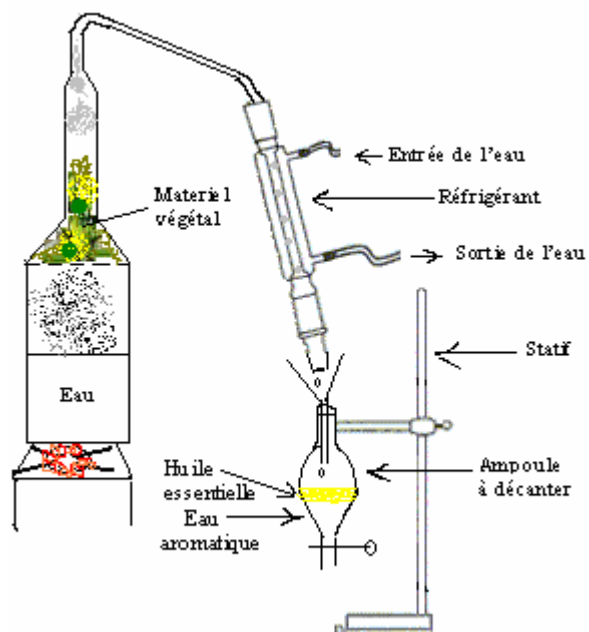


Fig. 18: Schéma du dispositif de l'entraînement à la vapeur

II- 4. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG/RMN-¹³C

Les analyses de la composition chimique de nos huiles essentielles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire pour la détermination de leur composition chimique et l'identification de leur chimiotype.

II- 4-1. Principe de la CPG/RMN

En chromatographie en phase gazeuse (CPG), l'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne, l'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile (Laverdière et al., 1999).

Le principe de séparation repose sur une différence de répartition des composés d'un mélange entre deux phases, la phase mobile et la phase stationnaire (imprégné dans la colonne). Les composants du mélange injecté dans la colonne et poussé dans celle-ci par le gaz vecteur interagissent différemment avec la phase stationnaire et de ce fait leur progression dans la colonne ne se fera pas à la même vitesse. Ce phénomène d'interaction provoque ainsi la séparation des constituants du mélange. Un système de détection adéquate en sortie de colonne permet de créer un signal qui est enregistré sous forme de "pics chromatographiques".

La RMN du proton du carbone (¹³C-RMN) permet d'aboutir à la détermination complète des structures avec en particulier la stéréochimie des liaisons entre atomes (Lafont, 2002)

II- 4-2. Conditions opératoires

Analyse par CPG

Les analyses ont été faites à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem, équipé d'un injecteur diviseur, de deux colonnes capillaires (50 x 0,22 mm d.i.; épaisseur du film: 0,25 mm), polaire (BP20), polyéthylène glycol) et apolaire (BP1, diméthylsiloxane) et de deux détecteurs à ionisation de flamme.

Les conditions opératoires sont les suivantes: gaz vecteur: Hélium, pression en tête de colonne: 20psi, programmation de température: de 60 à 220°C à 2°C/min avec un palier de 20 min à 220°C, température de l'injecteur: 250°C, température des détecteurs: 250°C, injection: mode split.

Analyse par RMN-¹³C

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un appareil Bruker400 MHz, équipé d'une sonde de 5 mm opérant à 100 MHz pour le carbone-13, dans le chloroforme deutérié. Les déplacements chimiques sont des donnés en ppm (δ) par rapport au TMS pris comme référence interne.

Les spectres RMN du carbone-13 ont été enregistrés avec les paramètres suivants: durée de l'impulsion (PW): 2,8 μ s [ou 5 μ s] (angle d'impulsion 45°); temps d'acquisition: 1,3s correspondant à une acquisition de 32 K avec une largeur spectrale (SW) de 12 500Hz (250 ppm), Les données du signal de précession libre sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle (LB = 1Hz). L'analyse d'un mélange est menée sur échantillon de 70 mg [ou 200 mg] dilué dans 0,5 ml de CDCl₃.

III- les flavonoïdes

III- 1. Protocole d'extraction

On a employé les solutions méthanoliques pour l'extraction des flavonoïdes, méthode décrite par **Upson et al. (1999)**, qu'on a modifié au laboratoire (**Fig. 19**).

- pour 1g de plante sèche rendu en poudre placé dans un récipient en verre (fiolle, erlen ou bécher), couvert de 20 ml de MeOH aqueux 70% (7 :3),
- le tout est chauffé à 70°C pendant 5 minutes (ce procédé tue le tissu végétal, empêchant l'oxydation ou l'hydrolyse enzymatique).
- l'échantillon est laissé macérer durant une nuit (24 heures).
- après une première filtration sur papier filtre n° 589, 13 cm de diamètre,
- Le filtrat est évaporé sous vide à sec en utilisant un Rotavapeur laborota 4000-efficient, à la température de 45-50°C.
- L'extrait sec destiné au test microbiologique est récupéré avec le DMSO (notant ici que la quantité de départ de la plante sous forme de poudre mise à l'extraction est de 100g et que l'extrait sec résultant est solubilisé dans 5ml de dimethyl sulfoxyde).
- Pour les analyses CCM le résidu sec est repris avec un minimum de méthanol 95°, Subi une filtration sous vide sur filtre No DS0215-4045, 47mm de diamètre et de porosité 0.45µm.
- L'extrait sec en solution est conservé à +5°C.

III- 2. Détermination du rendement

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

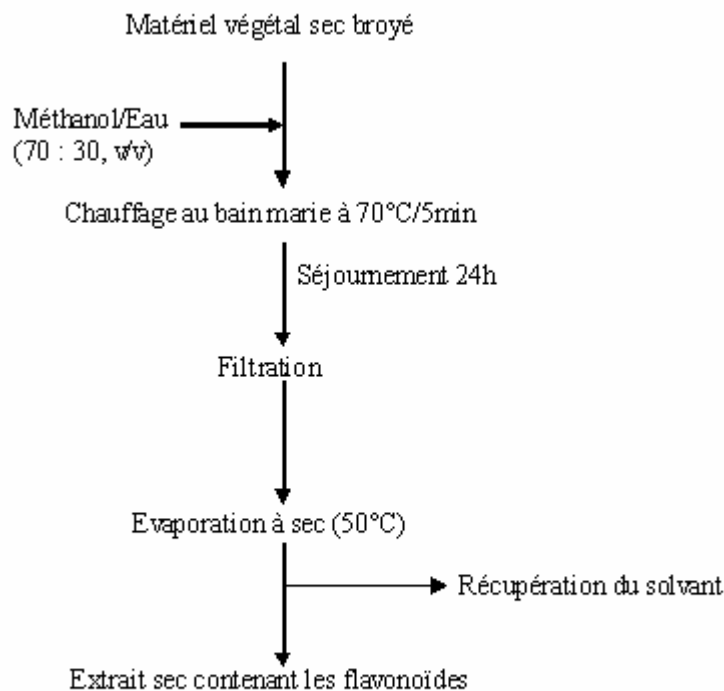


Fig. 19: Protocole d'extraction des flavonoïdes.

III- 3. Mise en évidence des flavonoïdes

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mis en évidence par un test simple et rapide au magnésium (**Karumi et al., 2004**). Le test consiste à ajouter à un minimum de volume de l'extrait méthanolique quelques gouttes de HCl concentré (2N) et 0.5g de Mg. On laisse agir 3 minutes

Lecture des résultats : coloration orange ou rouge, implique la présence des flavonoïdes.

III- 4. Dosage des polyphénols

Les polyphénols ont été déterminés spectrophométriquement par la méthode de Folin Ciocalteu (**Singleton et al., 1999; Heilerová et al., 2003**).

On a additionné à 1 ml de l'extrait dilué avec de l'eau distillée (1:1) 10ml de la solution de Na_2CO_3 , incubés à 38°C dans un bain marie pendant 10 minutes, ensuite 1ml du réactif de Folin Ciocalteu à été ajouté à l'ensemble, après 30minutes, l'absorbance à été mesuré à 660nm contre un blanc sans extrait.

La quantification des polyphénols à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y= ax + b$) réalisé par un extrait d'étalon "résorcinol" à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en g équivalent résorcinol par 100g du poids sec de la plante en poudre.

III-5. Dosage des flavonoïdes

La méthode au AlCl_3 (**Lamaison et Carnet, 1990; Huang et al., 2004**) a été employée pour la détermination de la teneur totale en flavonoïdes des extraits échantillons.

Un millilitre (1ml) de la solution de l'extrait à été ajoutée à un volume égal d'une solution de 2% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2 g dans 100 ml méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité, et l'absorbance à 367 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

Une courbe d'étalonnage ($y= ax + b$) réalisée par le catéchol à différentes concentrations pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimé en mg catéchol équivalent /100g poids sec de la plante).

III-6. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince "CCM"

Principe :

La chromatographie sur couche mince est essentiellement une chromatographie liquide exécutée sur une couche de particules d'une substance polymérisée immobilisée sur un support planaire (**Yrjönen, 2004**).

Méthode :

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de Silicagel G60 ; 0.25mm, sur support rigide en verre ; 20/20cm.

Deux microlitres (2µl) de chaque extrait ainsi que des étalons sont déposés à des points repères à 1,5cm du bord inférieur de la plaque. On a employé comme éluant un mélange de BAW (*n* - Bu OH, HOAc, H₂O « 4: 1: 5 »; v/v), un mélange Acétone/Eau (1 :1 ; v/v) et le système solvants Chloroforme/Méthanol/Eau (90 :10 : 5 ; v/v).

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 366 nm. Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour les Rf.

IV- Tests microbiologiques

IV-1. Les souches testées

Les souches utilisées dans les tests font parties de trois groupes de microorganismes (**tableau 10**), qui sont des pathogènes et des contaminants.

IV-2. Conservation des souches

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

IV-3. Les milieux de culture

Suivant les méthodes employés dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé comme milieux de culture les suivants :

- Gélose Nutritive, Bouillon et Gélose Mueller Hinton pour les bactéries,
- Milieu TGEA, Bouillon Nutritif et milieu Sabouraud liquide pour les levures,
- Milieu PDA pour les moisissures.

Le milieu PDA à été préparé au laboratoire à base de pomme de terre, les autres milieux, proviennent du commerce (Prochima).

IV-4. Préparation des précultures

IV-4-1. Précultures des levures et bactéries

Pour la fixation de l'inoculum de départ, on a employé une méthode photométrique (**Atwal, 2003**).

Pour chaque microorganisme, 10 ml de milieu de culture fraîchement préparé et stérilisé (MH pour les bactéries, Bouillon Nutritif pour les levures) à été inoculé avec une colonie prélevé d'une culture de 24 heure , incubé durant la nuit. Après 18 heures à 20 heures d'incubation, quelques gouttes de cette culture à été dilué dans de l'eau distillé stérile pour en avoir une densité de 0,1.

On admet que cette densité mesurée à 625 nm est équivalente à 1×10^8 cfu/ml, la suspension d'inoculum à été ensuite dilué 1 :10 dans de l'eau distillé stérile à une concentration finale de 1×10^7 cfu/ml.

IV-4-2. Précultures des moisissures

Des boîtes de pétri, contenant le milieu PDA solide, on dépose un disque au centre de chaque boîte provenant d'une culture pure préparé au préalable. On incube :

- 48 heures pour *Rhizopus stolonifer*
- 7 jours pour les autres souches

Tableau 10: La source des souches concernées par les tests.

Les souches	La source
1-Les moisissures	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Laboratoire produits naturels (équipe : utilisation des sous-produits agro-alimentaires pour la production de biomasse et des protéines d'organismes unicellulaires et les métabolites actifs. (Tlemcen) (Mr. Moussaoui)
<i>Mucor sp.</i>	
<i>Trichoderma sp.</i>	
<i>Alternaria sp.</i>	
<i>Fusarium sp.</i>	
<i>Penicillium sp.</i>	
<i>Aspergillus flavus</i> de référence (AFR) : 99.4294	Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) Paris (France).
2- Les bactéries	
<i>E. coli</i> ATCC25922	Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique (Tlemcen)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	
<i>Escherichia coli</i> (E1): 5044172	Laboratoire de microbiologie de Sidi Bel Abes.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P4): 22212004	Laboratoire de microbiologie DB (Tlemcen).
<i>Staphylococcus aureus</i> (ST1): ATCC 601.	Laboratoire de phytopharmacie, Paris 7 (France)
<i>Listeria monocytogenes</i> (L11): ATCC 19111	Laboratoire de microbiologie DB (Tlemcen)
<i>Enterobacter cloacea</i> (En) : 1305573	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital (C.H.U).
<i>Citrobacter sp.</i>	Laboratoire des produits naturels. (Tlemcen)
<i>Proteus mirabilis</i> (Pr) : 0536040	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital (C.H.U).
<i>Salmonella typhi</i> (SL) : 4404540	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital (C.H.U).
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KL1): 5215773	Laboratoire vétérinaire de Tlemcen (L.V.R.T).
3- Les levures	
<i>Candida albicans</i> 444	Laboratoire des produits naturels. (Tlemcen)

Avant les tests, les souches ont subi une série de repiquage pour s'assurer de leur pureté.

IV-5. Les techniques microbiologiques

IV-5-1. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques

IV-5-1-1. Principe

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (**Burnichon et Texier, 2003**) de même pour l'antifongigramme, qui consiste à déterminer la sensibilité des mycètes vis-à-vis d'un ou plusieurs antifongiques.

IV-5-1-2. Choix des antifongiques et antibiotiques

Le choix des antibiotiques et les antifongiques a été fait en fonction de la disponibilité.

Les antibiotiques :

- **Quinolones** : Acide Nalidixique "NA" 30 µg
- **Sulfamides et associations** : Sulfaméthoxazole "SXT" 1.25 / 23.75µg
- **Macrolides** : Spiromycine "SP" 100µg
- **Tétracyclines** : Tétracycline "TE" 30µg
- **Macrolides** : Erythromycine "E" 15 UI

Les antifongiques :

- **Nystatine** (Mycostatine)

IV-5-1-3. Méthodes d'étude

Pour les bactéries, on a testé leur sensibilité par la méthode des disques ou antibiogramme standard (**Joffin J-N et Leyral, 2001**), ainsi, cette méthode a été aussi appliquée pour les levures.

Pour les moisissures, on a appliqué la méthode de dilution effectuée en milieu solide (**Guérin-Faublée et Carret, 1999 ; Burnichon et Texier, 2003**).

1-Antibiogramme :

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture (**Guérin-Faublée et Carret, 1999**).

Application : Dans des boîtes de 9cm de diamètre contenant 10^6 cfu de culture bactérienne effectuée à la surface de 10 ml de gélose MH, des disques imprégnés d'antibiotique de dose connues sont appliqués à la surface à des distances déterminés (3 à 5 disques/boîte).les boîtes sont incubées à température ambiante pendant 30 min, ensuite dans une étuve à 37°C pendant 18 à 20 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée. Les valeurs sont comparées avec celles de référence (**tableau 11**).

Tableau 11: Liste des Antibiotiques et des valeurs de références.
Comité Français de l'antibiogramme 2000 (Joffin J-N et Leyral, 2001)

antibiotique	sigle	classe	CCinf µg.ml-1	d. CCinf mm	CCsup µg.ml-1	d.CCsup mm
Acide Nalidixique	NA	Quinolones	8	20	16	15
Sulfaméthoxazole	SXT	Sulfamides	2/38	16	8/152	10
Spiromycine	SP	macrolides	1	24	4	19
Tétracycline	TE	Tétracyclines	4	19	8	17
Erythromycine	E	macrolides	1	22	4	17

2- Antifongigramme :

En milieu solide, on dépose un disque de mycélium au centre en surface du milieu PDA, additionné au préalable d'une concentration connue de Mycostatine. Les boîtes sont incubées à la température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

IV-5-2. Test du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et flavonoïdes

IV-5-2-1. Test préliminaire

Les méthodes du test que ce soit pour les huiles ou flavonoïdes ont été choisies après un essai préliminaire étant donné que l'huile est non miscible avec l'eau et que les flavonoïdes en fin d'extraction seront récupérés par un solvant.

On a testé la toxicité de quatre solvants (Méthanol, Ethanol, Tween 80 à 0.05% et le DMSO) vis-à-vis de la souche *Rhizopus stolonifer*. Un contrôle sans solvant a été réalisé.

IV-5-2-2. Essai antifongique et antimicrobien

L'essai antifongique contre les moisissures a été estimé par la méthode de contact direct (Mishra et Dubey, 1994 ; Belghazi et al., 2002), les extraits des flavonoïdes ont été solubilisés dans du DMSO (Nostro et al., 2000 ; Souza et al., 2003 ; Lahlou, 2004 ; Veluri et al., 2004 ; Alam et Mostahar, 2005).

L'essai antibactérien a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose (Murtaza et al., 1994 ; Veličkovič et al., 2003 ; Alam et Mostahar, 2005) La gélose Mueller Hinton (Ericson et Sherris, 1971) a été employé pour l'essai de la sensibilité des différentes souches (Nostro et al., 2000 ; Rahman et Gul, 2002). Milieu TGEA pour la levure *Candida albicans*.

1- Essai antifongique

Des quantités appropriées de l'extrait naturel (huile essentielle, extrait des flavonoïdes) ont été ajoutées au milieu PDA stérile encore liquide pour obtenir différentes concentrations (tableau 12). Un disque mycélien (Mishra et Dubey, 1994 ; Khallil, 2001), de diamètre de 6 millimètres pris de la culture du mycète a été inoculé à chaque boîte de Pétri. PDA sans extrait a servi de témoin.

Tableau 12: Concentrations expérimentées pour l'essai antifongique.

	Concentration en µl /20ml PDA	Concentration en % (v/v)*
Les huiles essentielles	4	0.02
	10	0.05
	20	0.1
	40	0.2
	100	0.5
Les flavonoïdes	300	1.5
	500	2.5
	700	3.5

v/v : volume de l'huile ou extrait flavonoïdes/ volume PDA

Le volume de PDA est 20ml/boite (Khallil, 2001; Motiejūnaitė et Peičulytė, 2004), les extraits se sont ajoutés au milieu de culture à la température de 56 °C (Subrahmanyam et al., 2001). Les souches se sont incubés : 48 heures pour *Rhizopus stolonifer*, 4 jours pour *Mucor* ; *Alternaria* ; *Trichoderma*, 7 jours pour *Aspergillus flavus* ; *Penicillium* et *Fusarium* à la température de 25 ± 2°C.

Des mesures de diamètres des colonies ont été faite après la fin d'incubation pour chaque concentration et extrait. La concentration minimale inhibitrice « CMI » est défini comme étant la plus basse concentration où aucune croissance n'est visible, l'IC50 représente la dose réduisant de 50% la croissance microbienne, ainsi pour ce dernier paramètre l'action antifongique a été déterminée par la mesure de l'inhibition de la croissance de la colonie fongique, en utilisant la formule d'Ebbot (Motiejūnaitė et Peičulytė, 2004) :

$$T = (D_k - D_o) / D_k \times 100 \%$$

D_k : diamètre de la colonie mycélienne témoin, en centimètre

D_o : diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience

T: taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage

2- Essai antimicrobien

Test par diffusion sur disque :

Des cultures pures développées durant une nuit dans un bouillon approprié, ajustées par de l'eau distillée stérile pour passer de 1x10⁸ cfu/ml à 1x10⁷ cfu/ml. 100µl de chaque suspension, contenant approximativement 1 x10⁶ cfu à été étaler à la surface du milieu gélosé : Mueller Hinton pour les bactéries, milieu TGEA pour la levure.

Des disques de papier filtres chargés de 3µl de l'extrait naturel, de 6 millimètres de diamètre, sphériques ont été placés à la surface gélosé sèche, inoculée au préalable par une suspension microbienne pure. Des témoins sans extrait ont été réalisés :

- contrôle Mueller Hinton sans huile essentielle et Mueller Hinton avec DMSO sans extrait flavonoïdes pour les différentes souches de bactéries,
- un contrôle avec milieu TGEA sans huile essentielle et TGEA sans extrait flavonoïdes pour la levure *C. albicans*.

Les boîtes de pétri sont remplies à raison de 10 ml/ boîte (Veličkovič & al., 2003). Après incubation à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 à 20 heures, les diamètres des zones claires d'inhibition autour des disques ont été mesurés.

IV-5-3. Mesure spectrophotométrique de l'activité antimicrobienne

Le suivi de la croissance microbienne sous l'effet de différentes concentrations de l'extrait naturel par la méthode de macrodilution, surveillée par la mesure de la densité optique (Devienne et al., 2002; Mendoza et al., 2002; Atwal, 2003) a pour objectif de déterminer la concentration IC50, qui réduit le taux de la population microbienne de 50% par rapport à celle du contrôle. Ce test vient compléter les essais antimicrobiens réalisés par la méthode des disques.

Dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture liquide; Mueller Hinton pour les différentes souches de bactéries; Sabouraud pour la levure *C. albicans*, différentes concentrations ont été réalisées par ajout de 5, 10, 15, 20, 25 ml de l'extrait naturel. Notant que pour chaque souche, ce test a été réalisé par l'extrait montrant une zone d'inhibition supérieure à tous les autres extraits.

La croissance est déterminée après 20 heures d'incubation par lecture de la densité optique au spectrophotomètre (6405UV/Vis. Spectrophotometer) à 625nm. L'essai est répété trois fois. Le pourcentage de l'inhibition de la croissance cellulaire a été calculé par l'équation :

$$\text{Inhibition} = (\text{A control} - \text{A test}) / \text{A control} \times 100\%$$

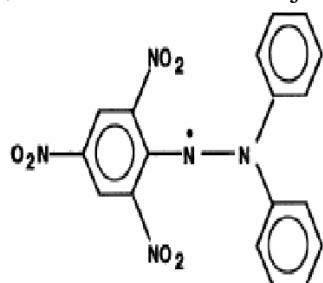
(Benabadji et al., 2004)

A control: est la densité optique à 625 nm du témoin sans extrait

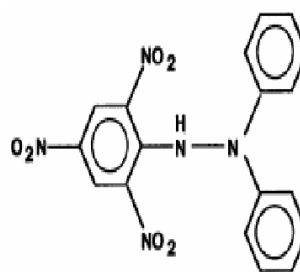
A test: la densité optique à 625 nm du test

V- Test antioxydant – Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode de Blois (Zhu et al., 2002), méthode au DPPH (Leitão et al., 2002; Chen et al., 2004), avec quelques modifications. Ce radical (fig. 20) libre stable possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle.



Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)



Diphenylpicrylhydrazyl (non radical)

Fig. 20: Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

V-1. Préparation de la solution DPPH

Le DPPH 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; Mr : 394.33), est solubilisé dans du méthanol absolu pour en avoir une solution de 0,3 mM.

V-2. Solution d'extrait

Pour le test les échantillons ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu. (Panichayupakaranant et Kaewsuwan, 2004).

Pour tous les extraits, que ce soit flavonoïdes ou huile essentielle, on prépare des solutions dans du méthanol absolu à raison de 1mg/ml. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de microgramme par ml (Tableau 13). D'autres concentrations ont été rajoutées pour les préparations huileuses.

Tableau 13: Concentrations testées dans le test antioxydant.

Les extraits	E.F. <i>Lanandula</i>	E.F. <i>Cistus</i>	E.F. <i>Crataegus</i>	E.F. <i>Smurnium</i>	H.E. <i>Lanandula</i>	H.E. <i>Cistus</i>	H.E. <i>Smurnium</i>
Concentrations µg / ml	4	5	0.8	1	2	2	2
	5	7	3	3	10	10	10
	7	10	5	5	20	20	20
	10	13	10	7	100	300	100
	15	15	30	10	300	500	300
	30	20	50	15	400	1 000	500
	50	30	100	30	500	3 000	600
	100	50		40	600	5 000	700
	150	100		50	1 000		1 000
				60	3 000		3 000
					5 000		5 000
					7 000		7 000
					9 000		9 000
					11 000		11 000
					13 000		13 000

EF : Extrait Flavonoïdique

HE : Huile Essentielle

V-3. L'essai au DPPH

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 2,5 ml de la solution à tester, on ajoute 1ml de solution au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à la température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 518 nm par un spectrophotomètre. Pour chaque dilution, on prépare un blanc, constitué de 2.5 de la solution testé additionné de 1ml de méthanol.

Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution methanolique au DPPH (0,3 mM) et de 2.5 ml de méthanol.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique et le Trolox (6Hydroxy-2, 5, 7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylic acid "C₁₄H₁₈O₄") dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que l'échantillon test.

V-4. Expression des résultats

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50%, aussi bien que la puissance antiradicalaire (ARP égal à 1/ EC₅₀) (Heilerová et al., 2003), les résultats sont exprimés en activité antioxydante.

L'activité antioxydante, qui exprime les capacités de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. L'activité antioxydante "AA%" est donnée par la formule suivante :

$$AA \% = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{test} - Abs_{Blanc}) \times 100}{Abs_{control}} \right\}. \text{ (Leitão et al., 2002)}$$

Ou encore :

$$Inhibition \% = \frac{(Abs_{control} - Abs_{test})}{Abs_{control}} \times 100 \quad \text{(Wang et al., 2002)}$$

Soit :

AA : Activité Antioxydante

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 518 nm.

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type. La valeur EC₅₀ (autrement appelée la valeur IC 50) a été déterminée pour chaque extrait, est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constitué de méthanol et DPPH. Les valeurs EC₅₀ moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage (Mensor et al., 2001).

En parallèle, pour le suivi de cinétique de la réaction de réduction ; 3.9 ml de solution de DPPH (0.3 mM) est introduite dans la cuvette de spectrophotomètre, l'absorbance est mesuré à 518 nm (Abs_{t0}), ensuite 100µl de la solution mère de l'extrait est ajoutée, l'absorbance est mesuré immédiatement après agitation (Abs_{t1}) avec un intervalle de temps de 1 min entre Abs_{t0} et Abs_{t1}, puis d'autres mesures ont été effectuées.

VI- Etude statistique

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel statistique GraphPad InStat. Toutes les expériences ont été faites en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type (n=3) pour chaque cas. Les différences ont été considérées significatives à P < 0,05.

Résultats

et

Discussion

I- Résultats de l'étude phytochimique

1- Le taux d'humidité :

Les végétaux sont riches en eau, les analyses de nos échantillons ont révélé un taux d'humidité important compris entre 52% et 82%. Ce la signifie approximativement la moitié ou plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée par l'eau. Nous constatons suivant la **figure 21** ; que *Smyrnum olusatrum* est très riche en eau avec un taux d'environ 82%, aubépine présente- elle aussi une proportion considérable ; les 2/3 de la plante est formé par de l'eau, par contre la Lavande et le Ciste ; l'organisme végétal comprend en poids approximativement des proportions équivalentes de matière sèche et d'eau.

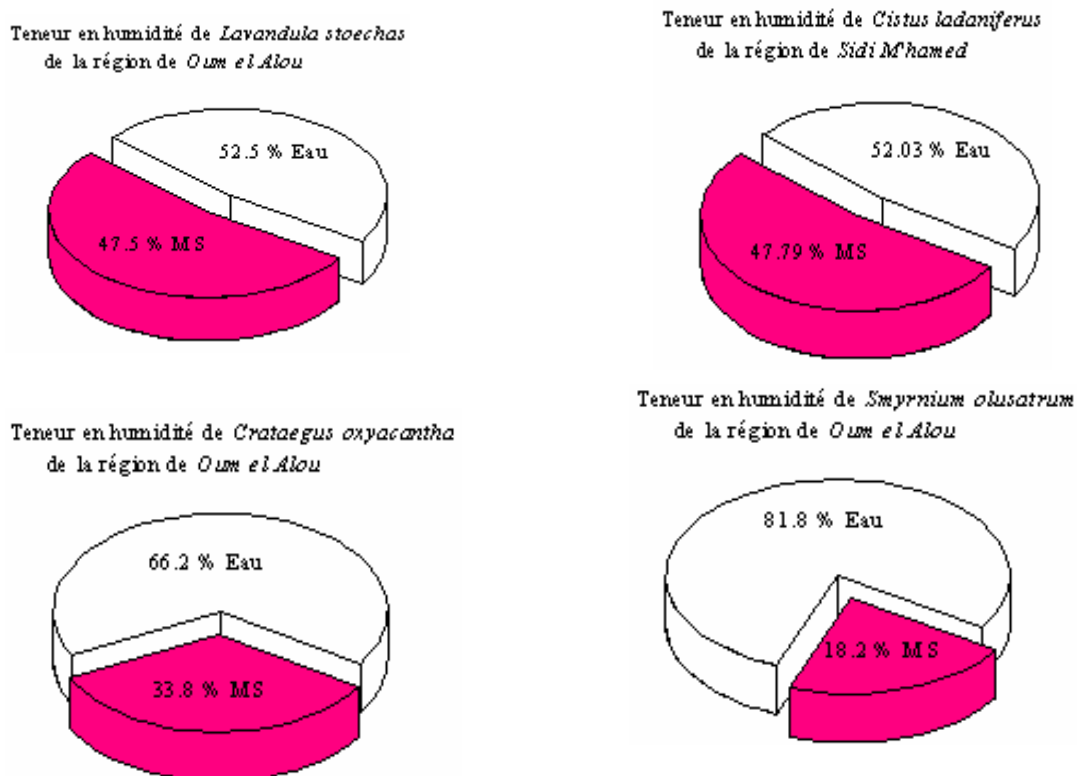


Fig. 21: Teneur en humidité des quatre plantes médicinales.

2- Le rendement en huile essentielle :

Les huiles essentielles ont été extraites des matériaux végétaux secs, le rendement en huile essentielle varie beaucoup avec la plante utilisé , le matériel employé pour l'extraction et la méthode d'extraction, aussi bien l'origine de la plante.

Comme noté dans la partie bibliographique, Aubépine ne renferme que des traces d'huiles, vue le matériel utilisé, nous n'avons pu récupérer qu'une infime quantité huileuse, c'est ainsi que le rendement tend vers zéro.

Pour les autres plantes, le rendement était largement variable, lisiblement montré dans la **figure 22** où *Lavandula stoechas* de la région de *Oum el Alou* présente le rendement le plus élevé (2%) non seulement en comparaison avec les autres plantes de genre différent mais aussi avec la même espèce de l'autre région ; celle de *Ain fezza*. Cette dernière a présenté un taux inférieur à 1%, ce qui confirme que la région d'origine influence beaucoup la sécrétion en l'huile d'une plante aromatique.

L. stoechas provenant de la région de *Ouchba* et *Zarifet* ont comme teneurs en huiles essentielles: 0.94% et 0.70% respectivement (**Sidi Boulenouar et Ziane, 2003**).

En revanche, *Cistus ladaniferus* et *Smyrniolum olusatrum* ont présenté respectivement un rendement faible de 0.1% et très faible de 0.04% sachant que l'huile de *S. olusatrum* a été extraite au moyen du procédé de l'entraînement par la vapeur d'eau, alors que les autres par hydrodistillation.

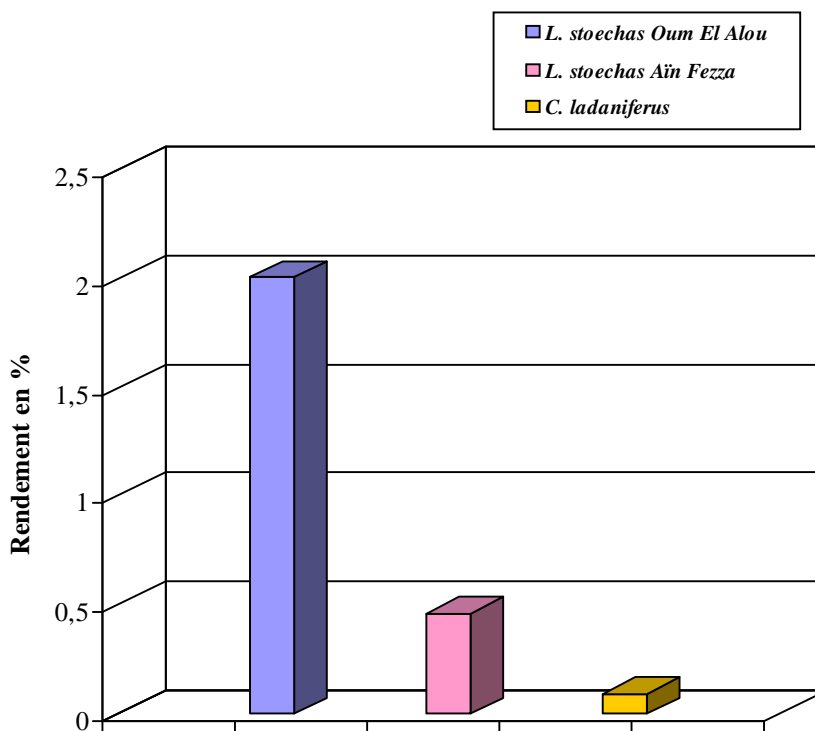


Fig. 22: Rendement en huile essentielle obtenue par hydrodistillation.

Kaïd Slimane (2004) a obtenu une teneur en huile essentielle de *C. ladaniferus* de 0.36% pour la station de *Hafir* et 0.13% pour la station de *Zarifet*, notant que l'huile a été extraite par entraînement à la vapeur.

3- Densité de l'huile essentielle :

Les mesures de densité effectuée à 20°C des plantes appartiennent à un intervalle étroit, entre 0.75 et 0.89 (**fig. 23**).

Les valeurs d_{20}^{20} des huiles essentielles à 20°C pour les plantes : *Lavandula stoechas* de la région de *Oum el Alou*, *lavandula stoechas* de la région de *Aïn fezza*, *Cistus ladaniferus* de *Sidi M'hamed* et *Smyrniolum olusatrum* de *Oum el Alou* sont respectivement : (0.813 ± 0.1080) , (0.855 ± 0.1443) , (0.757 ± 0.1051) et (0.889 ± 0.04250) .

Nos huiles essentielles de *L. stoechas* de la région de *Oum el Alou* et *Aïn fezza* ont des densités presque semblables, un peu basse aux densités des huiles de la même plante poussant dans la région de *Ouchba* (0.9464) et *Zarifet* (0.9453) (**Sidi Boulenouar et Ziane, 2003**).

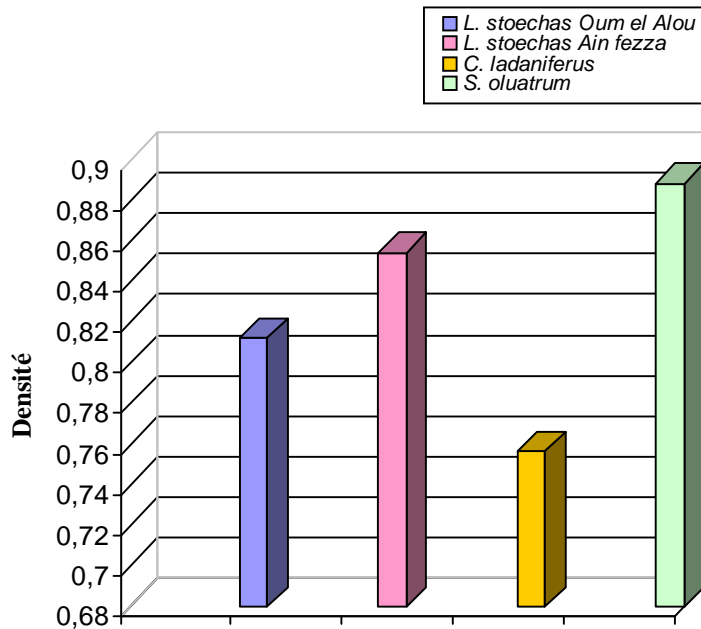


Fig. 23: Densité des huiles essentielles.

4- Extraction des flavonoïdes : rendement en extrait sec

Les extraits méthanoliques récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme les flavonoïdes et les composés phénoliques. Le rendement a été déterminé par rapport à 100g de matériel végétal sec ; rendu en poudre ; subissant une extraction douce à la température ambiante durant 24 heures. Les résultats ont été exprimés en pourcentage (p/p).

Selon la figure ci-dessus (fig. 24), les quatre plantes ont données des masses en extraits sec méthanoliques inférieurs à 5g/100g de plante en poudre. Du point de vue rentabilité en poids, Aubépine, suivi par le Ciste ont donné les proportions les plus élevées ; (4.553 % \pm 0.05774) pour la première et (3.613 % \pm 0.2973) pour la deuxième. La lavande a donné un taux moyen de (2.398 % \pm 0.3300), par contre le Maceron est la plante, qui possède le rendement le plus faible au alentour de 1%, le rendement moyen obtenu a été de (1.082 % \pm 0.2973).

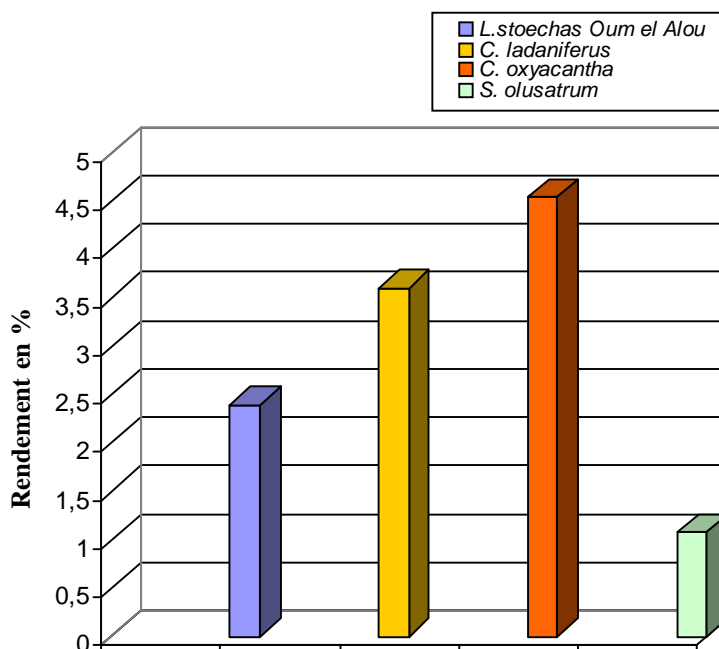


Fig. 24: Rendement en extrait sec.

Car la macération est une méthode discontinue, le dissolvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée (Yrjönen, 2004), il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes et les capacités antioxydantes (Lee et al., 2003).

5- Composition chimique des huiles essentielles : analyse par CPG et RMN-¹³C

Les analyses de la composition chimiques des huiles essentielles de la lavande et le Maceron ont été effectués au laboratoire de chimie et biomasse, université de Corse France. Deux colonnes ont été utilisées : polaire et apolaire pour la chromatographie en phase gazeuse, le carbone ¹³C pour la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire.

Onze (11) composés ont été identifiés dans les huiles essentielles de la feuille de *Lavandula stoechas* de la région de *Oum el Alou*, de même pour les huiles récoltées de l'ensemble feuilles et grains de la même plante ainsi que *Smyrniium olusatrum* de la même région et 10 composés identifiés dans l'huile essentielle des feuilles et grains de la Lavande de *Aïn fezza* (tableau 14 et 15).

Tableau 14 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* De deux régions différentes

<i>Les composés de l'huile essentielle</i>	RI	<i>Oum el Alou</i> (Feuille)	<i>Oum el alou</i> (Feuilles + grains)	<i>Aïn fezza</i> (Feuilles +grains)
α-pinène	931	0.5	0.4	0.6
camphène	942	1.3	2.0	1.0
delta-3-carene	1005	0.9	0.5	-
NI	1008	0.5	0.5	0.6
p-cymene	1011	0.8	0.9	1.0
cineole	1021	18.9	22.8	24.2
Fenchone	1069	27.6	31.1	24.6
Fenchol	1098	0.7	0.7	0.7
Camphre	1122	18.1	22.5	17.7
NI	1128	0.4	0.4	0.9
NI	1138	0.8	0.3	0.3
Borneol	1148	0.6	0.7	0.5
NI	1154	2.1	1.7	2.2
NI	1158	1.4	0.9	1.4
NI	1180	1.1	0.7	1.6
Bornyl acetate	1269	3.2	3.7	3.0
NI	1274	-	-	1.4
NI	1304	0.8	0.5	2.0
NI	1357	0.8	-	-
NI	1582	1.9	1.2	1.9
Viridiflorol	1593	1.1	0.7	1.2
NI	1826	1.8	0.4	1.0

Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Smyrniium olusatrum* de la région de *Oum el Alou*

<i>Composé</i>	Ira	Irp	% ^a
α-pinène	930		1.5
β-pinène	970	1113	6.3
myrcène	980	1163	2.0
Δ3-carène	1005	1150	1.9
limonène	1020	1203	0.6*
β-phellandrène	1020	1212	0.5*
trans-caryophyllène	1419	1596	6.3
Furanodiène +	1489	1871	46.0
Furanoélémente			
oxyde de caryophyllène	1571	1988	1.3
furanoeremophillone	1852	2643	12.2
Total :			78.5

Ira : indice de rétention pour la colonne apolaire

Irp : indice de rétention pour la colonne polaire

%^a : pourcentage par rapport à la colonne apolaire

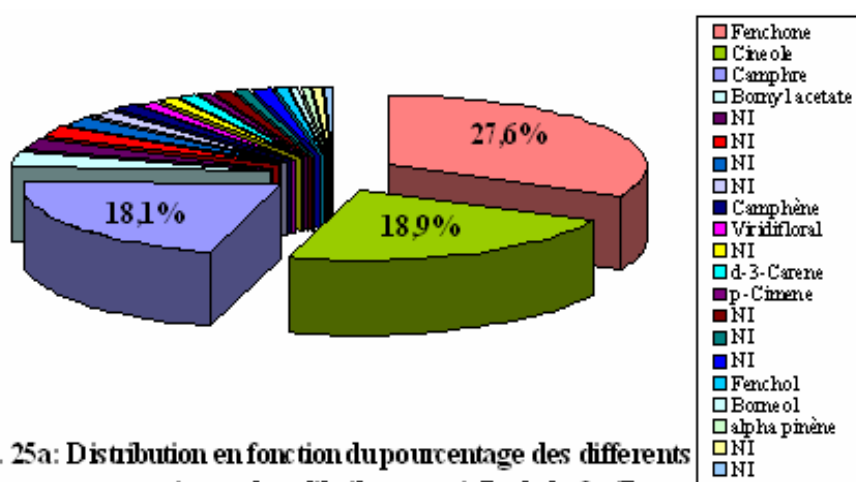


Fig. 25a: Distribution en fonction du pourcentage des différents composants existant dans l'huile essentielle de la feuille de *Lavandula stoechas* de *Oum el Alou*.

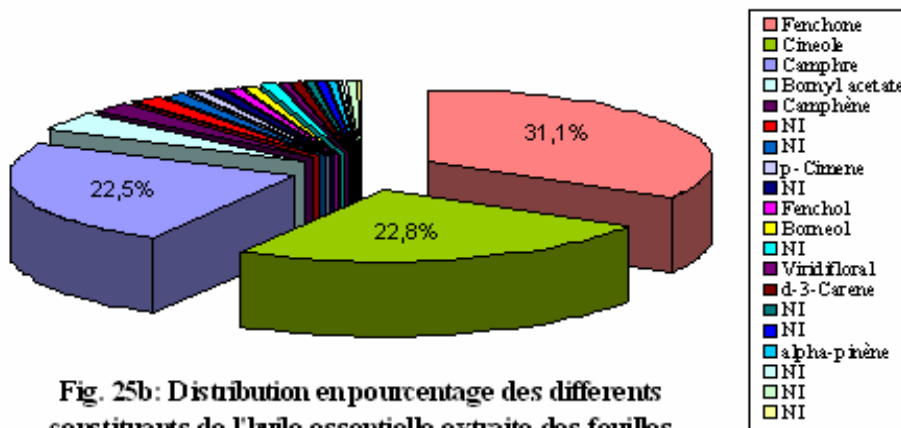


Fig. 25b: Distribution en pourcentage des différents constituants de l'huile essentielle extraite des feuilles et graines de *Lavandula stoechas* de *Oum el Alou*.

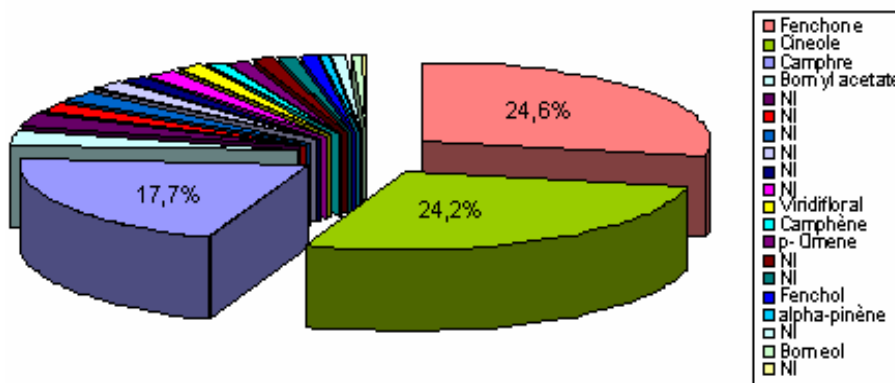


Fig. 26: Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* de *Aïn fezza* (feuilles et graines)

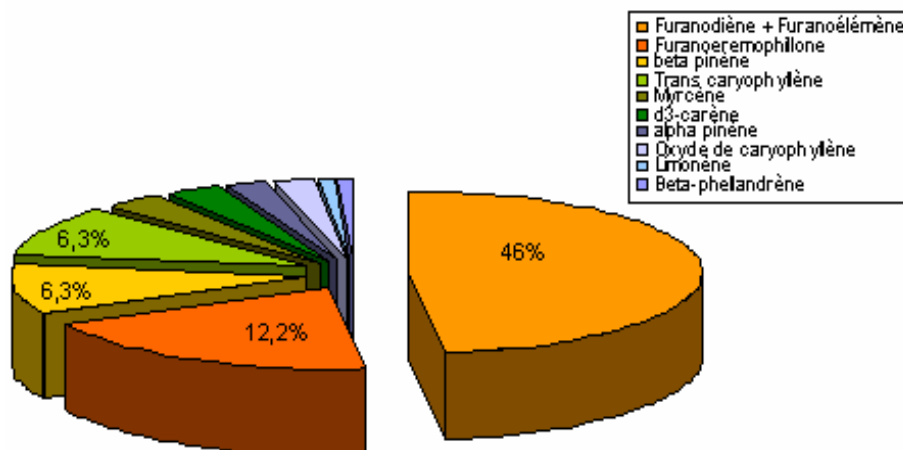


Fig. 27: Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle de *Smyrniium olusatrum* de *Oum el Alou* (partie aérienne)

Les figures : 25a et 25b, 26 et 27; donne une distribution des différents composés identifiés et non identifiés contenus dans les huiles essentielles, suivant les proportions nous pouvons distinguer le(s) composé(s) majoritaire(s), qui représente(nt) le principe actif et donc nous pouvons déterminer le chimiotype de chaque plante.

Comme, constaté dans les trois premières figures ci-dessus, trois composés majoritaires sont présents dans les huiles essentielles de la lavande quelque soit la région et la (es) partie (s) des organes végétaux dont provient l'huile volatile (fenchone, cinéole, camphre).

Le chimiotype ou race chimique de chaque huile essentielle sera donc :

- Chemotype fenchone/cinéole/camphre pour l'huile essentielle de *L. stoechas* de *Oum el Alou*, avec une prépondérance du premier composé (fenchone>cinéole=camphre).
- *L. stoechas* de *Aïn fezza* est de même chemotype que *L. stoechas* de *Oum el Alou* fenchone/cinéole/camphre, avec prédominance des deux premiers composés (fenchone= cinéole>camphre).
- L'huile essentielle issue de *S. olusatrum* est de chemotype Furanodiène/
Furanoélémente

On constate que l'huile essentielle des Lavandes est très riche en monoterpènes et qui représente aussi les composés majoritaires de l'huile. Comme composés minoritaires rencontrés dans l'huile de Lavande des deux régions, citons à titre d'exemple : Bornyl acétate, viridiflorol, α -pinène,...etc.

L'espèce *L. stoechas* est une plante médicinale active, sa composition chimique est tout à fait différente des autres Lavandes. Dans la même espèce, le contenu biochimique de l'huile essentielle trouvé dans les fleurs, la tige ou feuilles différent de manière significative selon où et dans quelles conditions la plante a fait sa croissance. La présence et la concentration de certains constituants chimiques fluctuent également selon la saison et la maturation de la plante (**Chu et kemper, 2001**). C'est ainsi que si même *L. stoechas* de l'Espagne présente le même chemotype que *L. stoechas* de *Oum el Alou* et *Aïn fezza* mais les proportions sont différentes. **Garcia Vallejo et al. (1989)** ont identifié dans l'huile essentielle de la plante entière les principes actifs : fenchone (42.1%) > camphre (23%) > 1,8 Cinéole (9.4%).

Celle provenant de Corse est de chemotype fenchone/camphre avec une très grande variabilité dans les proportions de la fenchone, camphre et 1,8 cinéole. Effectivement l'analyse de la composition de l'huile essentielle de cinq échantillons de *L. stoechas* *L. ssp. stoechas* menée par **Ristorcelli et al. (1998)** à révélé que cette plante d'origine Corse est caractérisé par l'abondance de trois composés avec une très large variation : fenchone (14.9-75.5%), camphre (2.5-56.2%) et 1,8 cinéole (0-17.8%).

L. stoechas ssp stoechas de la Turquie est dominé par la pulegone avec 40.37%, en plus le menthol et le menthone qui sont présent en proportion notable dont respectivement 18.09% et 12.57% (**Gören et al., 2002**). Alors que l'huile essentielle de celle de la Grèce est dominée par la fenchone (30.85%) et en un autre composé en proportion notable : acétate de pinocarvyl (**Kokkalou et al., 1988**).

Skoula et al. (1996) ont analysé aussi des huiles essentielles de quatre populations de *L. stoechas* *L. ssp. stoechas* de la Grèce, trois populations été de chimiotype fenchone/camphre et une de chimiotype 1,8 cinéole/fenchone.

A l'inverse de l'huile de Lavande, l'huile essentielle de *S. olusatrum* est dominée par les sesquiterpènes, essentiellement les furanosesquiterpènes ; Furanodiène et Furanolémane qui représentent le principe actif de cette huile avec un pourcentage de 46%, avec en plus un autre furanosesquiterpène : le furanoeremophilone dont la teneur est considérable de 12.2%. En revanche, les monoterpènes identifiés sont minoritaires dont certains sont sous forme de traces.

Notre huile essentielle de *S. olusatrum* est très riche en sesquiterpène et de chimiotype différent de celle de l'Angleterre. L'huile essentielle de l'herbe provenant de ce pays (Mölleken et al., 1998) renferme 44.74% sesquiterpène et 42.18% monoterpène en total, avec l'abondance de quatre composés en premier, il s'agit d'un monoterpène : β -phellandrène (24.92%), Isofuranogermacrène (18.87), Furanodiène (19.38%) et le Furaneremophil-1-one (9.52%). Dans l'huile essentielle de notre plante, ce monoterpène (β -phellandrène) n'existe que sous forme de trace.

6- Teneur en polyphénols et flavonoïdes

L'étude quantitative des extraits bruts méthanoliques au moyen des dosages spectrophotométriques, avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols et les flavonoïdes. Deux courbes d'étalonnage (fig. 28a et 28b): ont été tracées pour cette objectif, une réalisée avec un extrait de catéchol à différentes concentration, l'autre avec un extrait de résorcinol. Des mesures de densité pour chaque extrait se sont réalisées à 660 nm pour les polyphénols et à 367nm pour les flavonoïdes.

Les quantités des polyphénols et flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent gramme de l'étalon utilisé et déterminés par les deux équations de type :

$$y = a x + b.$$

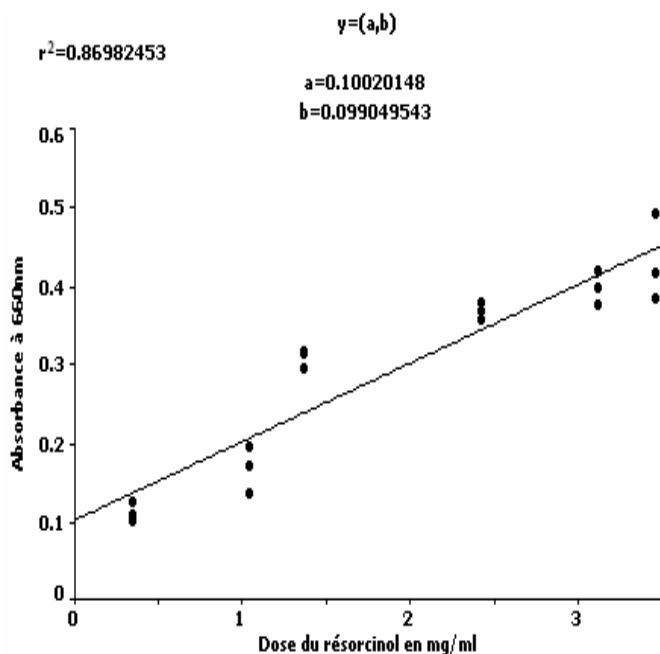


Fig. 28a : Courbe d'étalonnage des polyphénols

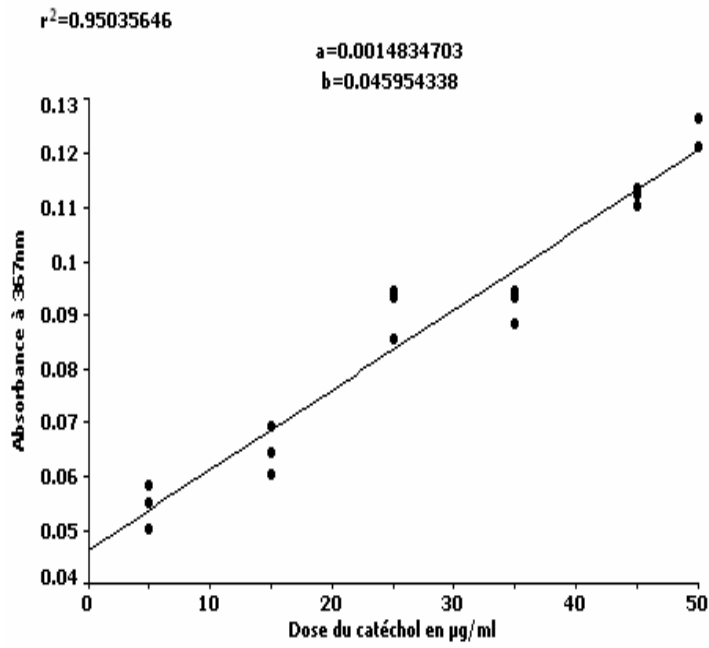


Fig. 28b : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

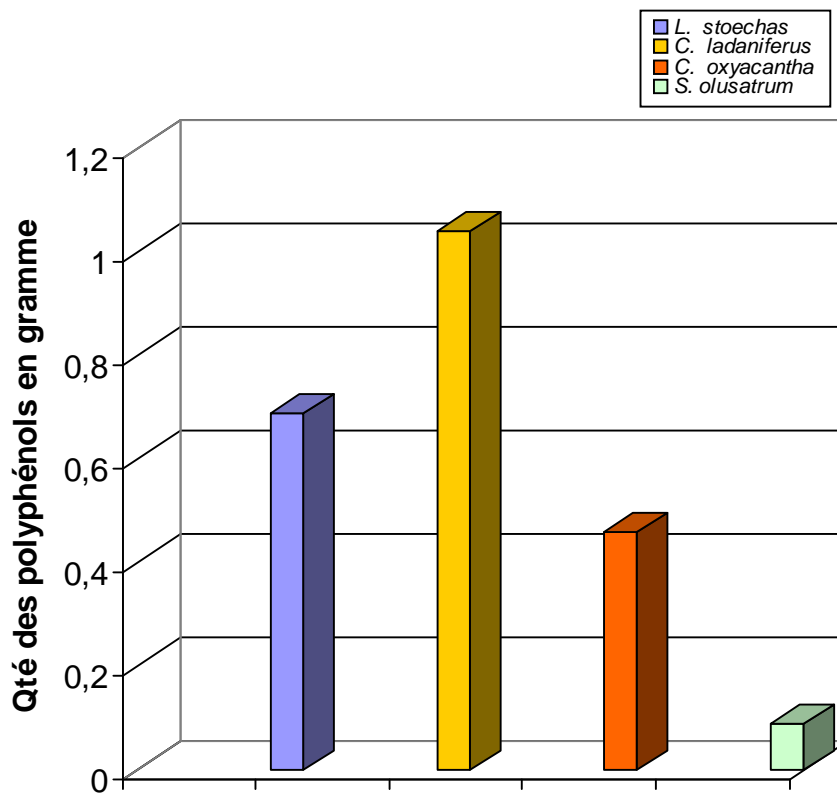


Fig. 29: Teneur en polyphénols totaux (g/100g de poids sèche de la plante).

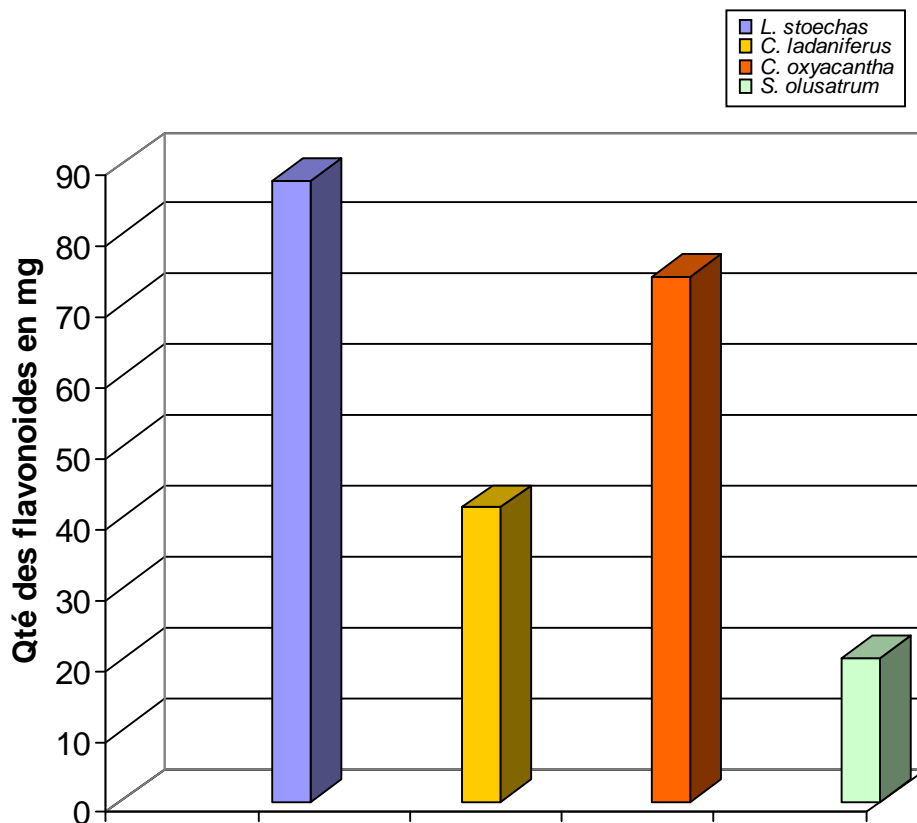


Fig. 30: Teneur en flavonoïdes en mg/100g de plante sèche en poudre.

Suivant les **figures ci dessus**, les teneurs en polyphénols enregistrés, montre des proportions allant de 0,1 à 1%. On a enregistré en équivalent résorcinol : 0.69g ; 1.04g ; 0.46g ; 0.09g par 100g de matériel végétal en poudre, respectivement avec les extraits : de la Lavande ; Ciste ; Aubépine et le Maceron.

Concernant la teneur en flavonoïdes, les résultats exprimés en équivalent catéchol en mg/100g sont : environ 88mg : Lavande ; 42mg : Ciste ; 74mg : Aubépine ; 20mg : Maceron. Le Ciste représente la teneur la plus élevée en polyphénols, alors qu'en contenu flavonoïdique, la Lavande ainsi qu'Aubépine ont les teneurs les plus importantes. Les teneurs les plus basses ont été obtenues avec le Maceron.

7- Résultat de la chromatographie sur couche mince des extraits brut méthanoliques

Le développement de la méthode pour la chromatographie sur couche mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie, dimension de la chambre de développement et de l'espace vapeur ont un effet prononcé sur la séparation (**Yrjönen, 2004**).

Trois systèmes de solvant ont été utilisés, les chromatogrammes résultants comportent une série de spots (**fig. 30**), l'identification des composés était basée sur la comparaison des Rf et couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur CCM avec ceux des étalons notés dans les mêmes conditions expérimentales. Suite au nombre réduit des étalons disponibles, pour certains, on s'est arrêté à l'identification de la classe phénolique.

Les classes des flavonoïdes varient dans le type et les quantités dues aux variations de la croissance des plantes, des conditions environnementales et de la maturité. **Le tableau 16, 17 et 18** comporte les Rf des différents spots apparus avec les différents systèmes solvants utilisés, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV. Un ensemble de spots a été obtenu par les différents systèmes solvants pour les quatre extraits bruts (**fig. 31**), avec plus de composés pour *Lavandula* et *Crataegus*.

1. Composés identifiés chez *L. stoechas*

Vingt deux composés ont été séparés par les essais réalisés par le mélange solvant n-butanol, acide acétique et eau distillée, cinq composés par l'éluant acétone/eau distillée et douze composés avec le mélange des trois solvants chloroforme, méthanol et eau distillée. Différentes classes et composés polyphénoliques ont été séparés mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des flavonols, les anthocyanidine 3-glycosides et les phénols simples.

Le premier système solvant sépare essentiellement les flavonols alors que les acides phénols sont bien séparés par les solvants : chloroforme/méthanol/eau tandis que l'acétone/eau a séparé essentiellement les composés appartenant à la classe des anthocyanidine 3- glycosides.

2. Composés identifiés chez *Crataegus oxyacantha*

Vingt et un spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait brut par le BAW appartenant aux différentes classes polyphénolique, avec probablement une abondance des anthocyanidine 3-glycosides. De même pour les autres solvants, ont essentiellement séparé cette précédente classe polyphénolique, notant que peu de composé ont été entraîné par l'acétone/eau alors que c'est apparemment un bon éluant pour la ségrégation des anthocyanidines. Les spots des acides phénols et flavones sont surtout apparues avec l'application du chloroforme / méthanol / eau comme phase mobile.

3. Composés identifiés chez *Cistus ladaniferus*

Dix taches révélées avec le BAW, trois avec (acétone / eau) et onze taches avec (chloroforme / méthanol / eau). Les composés font partie des flavones, flavonols, des acides phénols et des anthocyanidines 3-glycosides.

4. Composés identifiés chez *Smyrniolum olusatrum*

Treize spots réparés par le BAW et douze par le système acétone / eau. Les composés qu'on peut rencontrer chez *S. olusatrum* sont dans le quasi totalité des acides phénols séparés essentiellement par le premier solvant et des anthocyanidine 3,5-diglycosides séparés seulement par le deuxième solvant et les flavones, ainsi on rencontre des flavonols et des anthocyanidine 3-glycosides.

En comparant des Rf ainsi que la coloration observé sous UV des spots avec ceux des étalons appliqués dans les mêmes conditions expérimentales, on a pu identifier la rutine dans l'extrait brut de *L. stoechas* et *S. olusatrum*, l'hydroquinone dans l'extrait de *C. oxyacantha*, le catéchol dans l'extrait de *C. ladaniferus* et l'acide ferulique dans l'extrait brut de *L. stoechas*.

Tableau 16: Les classes des composés phénoliques identifiés dans les extraits flavoniques.

Système solvant : BAW (4 :1 :5)

Adsorbant : gel de silice

Extrait	Couleur sous UV 365nm	Rf (cm)	Type flavonoïde possible (Markham, 1982)	Composé probable
<i>L. stoechas</i>	Jaune	0,32	flavonols	
	bleu pale	0,37	acide phénol	
	Jaune	0,43	flavonols	
	Mauve	0,49	anthocyanidine 3-glycosides	
	Bleu	0,50	acide phénol	
	Gris	0,50		
	Jaune	0,51	flavonols	
	Jaune	0,53	flavonols	
	Jaune grisâtre	0,56		rutine
	Bleu	0,58	acide phénol	
	Jaune pale	0,63	flavonols	
	Violet	0,60	flavones	
	Jaune	0,64	flavonols	
	bleu blanc fluorescent	0,65	flavonols, flavones, isoflavones, flavanones	
	Jaune	0,66	flavonols	
	Violet	0,67	flavones	
	bleu vif	0,71	acide phénol	
	Jaune pale	0,73	flavonols	
	bleu blanc fluorescent	0,77	flavonols, flavones, isoflavones, flavanones	
	pourpre sombre	0,79	flavonols, flavones, chalcones, isoflavones, flavanones	
bleu blanc fluorescent	0,80	flavonols, flavones, isoflavones, flavanones		
Rouge	0,86	anthocyanidine 3-glycosides		
<i>C. oxyacantha</i>	mauve	0,36	anthocyanidine 3-glycosides	
	pourpre sombre	0,38	flavonols, flavones, chalcones, isoflavones, flavanones	
	jaune	0,42	flavonols	
	pourpre sombre	0,43	flavonols, flavones, isoflavone, flavanones, chalcones	
	jaune	0,48	flavonols	
	jaune	0,51	flavonols	
	orange pale	0,53	anthocyanidine 3-glycosides	
	bleu blanc fluorescent	0,56	flavonols, flavones, isoflavones, flavanones	
	rouge grisatre	0,58		
	bleu blanc fluorescent	0,59	flavonols, flavones, isoflavones, flavanones	
	mauve	0,59	anthocyanidine 3-glycosides	
	gris	0,63		
	orange	0,66	anthocyanidine 3-glycosides	
	mauve	0,67	anthocyanidine 3-glycosides	
	rouge	0,72	anthocyanidine 3-glycosides	
	gris sombre	0,74		
	Bleu sombre	0,79		hydroquinone

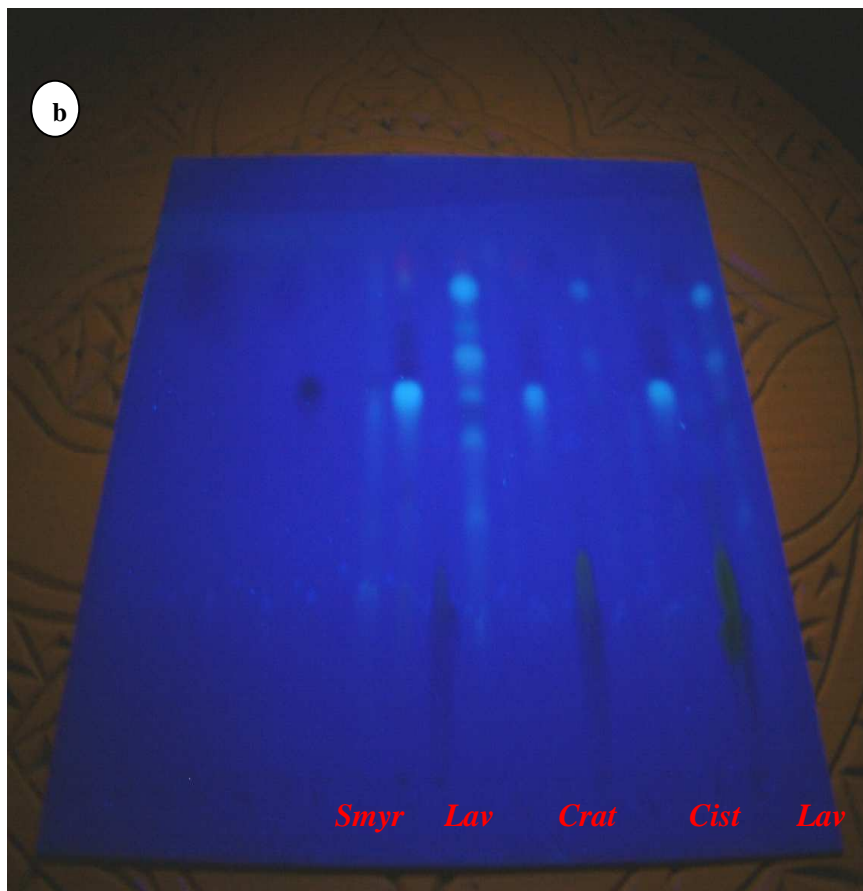
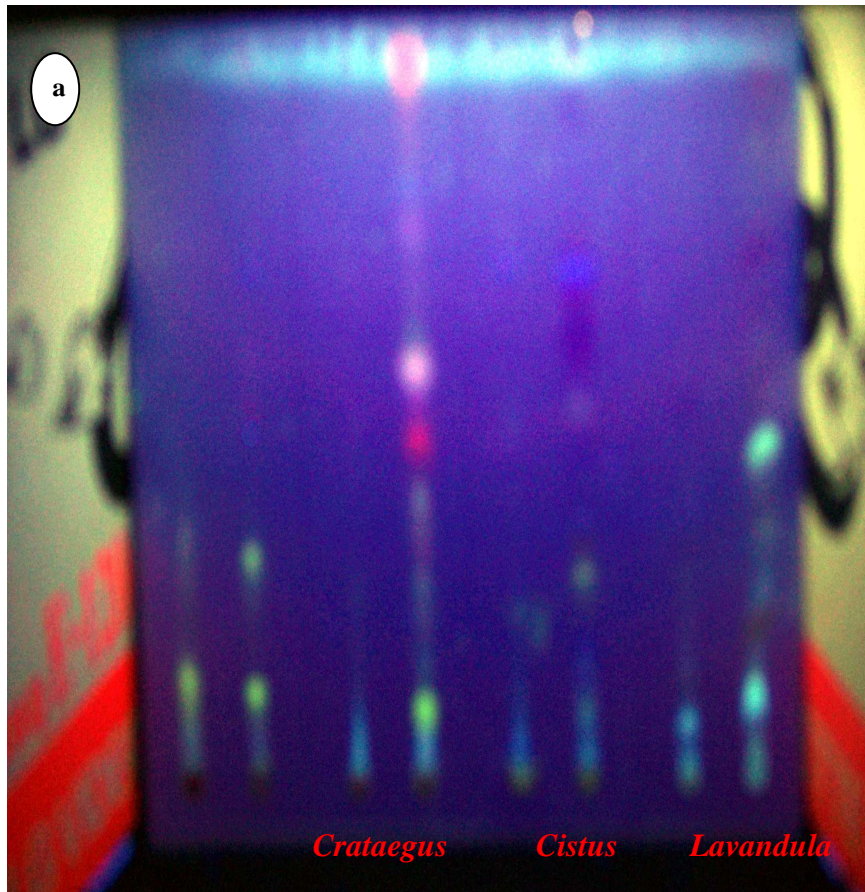
	mauve	0,82	anthocyanidine 3-glycosides	
	rose	0,85	anthocyanidine 3,5-diglycosides	
	rouge	0,86	anthocyanidine 3-glycosides	
	rouge	0,92	anthocyanidine 3-glycosides	
<i>C. ladaniferus</i>	jaune	0,21	flavonols	
	jaune	0,25	flavonols	
	violet	0,45	flavones	
	bleu vif	0,47	acide phénol	
	violet	0,50	flavones	
	violet	0,56	flavones	
	bleu	0,64	acide phénol	
	Bleu sombre	0,81		catéchol
	gris	0,82		
	rose	0,84	anthocyanidine 3,5-diglycosides	
<i>S. olusatrum</i>	jaune	0,33	flavonols	
	bleu	0,34	acide phénol	
	bleu vif	0,47	acide phénol	
	bleu	0,49	acide phénol	
	bleu vif	0,50	acide phénol	
	jaune	0,52	flavonols	
	violet	0,54	flavones	
	Jaune grisâtre	0,56		rutine
	pourpre sombre	0,64	flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, chalcones	
	pourpre sombre	0,69	flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, chalcones	
	mauve	0,75	anthocyanidine 3-glycosides	
	mauve	0,80	anthocyanidine 3-glycosides	
	bleu	0,84	acide phénol	

**Tableau 17: Résultat de la chromatographie sur couche mince
des extraits bruts flavoniques
Système solvant : Acétone / Eau (1:1)
Adsorbant : gel de silice**

Extrait	Couleur sous UV 365nm	Rf (cm)	Type flavonoïde possible (Markham, 1982)	Composé probable
<i>L. stoechas</i>	rouge	0,40	anthocyanidine 3-glycosides	
	rouge vif	0,44	anthocyanidine 3-glycosides	
	rouge vif	0,54	anthocyanidine 3-glycosides	
	bleu	0,86	acide phénol	acide ferulique
	jaune pale	0,91	flavonols	
<i>C. oxyacantha</i>	rouge	0,40	anthocyanidine 3-glycosides	
	rouge vif	0,43	anthocyanidine 3-glycosides	
	rouge	0,49	anthocyanidine 3-glycosides	
	rouge vif	0,53	anthocyanidine 3-glycosides	
	jaune	0,86	flavonols	
	mauve	0,91	anthocyanidine 3-glycosides	
<i>C. ladaniferus</i>	rouge	0,41	anthocyanidine 3-glycosides	
	bleu	0,82	acide phénol	
	mauve	0,90	anthocyanidine 3-glycosides	
<i>S. olusatrum</i>	bleu	0,36	acide phénol	
	rose	0,40	anthocyanidine 3,5- diglycosides	
	rouge vif	0,43	anthocyanidine 3-glycosides	
	violet	0,46	flavones	
	violet	0,49	flavones	
	rose	0,53	anthocyanidine 3,5- diglycosides	
	violet	0,59	flavones	
	bleu jaunâtre	0,77		
	jaune	0,84	flavonols	
	gris	0,90		
	rose pale	0,94	anthocyanidine 3,5- diglycosides	
	bleu	0,98	acide phénol	

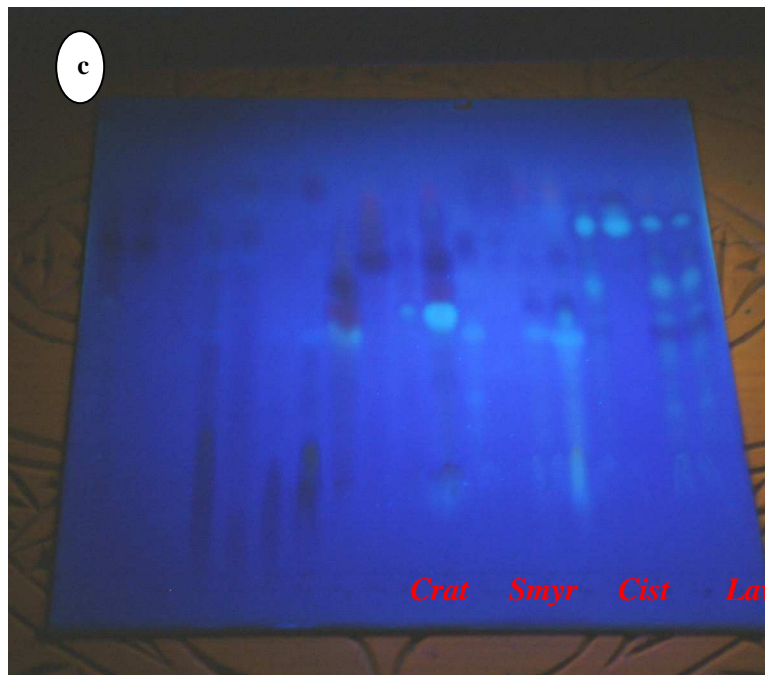
**Tableau 18: Les composés phénoliques identifiés dans l'extrait brut
de *Lavandula*, *Cistus* et *Crataegus*
Système solvant : Chloroforme/Méthanol/Eau
(90 :10 :5)**

Extrait	Couleur sous UV 366nm	Rf (cm)	Type de phénol/ flavonoïde possible (Markham, 1982)
<i>L. stoechas</i>	Vert	0,04	flavonols, flavanones, aurones
	Bleu	0,05	acide phénol
	Gris sombre	0,07	
	Bleu vif	0,08	acide phénol
	Mauve	0,11	anthocyanidine 3-glycosides
	Bleu	0,14	acide phénol
	Gris	0,21	
	Bleu	0,24	acide phénol
	Violet	0,39	flavones
	Jaune	0,43	flavonols
	Mauve	0,77	anthocyanidine 3-glycosides
	Rouge	0,91	anthocyanidine 3-glycosides
<i>C. ladaniferus</i>	bleu	0,06	acide phénol
	bleu	0,06	acide phénol
	bleu	0,08	acide phénol
	jaune	0,10	flavonols
	mauve	0,13	anthocyanidine 3-glycosides
	violet	0,15	flavones
	jaune	0,27	flavonols
	gris sombre	0,31	
	rouge	0,49	anthocyanidine 3-glycosides
	bleu	0,65	Acide phénol
	violet	0,93	flavones
<i>C. oxyacantha</i>	bleu	0,02	acide phénol
	bleu	0,05	acide phénol
	jaune	0,09	flavonols
	violet	0,11	flavones
	jaune	0,14	flavonols
	mauve	0,17	anthocyanidine 3-glycosides
	violet	0,22	flavones
	mauve	0,27	anthocyanidine 3-glycosides
	rouge	0,32	anthocyanidine 3-glycosides
	violet	0,38	flavones
	rouge	0,45	anthocyanidine 3-glycosides
	rouge	0,48	anthocyanidine 3-glycosides
	violet	0,55	flavones
	rouge	0,93	anthocyanidine 3-glycosides

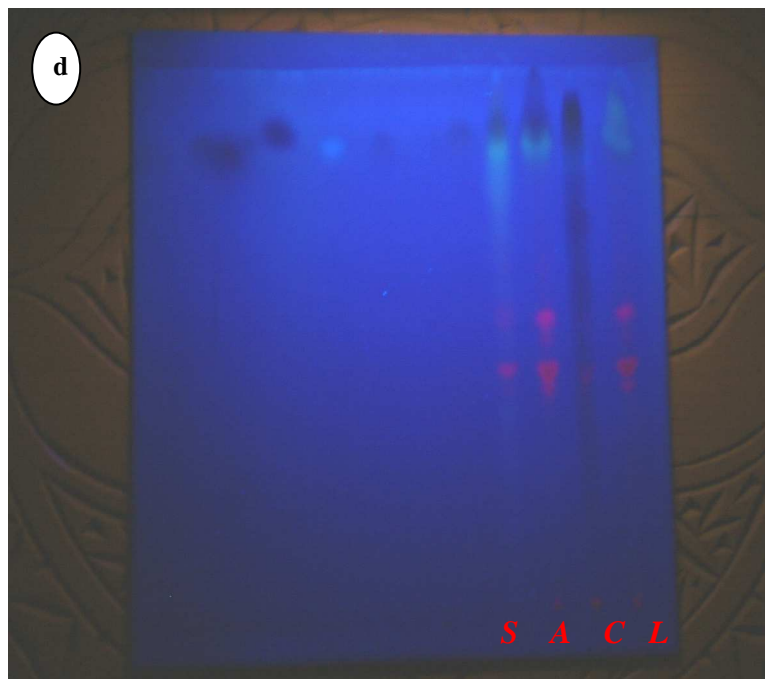


Smyr : *S. olusatrum*
Lav : *L. stoechas*

Cist: *C. ladaniferus*
Crat: *C. oxyacantha*



Smyr : *S. olusatrum*
Lav : *L. stoechas*
Cist : *C. ladaniferus*
Crat : *C. oxyacantha*



S : *S. olusatrum*
L : *L. stoechas*
C : *C. ladaniferus*
A : *C. oxyacantha*

Fig. 31: Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits bruts par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV).

a : chromatogramme photographié sous lampe UV à 366nm ,montrant des taches de couleurs différentes, qui se sont séparées après développement de la plaque par le biais du système solvant : CH₃Cl / Me OH / H₂O (90:10:5)

b et c : deux chromatogrammes résultant de la migration des dépôts des différents extraits bruts par le même système solvant : BAW (4:1:5), $\lambda = 365\text{nm}$

d : le chromatogramme de la photo **d** est le résultat de la chromatographie sur couche mince dont l'éluant est formé par un mélange de volumes égaux d'acétone et l'eau, $\lambda = 365\text{nm}$

II- Résultats du test du pouvoir antimicrobien

2- résultat du test préliminaire

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés (Yrjönen, 2004).

Le test préliminaire avec les solvants suivant : Tween 80, le méthanol, l'éthanol et le DMSO à été réalisé dans le but de choisir le solvant approprié qui ne présentant aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes. La souche *Rhizopus stolonifer* a fait l'objet de cet essai, les résultats sont regroupés dans le **tableau 19**.

Tableau 19: Influence des solvants sur la croissance de *Rhizopus stolonifer* (Diamètre de la colonie en centimètre).

Solvant	PDA sans solvant	Tween 80 (0.05%)		Ethanol 95°		Méthanol 95°		DMSO	
Concentration (ml/20ml PDA)	0	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1
Diamètre	8	8	8	8	1.15 ± 0.07071	8	0	8	8
sporulation	++	+	-	+	-	+		++	++

Durée d'incubation : 48heures

+ : Faible sporulation

++ : Forte sporulation

- : absence de sporulation visible

Nous avons constaté que les deux solvants : le méthanol et l'éthanol à la concentration de 50µl/ml de milieu de culture, exercent une certaine répression sur la croissance de la souche teste, qui est de 86% exercée par l'éthanol, par contre l'inhibition est totale 100% avec le méthanol, en revanche avec le Tween 80 en solution de 0.05%, la souche se développe normalement mais il influe sur l'apparition des spores, il retarde la sporulation. L'étude menée par **Inouye et al. (2001)** a montré que le Tween 80 cause une élévation de la CMI. Avec le DMSO, la souche croit et envahit toute la surface du milieu de culture avec une sporulation abondante obtenue en fin d'incubation qui est de 48 heures (**fig. 32**). D'après ces résultats, nous avons préféré d'employer la méthode, qui consiste à additionner directement l'huile volatile dans le milieu de culture encore liquide, pour les flavonoïdes, qui nécessite obligatoirement un solvant de récupération et de dissolution, le DMSO à été sélectionné comme solvant de choix vue les résultats satisfaisants du test préliminaire avec ce dernier.

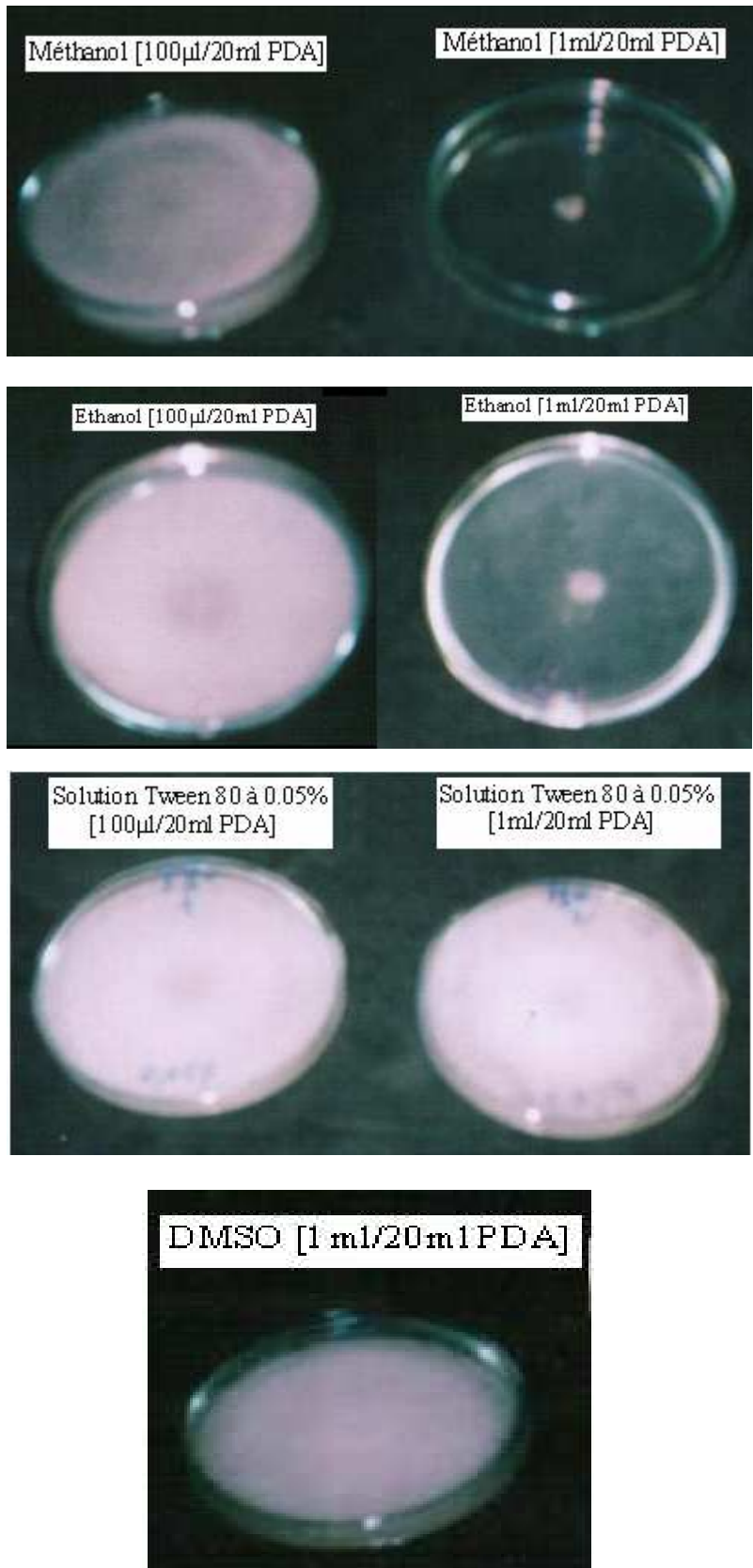


Fig. 32: Photos montrant l'effet de quatre solvant sur la culture de *Rhizopus stolonifer*

3- Résultat de l'Antibiogramme et l'Antifongogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de cinq antibiotiques par la méthode standard des disques. Les mesures des zones d'inhibition figurant dans le **tableau 20** nous ont permis de classer les souches suivant l'antibiotique. La plupart des souches bactériennes ont montré une résistance vis-à-vis des antibiotiques, **La figure 33** montre les valeurs en mm des zones d'inhibitions les plus élevés atteints avec chaque souche.

Tableau 20: Résultat de l'Antibiogramme (diamètre de la zone d'inhibition en mm)

ATB / Souches	NA (30µg)	SP (100µg)	SXT (1,25/23,75) µg	TE (30µg)	E (15 UI)
<i>P. aeruginosa</i> (p4)	0.33 ± 0.2887*	1 ± 0.000	13.33 ± 0.5774	0 ± 0.000	5 ± 0.000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	0.5 ± 0.000	0.5 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000	5 ± 0.000
<i>Enterobacter cloacea</i> (En)	10.67 ± 1.155	6.5 ± 0.8660	0 ± 0.000	5 ± 0.000	0.5 ± 0.000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KL ₁)	0 ± 0.000	2 ± 0.000	12 ± 0.000	5 ± 0.000	5 ± 0.000
<i>E. coli</i> ATCC25922	19 ± 0.000	4.67 ± 0.5774	15 ± 0.000	6 ± 0.000	12 ± 0.000
<i>E. coli</i> (E ₁)	15.67 ± 0.2887	6 ± 3.464**	14.67 ± 0.5774	0.5 ± 0.000	4 ± 0.000
<i>S. aureus</i> ATCC25923	0.5 ± 0.000	3.33 ± 0.5774	14 ± 0.000	3.33 ± 0.5774	5.67 ± 0.2887
<i>S. aureus</i> (ST ₁) ATCC 601	0.33 ± 0.2887*	5 ± 1.000	2.33 ± 2.082*	4 ± 1.000	0.33 ± 0.2887*
<i>S. typhi</i> (SL)	0 ± 0.000	5 ± 0.000	12.67 ± 1.155	2 ± 0.000	6.67 ± 1.155
<i>L. monocytogenes</i> (L ₁₁)	1 ± 0.000	4 ± 0.000	0 ± 0.000	0.5 ± 0.000	0.83 ± 0.2887
<i>Proteus mirabilis</i> (Pr)	0 ± 0.000	19.33 ± 0.5774	0 ± 0.000	0 ± 0.000	17.33 ± 0.5774
<i>Citrobacter</i> sp	18 ± 0.000	4.83 ± 0.2887	0.5 ± 0.000	0.5 ± 0.000	0.5 ± 0.000

* : non significatif

** : pas tout à fait significatif

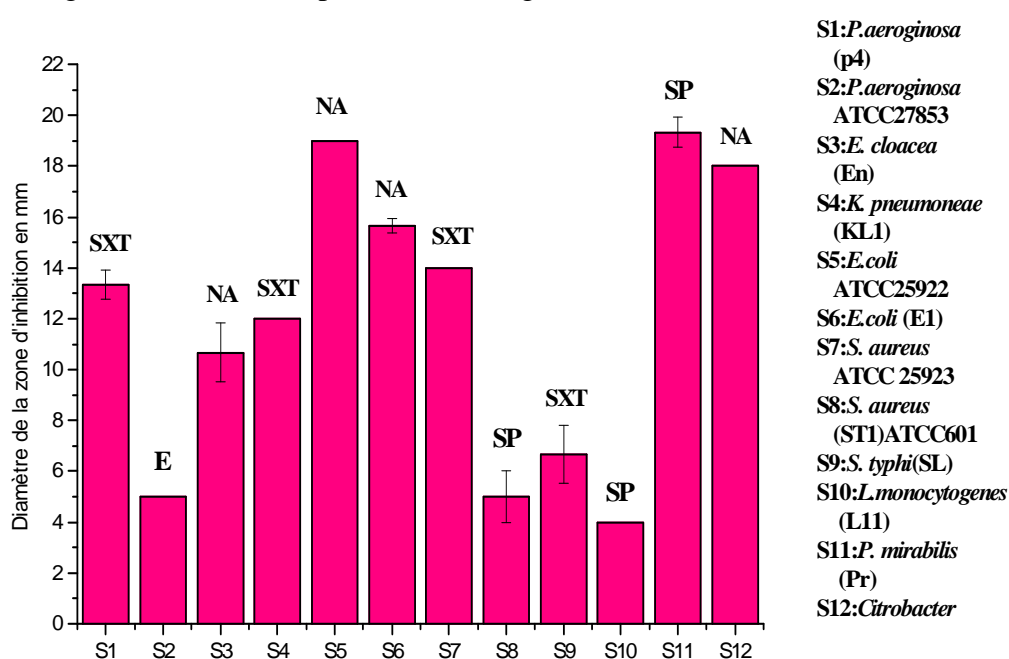


Fig. 33: Antibiogramme: indique les antibiotiques qui ont donné les zones élevés expérimentalement suivant les souches

Un seul antifongique (nystatine = Mycostatine) a été utilisé vis-à-vis des mycètes, les résultats sont regroupés dans le **tableau : 21a et 21b**.

Tableau 21a: Antifongigramme représentant le diamètre de la colonie mycélienne en cm.
Antifongique utilisé : la Nystatine

Dose ppm/20ml de PDA		50 ppm	400 ppm
La souche			
<i>Rhizopus stolonifer</i>	48 heures	6.67 ± 0.05774	2.28 ± 0.1607
<i>Mucor sp</i>	4jours	1.77 ± 0.2517	1.35 ± 0.05000
<i>Trichoderma sp</i>	4 jours	8 ± 0.000	1.8 ± 0.6245
<i>Alternaria sp</i>	4 jours	0.97 ± 0.05774	0.6 ± 0.000
<i>Aspergillus flavus</i> (AF _R) 99.4294	7 jours	3.6 ± 0.4359	2.73 ± 0.5686
<i>Fusarium sp</i>	7jours	0 ± 0.000	0 ± 0.000
<i>Penicillium sp</i>	7jours	0.73 ± 0.1528	0.67 ± 0.05774

Tableau 21b : Antifongigramme : activité de la Mycostatine sur la croissance de la levure

La souche	La dose	Diamètre de l'auréole d'inhibition en mm
<i>Candida albicans</i> 444	30 ppm/disque	12.44 ± 1.686

La figure 34, nous renseigne sur l'activité de la nystatine vis-à-vis de sept moisissures, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium* et *Penicillium* se sont montrés sensibles.

À la dose de 50 ppm/ 20ml PDA, la Mycostatine a pu réduire le taux de la croissance de la colonie mycélienne de : 72.69 % ; 78.03 % ; 71,01 % respectivement des moisissures: *Mucor*, *Alternaria* et *Penicillium*. Par ailleurs, le *Fusarium* est le plus sensible où aucune croissance n'est observée, l'antifongique a exercé une inhibition totale : 100% sur cette moisissure.

En revanche, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma* et *Aspergillus flavus* ont manifesté une certaine résistance variable suivant ces dernières. Effectivement, la résistance est totale pour la souche *Trichoderma*, qui s'est croître d'une façon normale en présence de l'antifongique comme en s'en absence.

Concernant la levure *C. albicans*, une zone moyenne d'inhibition de 12.44 mm a été obtenue sous l'action de la nystatine (**fig. 35**).

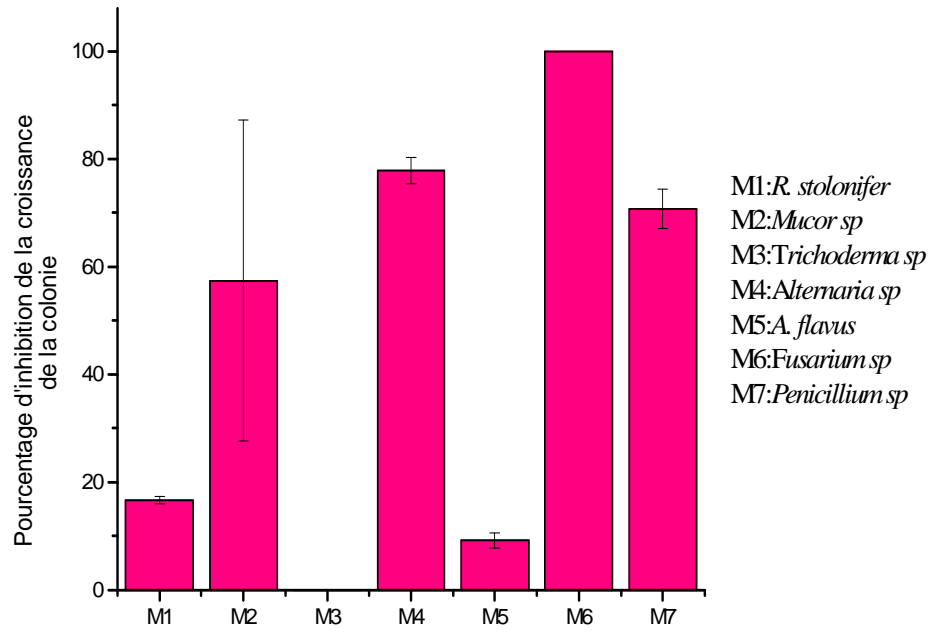


fig. 34: Antifongigramme
 (taux d'inhibition de la croissance mycelienne en présence de la Nystatine à la dose de 50 ppm)

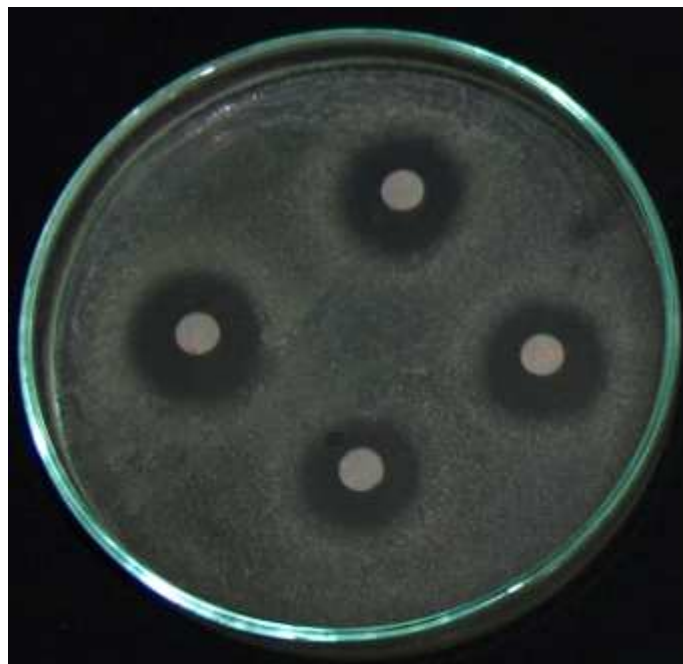


Fig. 35: Photo montrant l'activité de la nystatine sur la levure *Candida albicans* (30 ppm/disque)

3- Résultat du test du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et flavonoïdes

A/ Résultat de l'activité antimicrobienne (bactéries et levure) testée par la méthode des disques

On note ici que la méthode utilisée est celle de Vincent, que le disque déposé à la surface du milieu gélosé est chargé de 3µl d'extrait naturel que ce soit pour les huiles aromatiques ou les flavonoïdes et que pour ces derniers, l'extrait brut sec se trouve en solution dans le DMSO. Les zones d'inhibitions des différentes souches avec les différents extraits sont résumées dans le **tableau 22**.

Tableau 22 : Activité des huiles essentielles et extraits flavoniques (diamètre de la zone d'inhibition des cultures microbiennes en mm)

Extrait souche	H. E <i>Lavandula</i>	H. E <i>Cistus</i>	H. E <i>Smyrniun</i>	EF <i>Lavandula</i>	EF <i>Cistus</i>	EF <i>Crataegus</i>	EF <i>Smyrniun</i>
<i>P. aeruginosa</i> (p4)	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	0.52 ± 0.3207	0 ± 0.000	0 ± 0.000	2.58 ± 0.8036	8.51 ± 0.5309	0 ± 0.000	0 ± 0.000
<i>E. cloacea</i> (En)	2.86 ± 0.9942	3.22 ± 1.619	0 ± 0.000	4.5 ± 1.803	8.33 ± 1.528	0 ± 0.000	0 ± 0.000
<i>K. pneumoneae</i> (KL ₁)	5.88 ± 0.5728	0.33 ± 0.2887	0 ± 0.000	4 ± 1.250	1.66 ± 2.887	0 ± 0.000	0 ± 0.000
<i>E. coli</i> ATCC25922	8.19 ± 1.496	4.67 ± 0.7638	0 ± 0.000	1.75 ± 0.6614	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0.5 ± 0.4330
<i>E. coli</i> (E ₁)	2.83 ± 0.8780	2.67 ± 0.2887	0 ± 0.000	0.83 ± 0.5774	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000
<i>S. aureus</i> ATCC25923	5.90 ± 1.670	3.5 ± 1.323	3.33 ± 1.528	2.92 ± 0.6292	14.58 ± 1.010	4.625 ± 1.474	0 ± 0.000
<i>S. aureus</i> (ST ₁) ATCC 601.	6.83 ± 1.443	10.66 ± 1.155	2.33 ± 0.6292	0 ± 0.000	14.83 ± 2.363	3 ± 2.464	0 ± 0.000
<i>S. thyphi</i> (SL)	3.67 ± 1.155	0 ± 0.000	0 ± 0.000	6.5 ± 0.5000	14 ± 3.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000
<i>L. monocytogenes</i> (L ₁₁)	5.64 ± 0.7743	19.5 ± 0.5000	0 ± 0.000	0 ± 0.000	12.08 ± 3.591	0 ± 0.000	0 ± 0.000
<i>P. mirabilis</i> (Pr)	5.66 ± 1.258	3.83 ± 1.528	1.17 ± 0.5204	0.33 ± 0.2887	5 ± 2.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000
<i>Citrobacter sp</i>	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000	0 ± 0.000
<i>Candida albicans</i> 444	4.83 ± 0.7638	3.67 ± 0.2887	2 ± 0.000	1 ± 0.000	22.25 ± 3.544	4.83 ± 0.7638	2 ± 0.000

➤ Les huiles essentielles :

Aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des disques à la charge de 3 µl/disque après fin d'incubation des cultures bactériennes de *Citrobacter* et *P. aeruginosa* (p4). Ces souches possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antimicrobienne de ces trois huiles.

L'huile de *Smyrniium olusatrum* a montré l'activité la plus faible par rapport aux deux autres huiles, notant qu'elle est sans activité sur la plupart des souches de bactéries à savoir en plus de *P. aeruginosa* (p4) et *Citrobacter*, *P. aeruginosa* ATCC, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *E. coli* ATCC, *E. coli* (E1), *S. thyphi* et *L. monocytogenes*.

Quelques zones d'inhibitions faibles ont été enregistrées toutes inférieures à 4 mm avec : *S. aureus* ATCC (3.33mm) ; *S. aureus* (ST1) (2.33mm) ; *Proteus* (1.17mm), ainsi la levure *C. albicans* (2mm).

Les huiles essentielles de *Lavandula* et *Cistus* ont présenté une certaine activité modérée dont les diamètres des zones d'inhibition n'ont pas dépassé les 20 mm. Une bonne activité la plus élevée avec l'huile de Ciste a été remarquée contre la souche *L. monocytogenes* dont la valeur moyenne de l'auréole d'inhibition a été de 19,5 mm. Ajoutant une zone de 10.66 mm en moyenne avec cette même huile contre *S. aureus* (ST1).

Le pouvoir antimicrobien de la Lavande le plus élevé a été observé contre *E. coli* ATCC mais dont le diamètre n'est que moyen de quelques millimètres ; d'environ 8.19 mm. L'effet antimicrobien peut être contribué au camphre (Chu et Kemper, 2001).

Nos résultats ne concorde pas avec ceux trouvés par Gören et al. (2002), qui parlent d'une très bonne activité antimicrobienne de *L. stoechas* quand l'huile essentielle est testée par la technique des disques, ces derniers ont solubiliser l'huile dans de l'hexane et ont obtenu des zones d'inhibitions de 22mm, 23mm, 24mm, 25mm contre respectivement *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumonia* et *P. aeruginosa*.

Nous avons remarqué aussi, que *Klebsiella* et *S. thyphi* se sont montrés insensibles contre l'action de l'huile essentielle du Ciste. Nos résultats concorde avec les travaux de Kaïd Slimane (2004) observant une faible activité antibactérienne de *C. ladaniferus* récolté des stations Zarifet et Hafir.

➤ Les flavonoïdes :

Selon le **tableau 22** : nous avons noté une résistance où aucune zone d'inhibition n'a été détectée avec :

- *Smyrniium olusatrum* contre toutes les souches bactériennes : *P. aeruginosa* (P4), *P. aeruginosa* ATCC, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *E. coli* (E1), *Citobacter*, *S. thyphi*, *S. aureus* (ST1), *S. aureus* ATCC, *L. monocytogenes*, *Proteus* ainsi que *E. coli* ATCC dont la zone mesurée est extrêmement faible et donc non significative.
- *Crataegus oxyacantha* contre les souches : *P. aeruginosa* (P4), *P. aeruginosa* ATCC, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citobacter*, *E. coli* (E1), *E. coli* ATCC, *L. monocytogenes* et *proteus*.
- *Cistus ladaniferus* contre : *P. aeruginosa* (P4), *E. coli* (E1), *Citobacter* et *E. coli* ATCC.

- *Lavandula stoechas* contre : *P. aeruginosa* (P4), *Citobacter*, *S. aureus* (ST1) et *L. monocytogenes*, ainsi *Proteus* dont les zones peuvent être considérés comme négligeables.

Parmi les quatre extraits, deux extraits peuvent être considéré comme sans ou presque sans activité antibactérienne. En revanche, deux autres ont révélé une activité antimicrobienne ; l'extrait de la Lavande et le Ciste.

L'extrait flavonoïdique de *C. ladaniferus* est celui de tous les extraits bruts possédant le pouvoir antimicrobien le plus important, surtout contre *P. aeruginosa* ATCC, *Enterobacter*. Ces deux souches ont présenté presque identiquement la même sensibilité. Une activité aussi similaire contre les deux souches de *S. aureus* (ST1) et *S. thyphi* dont les diamètres des zones d'inhibition sont les plus élevés, qui ont été enregistrés pour le test antibactérien non seulement pour l'extrait flavonique du Ciste mais aussi par rapport à l'ensemble des quatre extraits flavoniques.

Le test aussi avec les extraits flavonoïques a révélé une sensibilité très significative de la levure *C. albicans* par rapport aux bactéries où nous avons noté une sensibilité importante de cette souche de levure avec l'extrait flavonoïdique de *C. ladaniferus* dont la zone d'inhibition moyenne à été de 22.25 mm (**fig. 36**).

Nous remarquons aussi suivant ce même tableau, que quelque soit la nature et l'origine de l'extrait naturel : flavonique ou huile essentielle et quelque soit la concentration de l'extrait dans le disque, *P. aeruginosa* (p4) et *Citrobacter* possèdent une forte résistance et leur croissance est identique aux témoins.

Ce test n'est qu'un criblage des activités antimicrobiennes des extraits, il nous permet de sélectionner pour chaque souche l'extrait, qui a présenté le plus une activité antimicrobien parmi l'ensemble des extraits naturels (**fig. 37**). C'est aussi un test préliminaire pour un autre essai microbiologique complémentaire, qui est l'essai au spectrophotomètre pour la mesure du pouvoir antimicrobien de l'extrait et la détermination des IC50.



Fig. 36: Effet de l'extrait flavonique du Ciste (30 ppm/disque) sur la levure *Candida albicans*

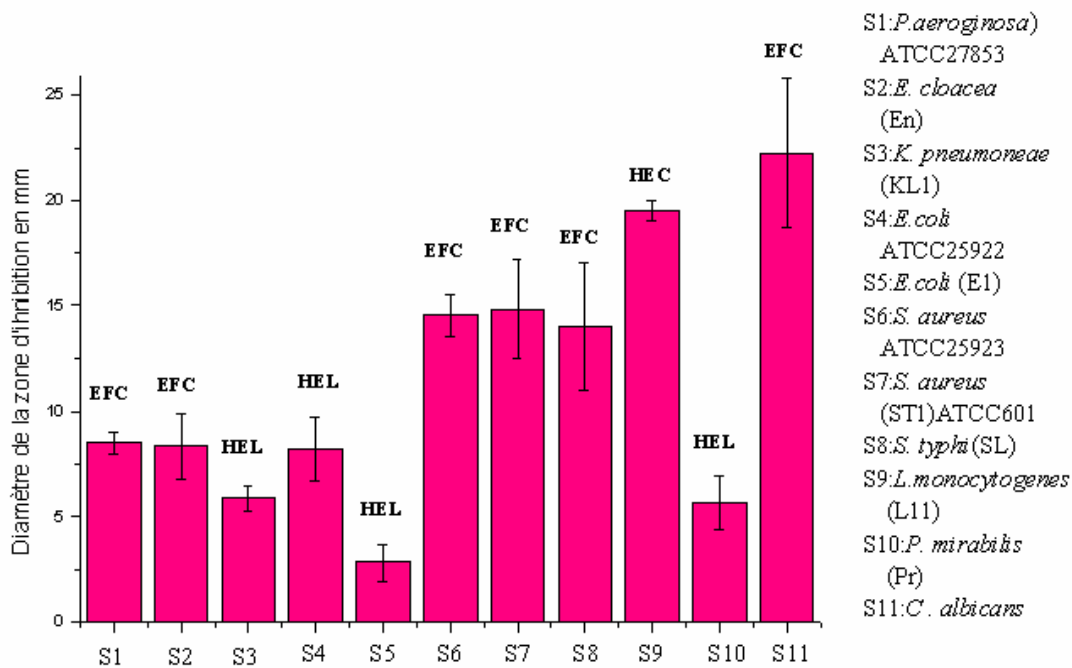


Fig. 37: Résultat du criblage du pouvoir antimicrobien des extraits naturels réalisé par la méthode des disques

Suivant la **figure 37**, nous pouvons classer les souches microbiennes (bactéries et levure) d'après l'extrait naturel présentant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance le plus élevé de tous les autres extraits testés contre chaque souche :

- Huile essentielle de *Lavandula stoechas* : *Klebsiella*, *E. coli* ATCC, *E. coli* (E1) et *Proteus*.
- Huile essentielle de *Cistus ladaniferus* : *Listeria monocytogenes*
- Extrait flavonoïdique de *C. ladaniferus* : *P. aeruginosa* ATCC, *Enterobacter*, *S. aureus* (ST1), *S. aureus* ATCC, *S. typhi* et la levure *C. albicans*.

B/ Résultat de l'étude spectrophotométrique du pouvoir antimicrobien

Les méthodes de disque sont intensivement employées pour étudier l'activité antibactérienne des substances naturelles et les extraits des plantes. Ces analyses sont basées sur l'utilisation des disques comme réservoirs contenant la solution des substances à examiner. Dans le cas des solutions avec une basse activité, une grande concentration ou volume est nécessaire, cependant la capacité des disques est limitée (**Gülçin et al., 2004**), c'est pourquoi le test des disques a été limité seulement au criblage des activités antimicrobiennes, qui ensuite complété par un autre test microbiologique pour une mesure de la sensibilité des bactéries à l'augmentation de la dose de l'extrait naturel et pour la détermination des IC50.

Les mesures de densité microbienne sont lues à 625 nm contre des blancs sans inoculum, ces mesures transformées en % d'inhibition de la population microbienne.

A partir de ces valeurs, des courbes de réduction de croissance en fonction de la dose de l'extrait naturel ont été dressées (**fig. 38 (a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k)**).

D'après ces figures, la croissance de différentes souches de bactéries et la levure a été largement influencée et une réduction très significative proportionnelle à la dose de l'extrait naturel a été observée. Ces activités antimicrobiennes ne sont pas dues à la présence d'une substance particulière seulement mais, sont la résultante de l'action complexe de diverses structures aromatiques ou des composés flavonoïdes.

De ces régressions, on a déterminé les concentrations qui inhibent la prolifération microbienne de 50%. Ces valeurs IC50 sont enregistrées dans le **tableau 23**. On constate que pour la plupart des souches (bactéries et levure), quelque soit l'extrait naturel agissant sur ces souches, les valeurs IC50 de la quasi totalité ont été obtenu entre 1 et 2µl/ml du milieu de culture exception faite des staphylocoques, ont manifester une résistance où les IC50 sont entre 6 et 7µl/ml.

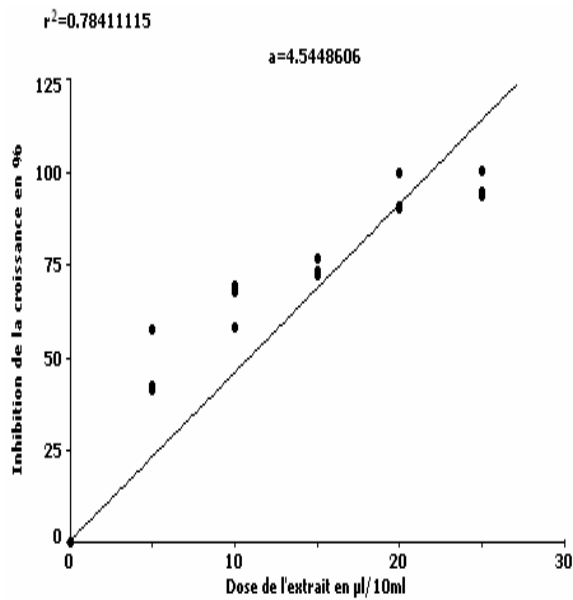


Fig. 38a: Effet de l'extrait flavonoïdique du Ciste sur la croissance de *P. aeruginosa* ATCC27853

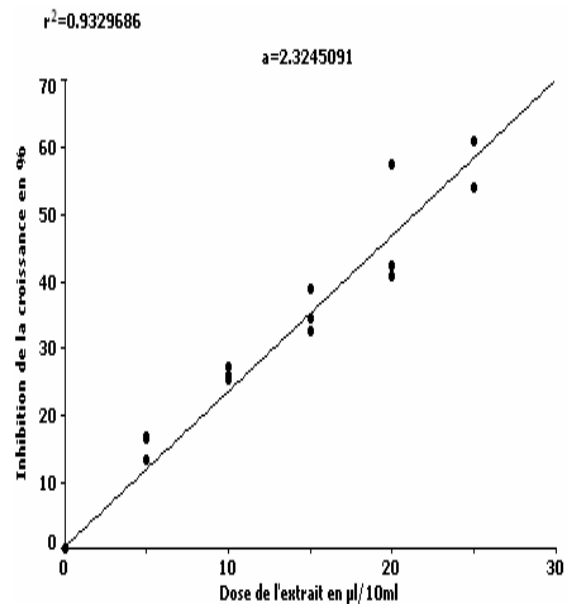


Fig. 38b: Effet de l'extrait flavonoïdique du Ciste Sur la croissance de *E. cloacea*

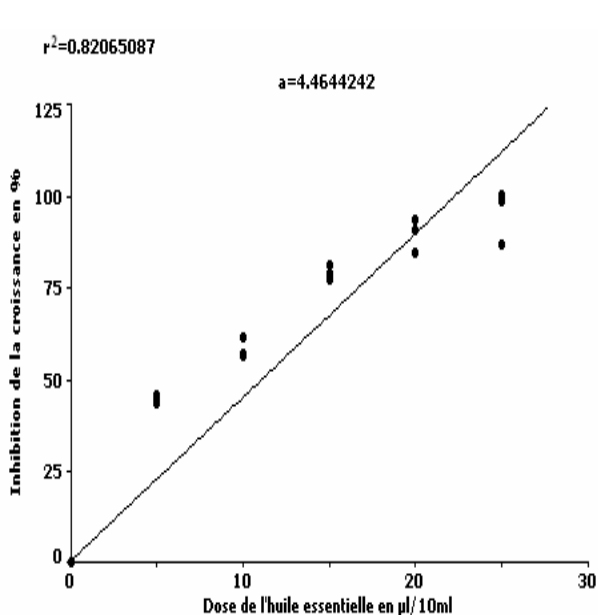


Fig. 38c: Effet de l'huile essentielle de La lavand sur la croissance de *K. pneumoniae*.

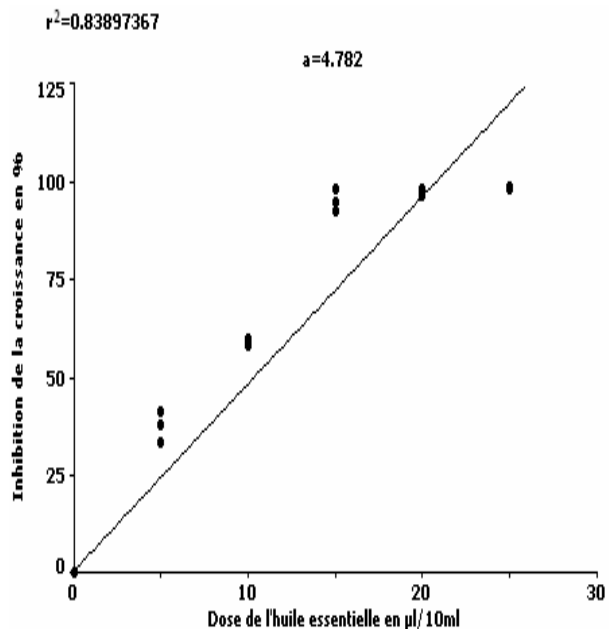


Fig. 38d: Effet de l'huile essentielle de La lavande sur la croissance de *E. coli* ATCC25922.

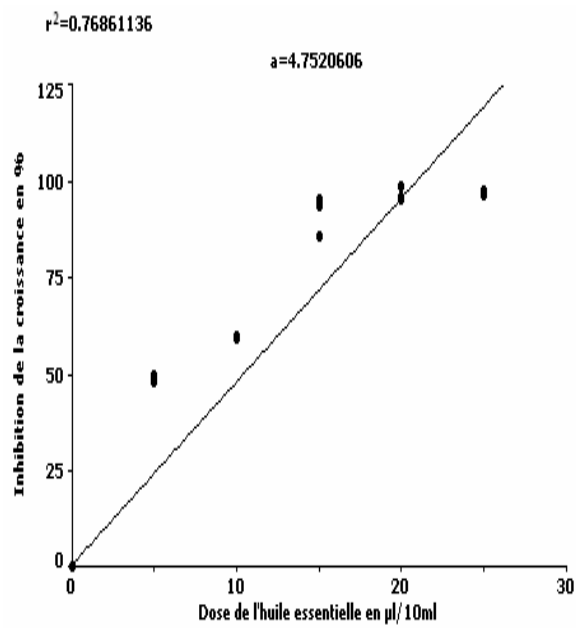


Fig. 38e: Effet de l'huile essentielle de La lavande sur la croissance de *E. coli* (E₁).

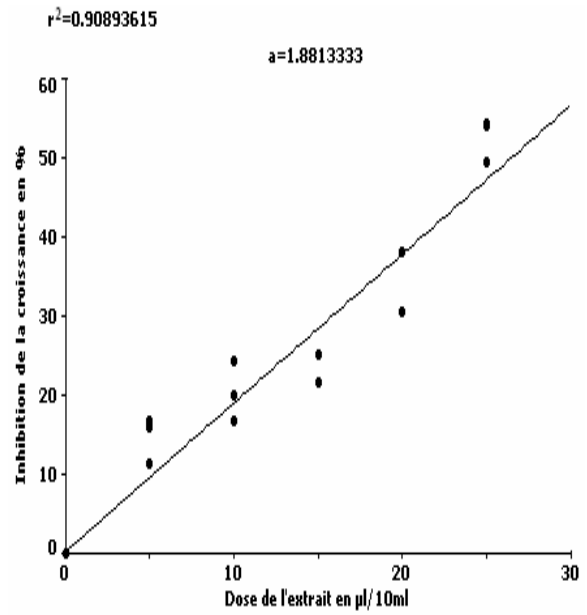


Fig. 38f: Effet de l'extrait flavonoïdique du Ciste Sur la croissance de *S. typhi*.

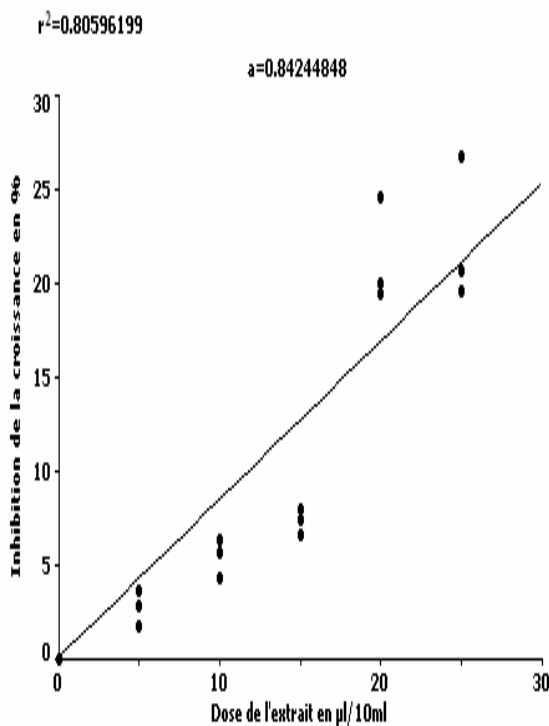


Fig. 38g: Effet de l'extrait flavonoïdique du Ciste Sur la croissance de *S. aureus* ATCC25923.

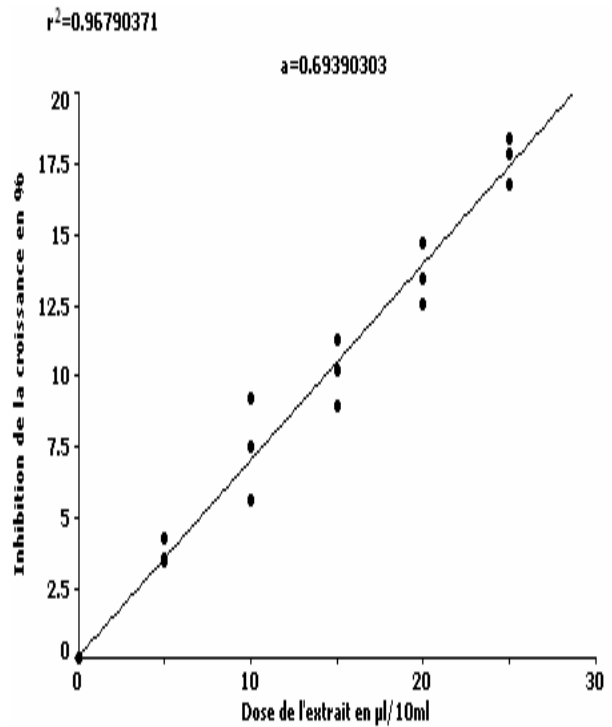


Fig. 38h: Effet de l'extrait flavonoïdique du Ciste Sur la croissance de *S. aureus* (ST₁).

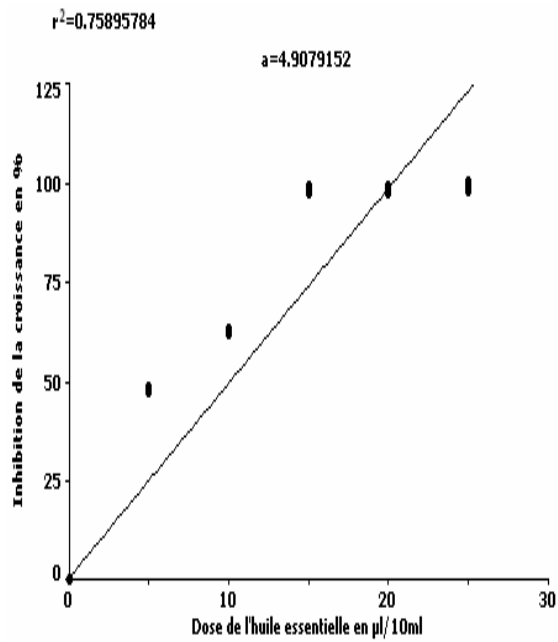


Fig. 38i: Effet de l'huile essentielle de La lavande sur la croissance de *P. mirabilis*.

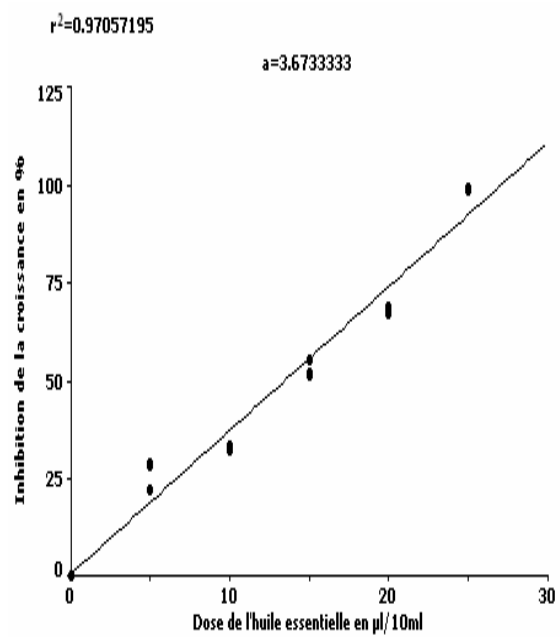


Fig. 38j: Effet de l'huile essentielle de du Ciste Sur la croissance de *L. monocytogenes*.

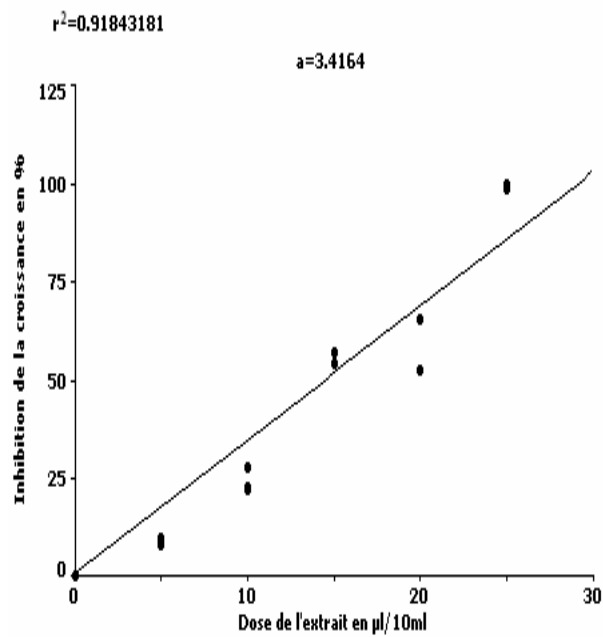


Fig. 38k: Effet de l'extrait flavonoïdique du Ciste Sur la croissance de *Candida albicans*.

Fig. 38: Effet des extraits naturels sur la densité de croissance microbienne dans un milieu liquide.

**Tableau 23: Les concentrations inhibant 50% la population microbienne.
(IC50 en µl/ml)**

La souche	IC50
<i>Salmonella thyphi</i> (SL) Extrait Flavonique: Cistus	2.65797 ± 0.03217
<i>E. cloacea</i> (En) Extrait Flavonique: Cistus	2.16563 ± 0.2118
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC Extrait Flavonique: Cistus	6.01222 ± 0.8040
<i>S. aureus</i> (ST ₁) Extrait Flavonique: Cistus	7.22124 ± 0.4103
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC Extrait Flavonique: Cistus	1.10178 ± 0.05136
<i>Listeria monocytogenes</i> (L ₁₁) Huile essentielle Cistus	1.36117 ± 0.003776
<i>K. pneumoneae</i> (KL ₁) Huile essentielle: Lavandula	1.12219 ± 0.06201
<i>P. mirabilis</i> (Pr) Huile essentielle: Lavandula	1.01881 ± 0.008161
<i>E. coli</i> ATCC Huile essentielle: Lavandula	1.04562 ± 0.007501
<i>E. coli</i> (E ₁) Huile essentielle: Lavandula	1.05240 ± 0.01865
<i>Candida albicans</i> Extrait Flavonique: Cistus	1.46354 ± 0.05794

C/ Résultat de l'activité antifongique (moisissures) testée par la méthode de contact direct

Rappelons que la méthode employée est celle de contact direct, qui consiste à additionner aseptiquement l'extrait naturel dans le milieu de culture en état de fusion.

1/ les huiles essentielles : Les résultats de l'essai de l'activité antifongique des huiles de *Lavandula stoechas* de la région de *Oum el Alou* et *Cistus ladaniferus* de *Sidi M'hamed* figurent dans le **tableau : 24a et 24b**.

Tableau 24a: Effet de l'huile essentielle de *L. stoechas* sur le diamètre (cm) des colonies mycéliennes

[] μ l/20 ml MC Les souches	1/ Huile <i>Lavandula stoechas</i>						
	4	10	20	40	100	110	120
<i>Rhizopus stolonifer</i>	8 \pm 0.000	6.87 \pm 0.05774	3.42 \pm 0.02887	0	0		
<i>Mucor sp</i>	4.17 \pm 0.2517	3.73 \pm 0.05774	3.83 \pm 0.2887	1.47 \pm 0.05774	0		
<i>Trichoderma sp</i>	7.77 \pm 0.2517	5.67 \pm 0.1528	2.87 \pm 0.1528	1.1 \pm 0.000	0		
<i>Alternaria sp</i>	3 \pm 1.000	3.22 \pm 0.07638	2.18 \pm 0.1041	1 \pm 0.000	0		
<i>Aspergillus flavus</i>	3.73 \pm 0.05774	3.27 \pm 0.2082	2.62 \pm 0.07638	1.55 \pm 0.5000	0.9 \pm 0.1000		0
<i>Fusarium sp</i>	3.2 \pm 0.1000	2.05 \pm 0.05000	1.52 \pm 0.02887	0	0		
<i>Penicillium sp</i>	2.63 \pm 0.1041	2.07 \pm 0.05774	1.3 \pm 0.2000	1.17 \pm 0.05774	0.6 \pm 0.000	0	

Tableau 24b: Effet de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* sur le diamètre (cm) des colonies mycéliennes

[] μ l/20 ml MC Les souches	2/ Huile <i>Cistus ladaniferus</i>								
	4	10	20	40	100	110	120	125	150
<i>Rhizopus stolonifer</i>	5.38 \pm 0.02887	5.02 \pm 0.02887	3.17 \pm 0.05774	1.87 \pm 0.02887	0.73 \pm 0.0574		0		
<i>Mucor sp</i>	2.87 \pm 0.05774	1.48 \pm 0.07638	1.15 \pm 0.05	0	0				
<i>Trichoderma sp</i>	2.93 \pm 0.1155	2.87 \pm 0.05774	1.65 \pm 0.05	1.35 \pm 0.05	1.05 \pm 0.05		0.7 \pm 0.05	0	
<i>Alternaria sp</i>	2.5 \pm 0.05000	2.1 \pm 0.1000	1.55 \pm 0.05	1.1 \pm 0.1000	0				
<i>Aspergillus flavus</i>	2.5 \pm 0.05	2.1 \pm 0.1000	1.55 \pm 0.05	1.1 \pm 0.1000	1.32 \pm 0.02887		1.2 \pm 0.000		0
<i>Fusarium sp</i>	2.82 \pm 0.6212	1.83 \pm 0.02887	1.65 \pm 0.05	1.43 \pm 0.1041	0				
<i>Penicillium sp</i>	1.15 \pm 0.05000	1.32 \pm 0.02887	1.1 \pm 0.000	1.07 \pm 0.05774	0.6 \pm 0.000	0			

Les deux types d'huiles essentielles se sont avérés plus active sur les moisissures. Selon **Chu et kemper (2001)**, le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *L. stoechas* est lié a l' α -pinène ; β -pinène, p-cimène, 1,8 Cinéole, ce dernier composé présent en proportion importante dans nos huiles volatiles (18.9%).

L'activité antifongique de l'huile essentielle du Ciste à été remarqué et prouvé par un certains nombre de recherche dont les travaux de **Mrabet et al. (1999)** sur les divers extraits de Ciste de Maroc, ces auteurs ont conclu que l'huile essentielle était la composante qui manifeste le pouvoir antifongique le plus efficace.

Toutes les souches se sont inhibées à une concentration comprise entre 2 et 7.5 μ l/ml de milieu de culture, nous avons constater, que les deux huiles ont presque une activité similaire sur les souches testées, ceci est bien clair en comparant les concentrations inhibitrices.

L'huile de *L. stoechas* a été très active par rapport à l'huile de *C. ladaniferus* sur *R. stolonifer* dont la CMI à été de 2 μ l/ml avec la première huile et 6 μ l/ml avec la deuxième. Pour *Mucor*, c'est l'huile essentielle de *C. ladaniferus* (CMI= 2 μ l/ml) qui est la plus active par rapport à l'huile de *L. stoechas* (CMI= 5 μ l/ml). *Trichoderma* a été inhibé à la dose de 5 μ l/ml, en présence de l'huile de *L.stoechas*, par contre *Fusarium* à été inhibé totalement à la même dose mais en présence de l'huile de *C. ladaniferus*.

Les mêmes CMI's ont été obtenues avec les deux huiles pour les souches : *Alternaria* et *Penicillium* dont les valeurs sont 5 μ l/ml et 5.5 μ l/ml respectivement pour la première souche et deuxième souche. La souche *Aspergillus* a présenté des CMI élevé par rapport aux autres souches, mais reste faible puisque cette moisissure n'a pas pu se développer et germer dans un milieu renfermant une quantité basse d'huile essentielle, à 6 μ l/ml PDA inhibée par l'huile de *L. stoechas*, et à 7.5 μ l/ml par l'huile de *C. ladaniferus*.

Nous pouvons ainsi constater que la quasi totalité des souches sont sensibles vis-à-vis des huiles essentielles, pour la plupart, le diamètre des colonies diminue à chaque fois qu'on augmente la concentration de l'huile jusqu'à la non germination du disque atteinte au CMI's. Suivant les souches sans considérée les huiles ; l'intervalle des CMI's est étroit, avec la CMI's la plus basse de 2 μ l/ml PDA et la CMI's la plus élevée de 5.5 μ l/ml PDA. Aussi a noté, que l'huile essentielle agit non seulement sur la croissance du mycélium mais aussi sur la sporulation. **La figure 39** élucide clairement cette activité des huiles essentielles à différentes doses sur les différentes souches de moisissures.



Fig. 39 : Exemples de l'effet des huiles essentielles sur la croissance des moisissures

2/ les flavonoïdes : avec les flavonoïdes, à des volumes égaux ou un peu élevés à ce de l'huile, aucune différence noté dans la mesure des diamètres de croissance des colonies avec ce des témoins. Pour cela, nous avons augmenté davantage les doses dans le milieu de culture. Les doses expérimentées sont : 300µl, 500µl et 700µl/20ml PDA dont figurent ainsi que les résultats dans le tableau ci-dessous (**tableau 25**).

Tableau 25 : Activité des extraits flavonoïdiques sur la croissance des moisissures (diamètre de la colonie en cm)

Les souches	Témoin1 PDA	Témoin2 PDA+DMSO	[] µl/20ml MC	EF. <i>Lavandula</i>	EF. <i>Crataegus</i>	EF. <i>Cistus</i>	EF. <i>Smyrniium</i>
<i>Rhizopus stolonifer</i>	8±0.000	8±0.000	300	6.2 ± 0.20000	8 ± 0.000	5.2±0.100	3.23 ± 0.1528
			500	5.9 ± 0.1000	7.67 ± 0.1528	4 ± 0.000	1.33±0.05774
			700	5.37± 0.05774	7.27± 0.2363	3.3±0.1000	0.77±0.05774
<i>Mucor sp</i>	6.47± 0.05774	8±0.000	300	7.67± 0.3055	8±0.000	2.43±0.1528	8±0.000
			500	6.73± 0.5686	8± 0.000	1.77±0.2082	8±0.000
			700	5.53± 0.2517	8± 0.000	1.67±0.05774	6.8±0.2000
<i>Trichoderma sp</i>	8±0.000	8±0.000	300	3.6± 0.3000	8± 0.000	8±0.000	2.4±0.4000
			500	2.8± 0.1000	7.2± 0.2000	7.33±0.5774	2.67±1.155
			700	2.33± 0.1155	5.17± 0.1528	2.47±0.3512	1.49±0.3151
<i>Alternaria sp</i>	4.4± 0.2646	2.55±1.168	300	2.5± 0.000	2.98± 0.8808	1.5±0.05000	2.1±0.1000
			500	2.27± 0.2303	3.3± 0.2000	1.4±0.05000	1.83±0.05774
			700	1.98± 0.1258	3.78± 1.184	1.37±0.05774	1.6±0.000
<i>Aspergillus flavus</i>	3.97± 0.2082	4.87±0.2309	300	4.65± 0.1323	6.37± 0.07638	3.67±0.5346	6.67±0.07638
			500	4.53± 0.1155	6.43± 0.2517	3.4±0.3606	6.53±0.05774
			700	4.3± 0.1732	6.3± 0.1000	2.9±0.2646	4.72±0.07638
<i>Fusarium sp</i>	3.65± 1.176	2.03±0.1155	300	3.73± 1.159	1.8± 0.1000	0.6±0.000	5.8±1.473
			500	1.97± 0.05774	1.7± 0.1000	0.6±0.000	3.45±1.580
			700	1.47± 0.05774	1.37± 0.05774	0.6±0.000	2.2±0.5568
			1 000			0±0.000	
<i>Penicillium</i>	2.53± 0.5508	2.32±0.4368	300	2.83± 0.5508	3.33± 0.1528	1.8±0.05000	2.03±0.8520
			500	2.43± 0.1528	3.53± 0.1528	1.73±0.07638	1.77±0.1528
			700	2.13± 0.05774	3.27± 0.1155	1.68±0.1041	1.37±0.05774

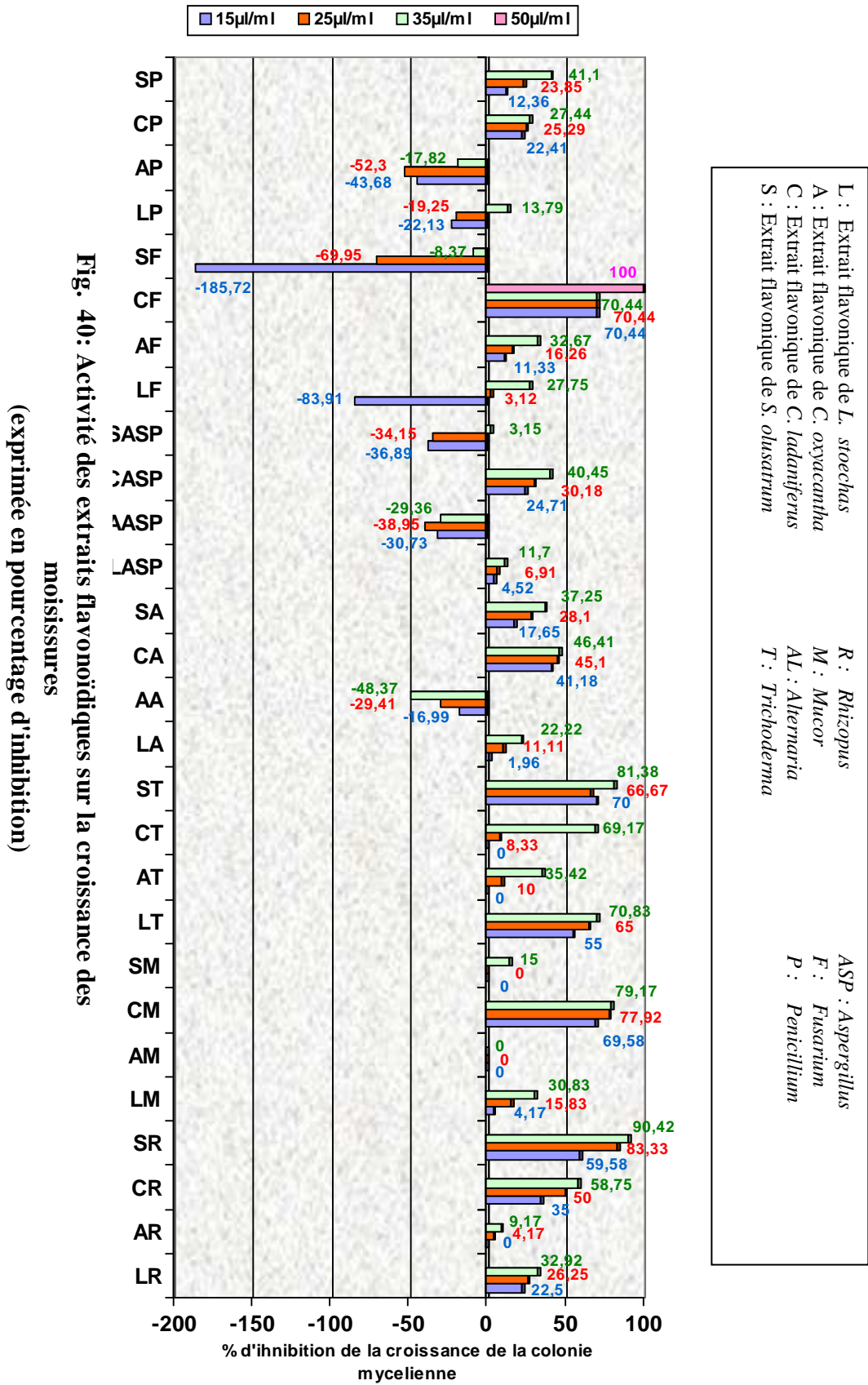
Les moisissures ont beaucoup résisté aux doses d'extraits flavoniques administrés à leur milieu de culture, quelques exceptions sont observées avec certains extraits pour quelques souches, l'activité antifongique a été observée et davantage augmentée avec l'augmentation de la dose de l'extrait dans le milieu tels est le cas du *Rhizopus stolonifer* dont sa croissance était faible sous l'effet exercé par l'extrait flavonique du ciste où le diamètre s'est abaissé de 8cm (témoin) à 3.3cm à la dose de 35µl d'extrait/ml de milieu, équivalent à un taux d'inhibition de 58.75% et très faible en présence de l'extrait flavonoïdique du *smyrniium olusatrum* dont le diamètre a été de 0.77cm à la même dose, équivalent à un taux d'inhibition de 90.38%.

Mucor a montré une sensibilité envers l'extrait de *Cistus* avec un diamètre de la colonie de 2.43cm à 15µl/ml et de 1.77cm à 25µl/ml par rapport à un diamètre allant de 6.5 à 8cm observé dans les témoins.

Par ailleurs, la croissance de *Trichoderma* a été largement influencée par l'extrait du *smyrniium olusatrum*, à la concentration de 15µl/ml de l'extrait flavonoïdique, le diamètre s'est réduit de 70% et avec l'extrait flavonique de *Lavandula stoechas*, le pourcentage de réduction de la colonie a été de 55%, 65%, 70.88% respectivement pour les doses de 15, 25 et 35µl/ml du milieu PDA.

Une activité inhibitrice 100% a été remarquée avec l'extrait flavonique du ciste, exercé sur la souche *Fusarium* à la concentration de 50µl/ml, à la dose de 15µl/ml aucune croissance n'est établie, seulement on a constaté une germination du disque sans extension de celui-ci.

La souche *Aspergillus flavus* est remarquablement la plus résistante de toutes les moisissures testées, non seulement, la colonie croît identiquement au témoin en présence de n'importe quel extrait flavonoïdique, ce qui prouve que ces extraits ne présentent aucune activité antifongique contre cette souche, en revanche, il semble que certains extraits favorisent la prolifération et l'envahissement du mycélium tels est l'exemple de l'extrait du *Smyrniium* et d'Aubépine (**Fig. 40**). Cet effet stimulant de la croissance par des extraits bruts naturels a été aussi observé par **Holetz et al. (2002)**. Des exemples de la croissance mycélienne sous l'effet des extraits flavonoïdiques naturels sont éclaircis dans la **Fig.41** (annexes).



- **Les concentrations inhibant de 50% la croissance de la colonie mycélienne**

Le paramètre IC50 a été calculé pour chaque extrait naturel et chaque souche montrant une sensibilité, en vue de déterminer les concentrations qui réduisent la croissance des différentes colonies des moisissures de 50%. Ce paramètre est d'une plus grande précision que les CMI.

Le test antifongique a été répété trois fois, une IC50 pour chaque souche et chaque extrait est obtenu par la moyenne des IC50 évaluées graphiquement et séparément à partir des régressions des trois tests. Ces IC50 figurent dans le **tableau 26**.

Tableau 26: Valeur des IC50 en µl/ml

Les souches	EF. <i>Lavandula</i>	EF. <i>Crataegus</i>	EF. <i>Cistus</i>	EF. <i>Smyrniun</i>
<i>Rhizopus stolonifer</i>	57.94 ± 2.873	197.93 ± 57.932	27.03 ± 0.4257	15.59 ± 0.2862
<i>Mucor SP</i>	62.14 ± 8.500	-	15.81 ± 0.4960	148.25 ± 23.625
<i>Trichoderma SP</i>	19.88 ± 0.6491	59.39 ± 3.486	36.18 ± 0.7404	16.79 ± 1.802
<i>Alternaria SP</i>	89.01 ± 24.766	-	31.53 ± 0.4899	46.12 ± 1.393
<i>Aspergillus flavus</i>	165 ± 44.658	-	42.56 ± 5.592	-
<i>Fusarium SP</i>	79.11 ± 6.564	58.59 ± 5.408	nd	-
<i>Penicillium SP</i>	220.79 ± 15.775	-	59.68 ± 8.214	44.12 ± 7.205

nd : non déterminée

Dans ce tableau, les souches qui n'ont pas une valeur de l'IC50, portant le signe "-" sont celles présentant une résistance où aucune réduction de la croissance de la colonie mycélienne n'a été observée, la croissance soit est restée identique au témoin tel est le cas *Mucor* (0% taux d'inhibition), soit le cas inverse, une augmentation da croissance de la colonie mycélienne à été observée expérimentalement, le cas des autres moisissures.

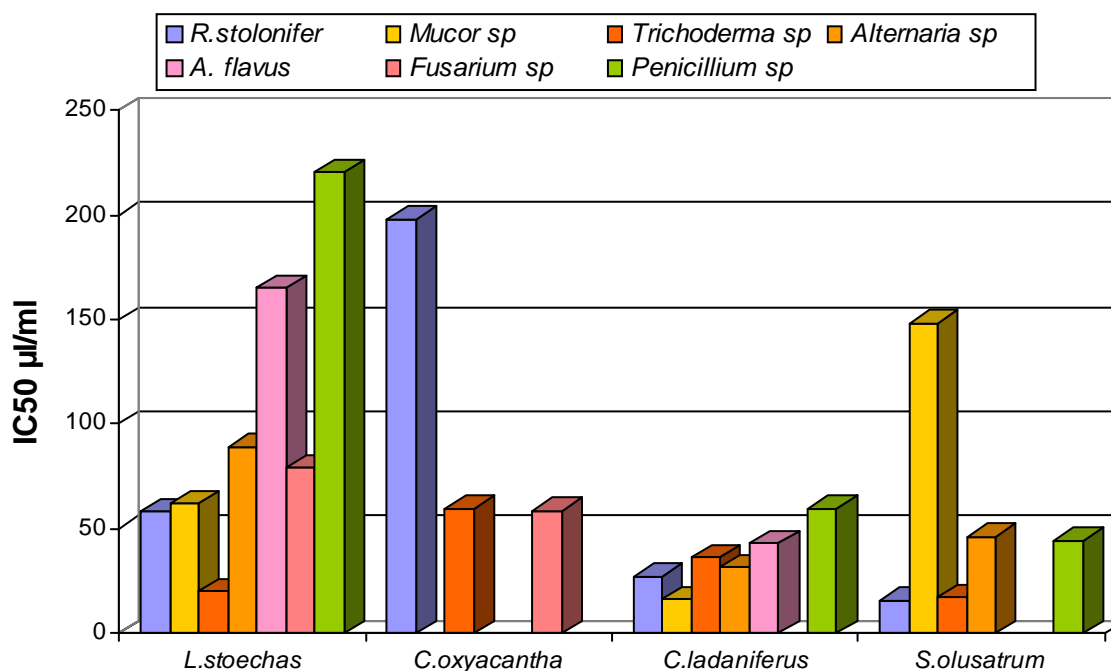


Fig.42: La concentration de l'extrait flavonique qui réduit la colonie mycelienne de 50%

La figure 39 présente les souches montrant une sensibilité pour chaque extrait, c'est ainsi que *L. stoechas* possède un effet sur toutes les moisissures tests avec une IC50 inférieur à 100µl/ml pour la plupart exception d'*A. flavus* et *Penicillium*, ont montré une importante résistance. La croissance de *Trichoderma* à été sensiblement affectée par l'augmentation de la dose de l'extrait dans le milieu de culture, c'est la plus sensible de toutes les autres souches pour cet extrait avec une IC50 la plus basse d'environ 20µl/ml.

En ce qui concerne *C. oxyacantha*, l'extrait à montré une activité contre seulement deux souches : *Trichoderma* et *Fusarium* avec des IC50 au alentour de 60µl/ml et un pouvoir faible sur *R. stolonifer* alors qu'aucun effet antifongique n'a été exercé sur *Mucor*, *Alternaria*, *A. flavus* et *Penicillium*.

Pour *C. ladaniferus*, l'extrait a montré une bonne activité c'est aussi le plus actif dont les IC50 sans considéré *Fusarium* sont compris entre environ 16µl/ml pour *Mucor* et 60µl/ml pour la moisissure *Penicillium*. Une haute activité antifongique de cet extrait a été exercée sur le *Fusarium* où la CMI a été atteinte expérimentalement.

Par ailleurs, *S. olusatrum* a montré une activité contre quatre moisissures à savoir un effet similaire essentiellement contre : *R. stolonifer* et *Trichoderma*, secondairement : *Alternaria* et *Penicillium*.

D/ Activité fongistatique/fongicide

Les huiles essentielles sont souvent fongistatiques plutôt que fongicides (**Motiejunaite et Pečiulytė, 2004**).

Aux concentrations expérimentales où aucune croissance, ni germination observée, on a testé l'activité fongistatique/fongicide. Ce test consiste à prélever le disque mycélien non germé en fin d'incubation de la boîte de pétri et à le réintroduire dans un milieu de culture neuf sans extrait naturel. Un suivi de l'évolution des cultures a été réalisé dans le temps. Ce test a été réalisé pour les huiles avec toutes les moisissures et seulement pour l'extrait de *C. ladaniferus* qui a présenté expérimentalement une inhibition totale contre *Fusarium*. Comme figurant dans le **tableau 27**, ce test a révélé une activité fongistatique observée avec l'huile essentielle de *L. stoechas*, *C. ladaniferus* et l'extrait flavonoïdique de *C. ladaniferus*.

Tableau 27: Résultat du test fongistatique / fongicide

Durée (heures)	24	48	72	96	120
Les souches					
<i>Rhizopus stolonifer</i>					
HE <i>Lavandula</i>	+	+			
HE <i>Cistus</i>	+	+			
Mucor					
HE <i>Lavandula</i>	+	+			
HE <i>Cistus</i>	-	+	+		
Trichoderma					
HE <i>Lavandula</i>	-	+	+		
HE <i>Cistus</i>	-	+	+		
Alternaria					
HE <i>Lavandula</i>	-	+	+		
HE <i>Cistus</i>	+	+			
Aspergillus flavus					
HE <i>Lavandula</i>	-	+	+		
HE <i>Cistus</i>	-	+	+		
Fusarium					
HE <i>Lavandula</i>	-	+	+		
HE <i>Cistus</i>	-	+	+		
EF. <i>Cistus</i>	-	-	-	+	+
penicillium					
HE <i>Lavandula</i>	-	+	+		
HE <i>Cistus</i>	-	-	+	+	

HE : huile essentielle

EF : flavonoïdes

+ : croissance

- : absence de croissance

III- Résultats du test du pouvoir antioxydant

En raison de l'implication des radicaux libres dans diverses pathologies, les recherches de nouvelles molécules pouvant pallier le déficit du système de défense endogène se sont largement intensifiées.

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

1) les flavonoïdes

Tous les extraits bruts flavoniques ont présenté un très bon pouvoir antioxydant **tableau : 28 (annexe)**, ce qui est confirmé par les bibliographies que les flavonoïdes d'origine naturel sont des capteurs puissants de radicaux (**Bartošíková et al., 2003 ; Heilerová et al., 2003 ; Lahouel et Fillastre, 2004 ; Panichayupakaranant et Kaewsuwan, 2004 ; Panovska et al., 2005**).

L'absorbance du DPPH mesuré à 518 nm, montre une chute rapide de cette dernière dans un intervalle très réduit de la dose de l'extrait brut. Ce qui est bien lisible dans les figures ci-dessous (**fig. 41a, 41b, 41c et d**).

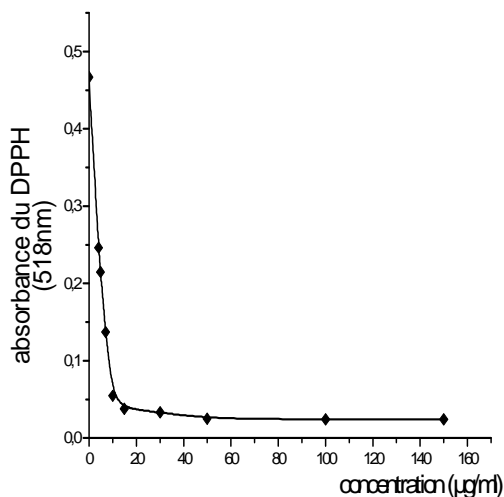


Fig. 43a: Pouvoir antioxydant de l'extrait flavonoïdique de *Lavandula stoechas*

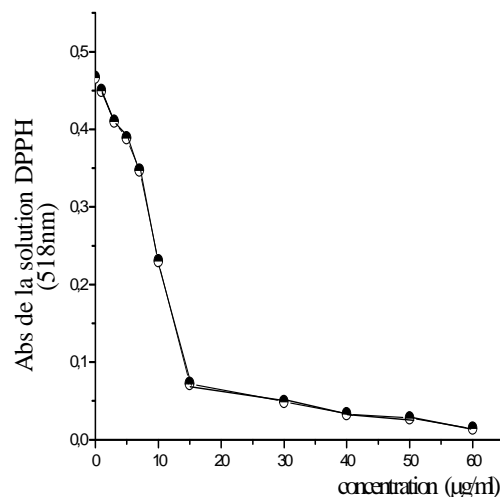


Fig. 43b: Activité antioxydante de l'extrait flavonoïdique de *Smyrniolum olusatrum*

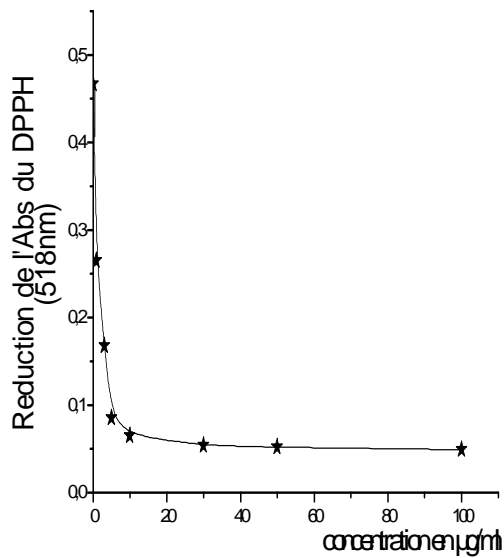


Fig.43c: Pouvoir antioxydant de l'extrait flavonoïdique de *Crataegus oxyacantha*

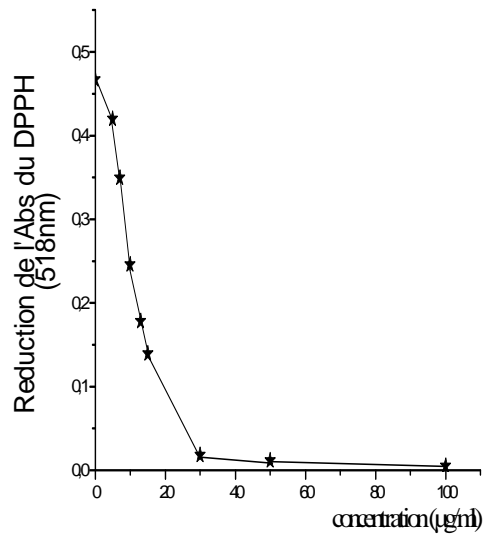


Fig.43d: Pouvoir antioxydant de l'extrait flavonoïdique de *Cistus ladaniferus*

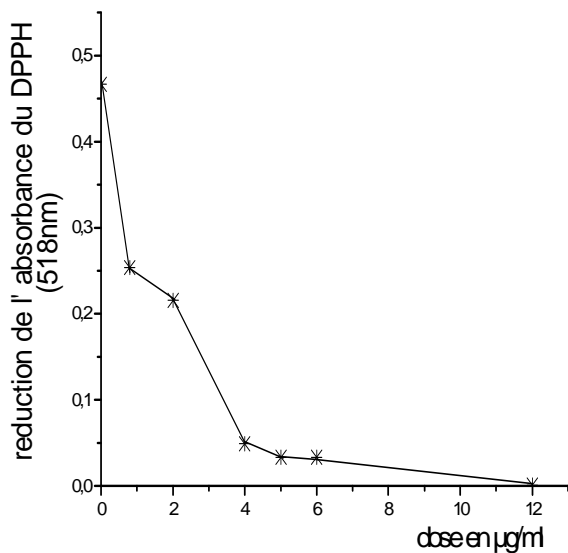


Fig.43e: Activité antioxydante du TROLOX

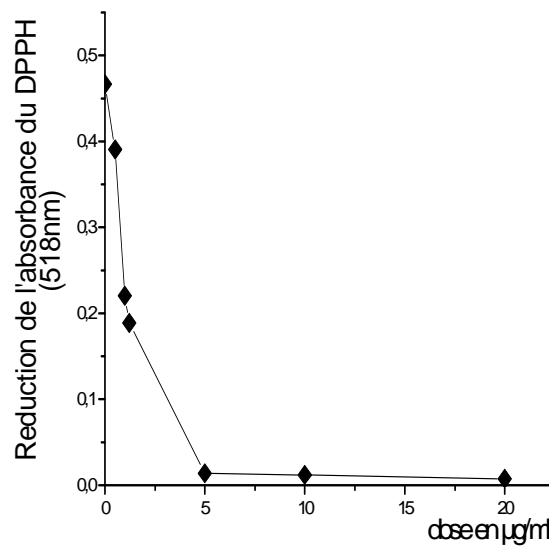


Fig.43f: Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique

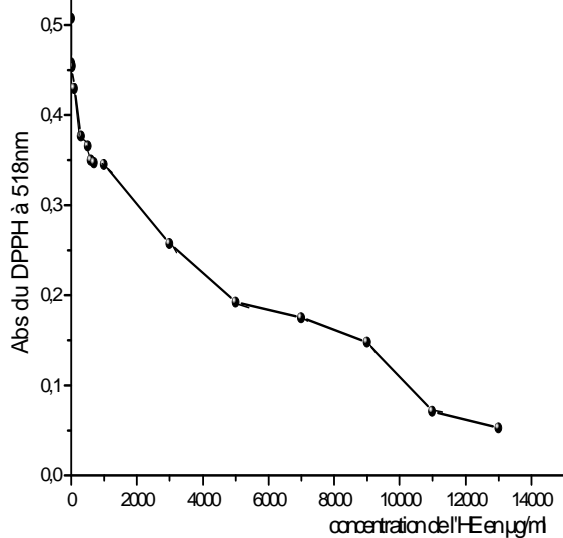


Fig.43g: Pouvoir antioxydant de l'HE de *S. olusatrum*

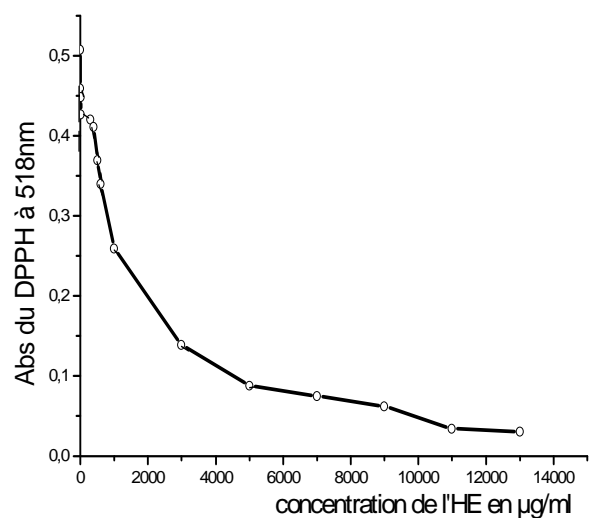


Fig.43h: Activité antioxydante de l'HE de *L. stoechas*

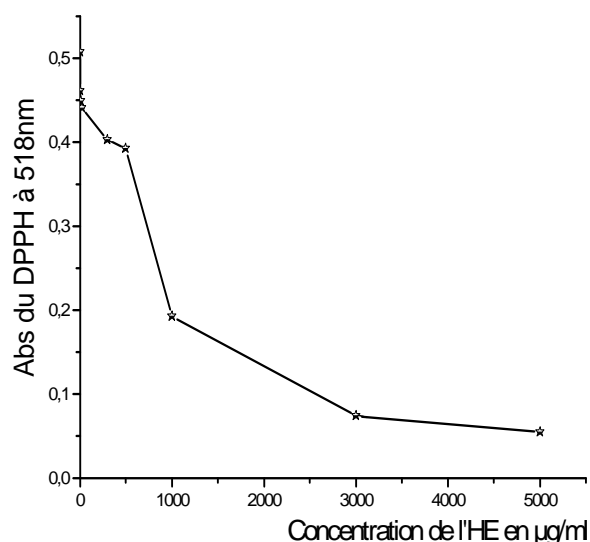


Fig. 43i: Activité antioxydante de l'HE de *C. ladaniferus*

Fig. 43: Résultat du test antioxydant au DPPH :

Les figures représentent les absorbances du DPPH résiduel en fonction de la concentration de la source de l'antioxydant (s), **a, b, c et d** : montrent une diminution importante de l'absorbance à des doses très faibles, de même pour **e et f** ; qui représentent les courbes de réduction de l'Abs avec les antioxydants standards. **g, h et i** : démontrent l'abaissement progressive de l'absorbance jusqu'à un seuil de concentration élevé où la réduction du DPPH devient considérable et qui devient plus ou moins stable ou encore varie très peu en s'éloignant de ce seuil.

L'activité antioxydante de nos extraits exprimée en EC50 (**tableau 29**), ce paramètre à été apparemment introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs et a été ensuite employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte 50% de l'activité de DPPH (couleur) (**Molyneux, 2004**). Ces EC50 sont déterminés graphiquement des trois tests séparés dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. La valeur de chaque EC50 exprime la concentration de l'extrait flavonoïdique exigée pour réduire le DPPH en solution de 50%.

Tableau 29: EC50 et puissance antioxydante (ARP) des extraits naturels et les standards

L'extrait	EC50 (µg/ml)	ARP
EF. <i>Lavandula stoechas</i>	5.29 ± 0.2766	0.19 ± 0.01041
EF. <i>Cistus ladaniferus</i>	11.42 ± 0.5819	0.09 ± 0.004583
EF. <i>Crataegus oxyacantha</i>	2.75 ± 0.3087	0.37 ± 0.04126
EF. <i>Smyrniium olusatrum</i>	9.68 ± 0.2187	0.10 ± 0.002082
HE. <i>Lavandula stoechas</i>	1852.76 ± 55.749	0.00054 ± 1.650529E-05
HE. <i>Cistus ladaniferus</i>	948.06 ± 141.27	0.0011 ± 0.0001471
HE. <i>Smyrniium olusatrum</i>	3529.54 ± 57.094	0.00028 ± 4.541244E-06
Acide ascorbique	1.04 ± 0.1361	0.97 ± 0.1361
Trolox	2.06 ± 0.1360	0.49 ± 0.03211

Comme figurant dans le tableau ci-dessus, les flavonoïdes sont des excellents antioxydants naturels, nos extraits méthanoliques des flavonoïdes possèdent des capacités de neutralisation du radical libre DPPH puissantes, puisqu'ils agissent à de faibles doses. Tous les EC50 sont très basses, comprises entre 2 et 12 µg/ml. Suivant ce paramètre, les capacités de balayage du radical sont classées dans l'ordre :

EF. *Crataegus oxyacantha* > EF. *Lavandula stoechas* > EF. *Smyrniium olusatrum* > EF. *Cistus ladaniferus*.

Nos observations sur l'activité de piéger les radicaux libres par les flavonoïdes d'origine *L. stoechas* viennent renforcer ceux observées par **Gülçin et al. (2004)** alors que d'autres auteurs parlent du pouvoir antioxydant modéré (**Chu et kemper, 2001**).

L'étude menée par **Nagai et al. (2005)** a montré que aussi les hydrolysats du pollen du Ciste comportent des composés phénoliques et qui sont dotés d'un bon pouvoir antioxydant.

2) Les huiles essentielles

Les huiles essentielles-elles aussi présentent une capacité de réduction du radical libre (**Fig. 43g, 43h et 43i**), les concentrations requises pour la neutralisation et la stabilité de 50% de la concentration du DPPH s'échelonnent entre 900 et 3 500µg/ml (**tableau 29**). La capacité antioxydante des trois huiles essentielles est dans l'ordre :

Cistus ladaniferus > *Lavandula stoechas* > *Smyrniium olusatrum*.

L'activité antioxydante des huiles essentielles peut être liée au contenu phénolique. En effet l'étude comparative sur la faculté de réduction du radical DPPH par des chemotypes différents a prouvé que les chemotypes phénoliques montrent in vitro des capacités antioxydantes plus exprimées et plus fort que les chemotypes non phénoliques (**Jukić et Miloš, 2005**).

3) Cinétique de la réaction de réduction et puissance antioxydante

La caractéristique principale d'un antioxydant est sa capacité de capter les radicaux libres. Pour se renseigner sur la vitesse de réduction du radical et la puissance d'un antioxydant, nous avons réalisé un suivi de la réaction de réduction par mesure de l'abaissement de l'absorbance dans le temps, ce qui est bien montré dans **la figure 44** . On a remarqué expérimentalement, lorsqu'on additionne un volume défini de l'extrait naturel flavonoïdique a un volume déterminé de la solution DPPH quel que soit la plante d'origine, l'absorbance du mélange diminue très rapidement vers une valeur très basse par rapport à l'absorbance de la solution uniquement constitué de DPPH et devient stable dans un laps de temps extrêmement court (**Fig. 44a**), ainsi la solution change de couleur instantanément du violet sombre au jaune pâle. Ce qui n'est pas le cas avec les huiles essentielles où la réaction de réduction nécessite un certain temps assez prolongé (**Fig. 44b**).

En une minute de l'ajout de l'extrait naturel 0.88 nmoles, 0.44 nmoles, 0.38 nmoles, 0.19 nmoles de DPPH ont été réduits par 100µg de l'extrait flavonoïdique respectivement par *L. stoechas*, *C. oxyacantha*, *C. ladaniferus* et *S. olusatrum*. En revanche le nombre de moles captés par les constituants de 100µg de l'huile essentielle était faible : 0.15 nmoles pour *L. stoechas*, 0.13 nmoles pour *C. ladaniferus* et très faible avec *S. olusatrum* (0.05 nmoles)

Par ailleurs, les extraits des standards ont enregistré les valeurs suivantes : 1.03 nmoles réduits par l'acide ascorbique et 0.55 nmoles avec le Trolox.

Après 5 minutes, le nombre de moles de DPPH piégé dans l'ordre du pouvoir antioxydant était comme suite : 1.06 nmoles (acide ascorbique), 0.99 nmoles (Trolox, extrait flavonoïdique *L. stoechas*), 0.97 nmoles (extrait flavonoïdique *C. oxyacantha*), 0.47 nmoles (extrait flavonoïdique *C. ladaniferus*), 0.29 nmoles (extrait flavonoïdique *S. olusatrum*), 0.24 nmoles (huile essentielle *L. stoechas*), 0.18 nmoles (huile essentielle *C. ladaniferus*) et seulement 0.08 nmoles (huile essentielle *S. olusatrum*).

En fonction des résultats obtenus, nous pouvons dire que les extraits flavonoïdiques possèdent le potentiel antioxydant le plus fort. Pour les huiles essentielles, l'activité antioxydante sera davantage augmentée avec le temps, c'est ainsi que le nombre de moles capté et neutralisé augmente de façon significative lorsqu'on prolonge le temps d'incubation.

Le puissant pouvoir antiradicalaire des flavonoïdes par rapport aux huiles essentielles est confirmé par comparaison des EC50, comme nous le constatons dans le **tableau 29**, les EC50 des extraits flavonoïdiques sont très bas et même dans une même plante, son extrait en flavonoïdes est doté d'un pouvoir antiradicalaire potentiellement élevé à son huile essentielle.

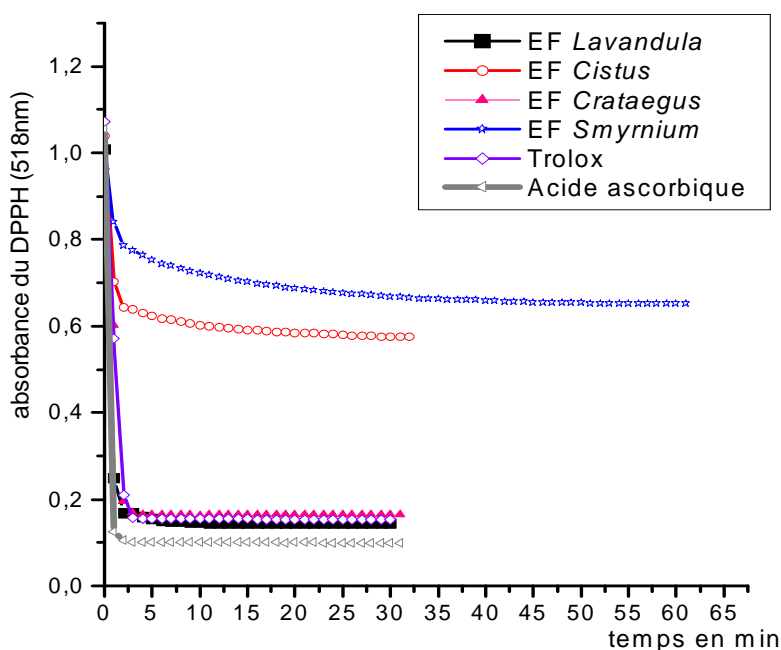


Fig. 44a: Cinétique de la réaction de réduction du DPPH extraits flavonoïdiques et standards

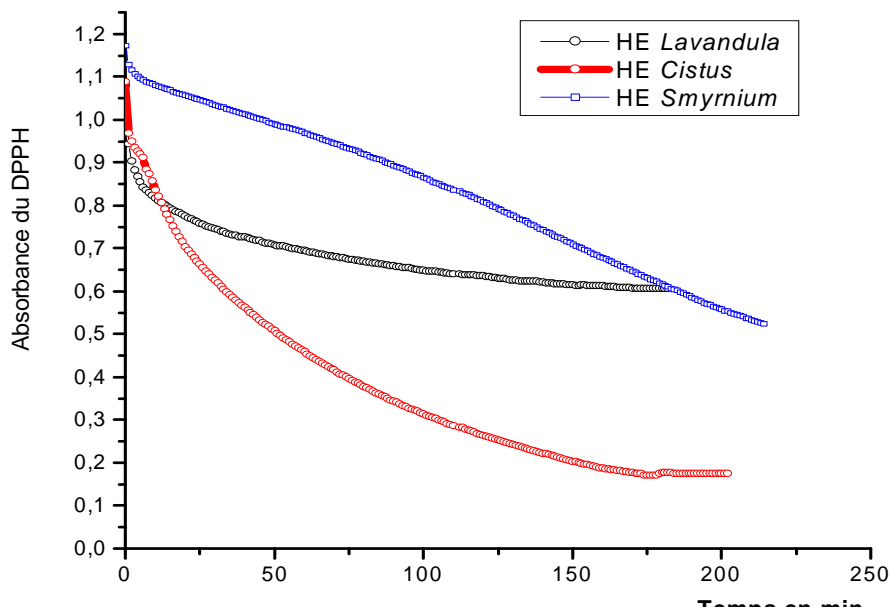


Fig. 44 : Réduction du DPPH dans le temps

Les courbes expriment la réduction d'une solution de DPPH de 3.9 ml de volume contenant 1.17nmoles de DPPH par 100 µl de la solution d'antioxydant (s) contenant 100µg de la substance(s) antioxydante(s). **a** : donne la réduction de l'absorbance du DPPH avec les extraits flavonoïdiques et les Standards par unité de temps. **b** : donne la réduction du DPPH avec les huiles essentielles en fonction du temps.

Un autre paramètre exprime la puissance antiradicalaire à été calculé à partir du premier paramètre noté : "ARP" ; égale à 1/EC50. Les valeurs ARP de tous les extraits sont significative (**tableau 29**), et plus ces valeurs ne tendent pas et s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente. On peut dire que nos extraits présentent une activité antioxydante et que la faculté de piéger le radical libre DPPH est puissante avec les extraits flavoniques et modeste avec les huiles essentielles.

4) Etude comparative de l'activité antioxydante

Selon les figures 45 (a et b) et 46 (a et b) et en comparant les résultats obtenus avec les huiles, les flavonoïdes et les standards, on classe l'activité et la puissance antioxydante suivant l'ordre :

Acide ascorbique > Trolox = E.F.*Crataegus oxyacantha* > E.F.*Lavandula stoechas* > E.F.*Smyrniolum olusatrum* > E.F. *Cistus ladaniferus* >> H.E. *Cistus ladaniferus* > H.E. *Lavandula stoechas* >> H.E. *Smyrniolum olusatrum*

Le pouvoir puissant de *C. oxyacantha* peut être expliqué par le contenu phénolique des fleurs et feuilles. En raison de la teneur élevée des flavonoïdes, en particulier les oligomères proanthocyanidines, *Crataegus* a l'activité antioxydante significative (**Rakotoarison et al., 1997**).

Nous pouvons en conclure que comme l'acide ascorbique et le Trolox, les extraits flavonoïdiques ont un très bon pouvoir antioxydant.

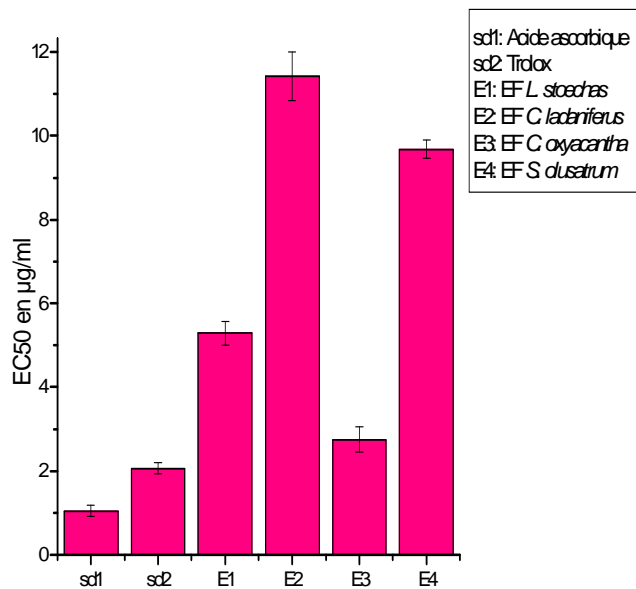


Fig. 45a: EC50 des extraits flavonoïdiques et les standards

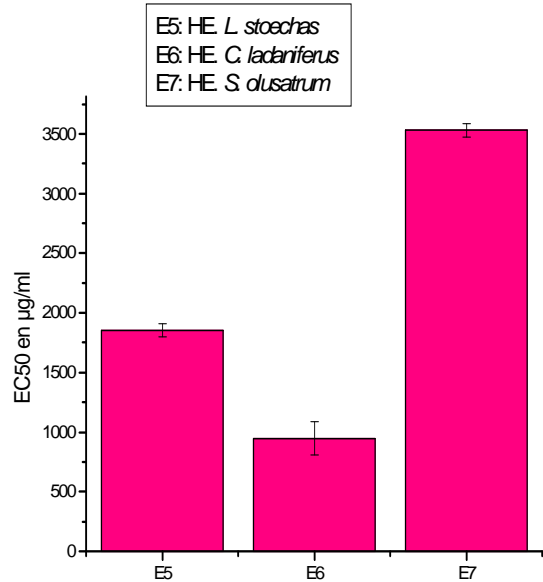


Fig. 45b: EC50 des huiles essentielles

Fig. 45: Histogrammes de comparaison

Les histogrammes a et b comparent les valeurs EC50 en µg/ml des antioxydants naturels et commerciaux. a : comporte les histogrammes des extraits flavonoïdiques avec les standards, b : comporte ce des huiles essentielles.

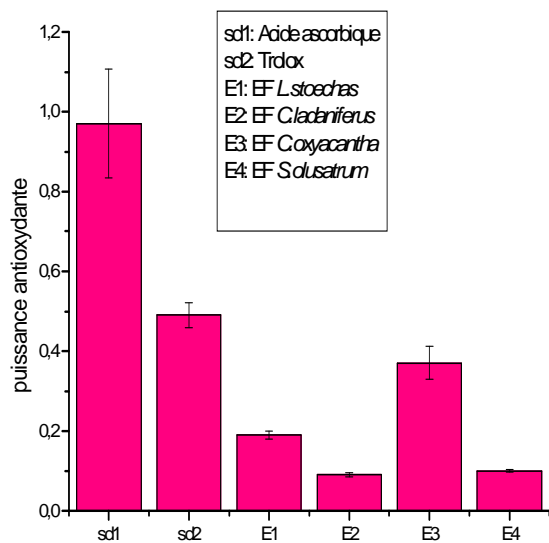


Fig. 46a: ARP des extraits flavonoïdiques et les standards

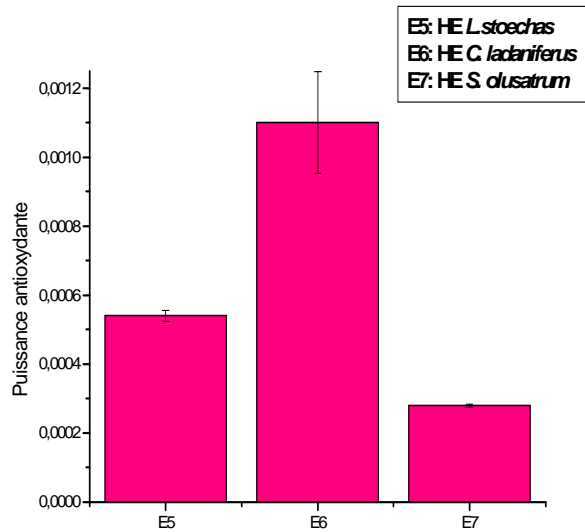


Fig. 46b: ARP des huiles essentielles

Fig. 46: Histogrammes de comparaison de la puissance antioxydante

Les histogrammes a et b comparent les valeurs ARP des antioxydants naturels et commerciaux. a : comporte les histogrammes des extraits flavonoïdiques avec les standards, b : comporte ce des huiles essentielles.

Conclusion

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs. L'étude des propriétés microbiologiques et antioxydantes a concerné quatre plantes de la région de Tlemcen sélectionnées parmi celles poussant à l'état spontané.

La détermination des rendements en huiles essentielles ont montré une rentabilité en huile volatile chez l'espèce *L. stoechas* (2.01%), alors qu'il s'affaiblit en passant de *C. ladaniferus* (0.09%), *S. olusatrum* (0.037%) à *C. oxyacantha* (extrêmement faible ; rendement tend vers le zéro).

Les résultats de l'analyse chimique de la composition des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de résonance magnétique du carbone 13 indiquent :

- Un chemotype riche en monoterpènes pour l'huile essentielle de *L. stoechas*, dominé par Fenchone / 1,8 Cinéole / Camphre.
- Une abondance d'espèces chimiques sésquiterpéniques avec un chemotype Furanodiène / Furanoélémente pour l'huile essentielle de *S. olusatrum*.

Le dosage des composés phénoliques contenus dans les quatre extraits méthanoliques a révélé des teneurs considérables en polyphénols avec des quantités appréciables en flavonoïdes chez la lavande et Aubépine. Qualitativement, les analyses effectuées par la chromatographie sur couche mince sur gel de silice avec trois systèmes solvants différents ont montré, sous UV, la présence d'une multitude de variété de ces composés dont des flavonols, des flavones et les acides phénols.

Nous avons identifié la rutine dans l'extrait des feuilles de *L. stoechas* et dans l'extrait de la partie aérienne de *S. olusatrum*. Le catéchol dans l'extrait flavonique des feuilles de *C. ladaniferus*, l'hydroquinone dans les extraits des feuilles et fleurs de *C. oxyacantha* et l'acide ferulique dans l'extrait des feuilles de *L. stoechas*.

Dans le criblage préliminaire, complété par une mesure de la densité de croissance microbienne à différentes concentrations de l'extrait naturel :

- L'huile extraite des feuilles de *L. stoechas* s'est avérée un agent antibactérien efficace contre *Klebsiella pneumoniae* (KL₁), *Proteus mirabilis* (Pr), *E. coli* (E₁) et *E coli* ATCC25922.
- L'huile essentielle de *C. ladaniferus* efficace contre *Listeria monocytogenes* (L₁₁).

- L'extrait flavonoïdique de *C. ladaniferus* efficace contre une importante variété de souches bactériennes à savoir *Salmonella typhi* (SL), *Enterobacter cloacea* (En), *Staphylococcus aureus* ATCC601 (ST₁) et *S. aureus* ATCC25923, de plus, efficace contre la levure *Candida albicans* (444).

Cependant, les huiles se sont avérées de très bon fongistatiques, alors qu'une sensibilité modéré à faible ou nulle dans certains cas, voire une stimulation de la croissance dans d'autres cas remarquée avec les flavonoïdes.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant de mener une enquête détaillée sur les fractions des extraits naturels démontrant l'activité antibactérienne et antifongique in vitro, en vue d'identifier l'espèce chimique ou les composés responsables de cette activité. Ces études devront être confirmées par un suivi in vivo.

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

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

References Bibliographiques

1. Adio A. M. (2005) Isolation and Structure Elucidation of Sesquiterpenoids from the Essential Oils of Some Liverworts (Hepaticae). Thèse pour le degré *du Dr. rer. National* à l'institut de la chimie organique, université de Hambourg. 280p.
2. AFNOR. (1992) Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles. Paris.
3. Alam S. et Mostahar S. (2005) Studies of Antimicrobial Activity of two Synthetic 2', 4', 6'-trioxygenated Flavones. *Journal of Applied Sciences* 5 (2), 327-333.
4. Allaby M. (1992) *The Concise Oxford Dictionary of Botany*, Oxford University Press.
5. Amjad Hossain M. (2005) Neem seed oil: Bangladesh. Examples of the Development of Pharmaceutical Products from Medicinal Plants. Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research (BCSIR). 10, 59-63.
6. Ammon H.P. et Handel M. (1981) *Crataegus*, toxicology and pharmacology, Part I: Toxicity. *Planta Med.* 43, 105-322.
7. Aruoma OI., Spencer JPE., Butler J. et Halliwell B. (1995) Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethylperoxyl radicals. *Free Rad. Res.* 22, 187 - 190.
8. Atawodi S.E. (2005) Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology.* 4 (2), 128-133.
9. Alibert G., Ranjeva R., et Boudet M.A. (1977) Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol. Veg.* 15, 279 - 301.
10. Atwal R. (2003) In vitro Antimicrobial Activity Assessment of Zymox Otic Solution Against a Broad Range of Microbial Organisms. *Int. J. Res. Veterinary Medicine.* Rancho Dominguez. California.
11. Bahorun T. (1997) Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Réduit.Mauritius.
12. Bahorun T, Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. et Pinkas M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung/Drug Research.* 46 II (11), 1086 - 1089.
13. Barrett P. (1996) Growing and using lavender. a Storey Country wisdom bulletin. US.
14. Bartošíková L., Nečas J., Suchý V., Kubínová R., Veselá D., Beneš L., Illek J., Šalplachta J., Florian T., Frydrych M., Klusáková J., Bartošík T., Fráňa P. et Džúrová J. (2003) Antioxidative Effects of Morine in Ischemia-Reperfusion of Kidneys in the Laboratory Rat. *Acta Vet. Brno.* 72, 87-94.

15. Basu Tapan K., Temple Norman J. et Garg Manohar L. (1999) Antioxidants in human health and disease. CAB International.
16. Belaïche P. (1979) Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome I. l'Aromathérapie. Ed. Maloine S.A. Paris.
17. Bekkara Atik F. (1999) Etude des signaux chimiques impliqués dans la symbiose entre *Vicia faba* et *Rhizobium leguminosarum*. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat d'état Es-Sciences. Option : Biologie Végétale. Faculté des Sciences.univ.ABB.Tlemcen.
18. Belghazi L., Lahlou N., Alaoui Ismaili M., Abousaouiria T., Habti N., Tantaoui Iraki A., Talbi M., Blaghen M. et Fellat-Zarrouck K. (2002) Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot. Test antifongique. Congrès de Biochimie. Casablanca. Biochimie et Santé, 38-40.
19. Belitz H. D. et Grosch W. (1999) Food chemistry. Second edition. Spriger- Verlag. Berlin Heidelberg. 992 p.
20. Benabadji S H. et al. (2004) anticarcinogenic and antioxidant activity of diindolylmethane derivatives. Acta Pharmacol Sin. 25 (5), 666-671.
21. Berthod A., Billardello B. et Geoffroy S. (1999) Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation1. Analisis. EDP Sciences, Wiley-VCH. 27, 750-757.
22. Beta T., Nam S., Dexter J. E. et Sapirstein H.D. (2005) Phenolic Content and Antioxidant Activity of Pearled Wheat and Roller-Milled Fractions. Cereal Chem. 82(4), 390-393.
23. Bidet D., Gagnault J. C., Girard P et Trotin F. (1987) Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes. L'actualité chimique. 89 - 97.
24. Bonnier G. (1990) La grande flore en couleurs. Edition Belin.
25. Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B. (2003) Étude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. GlycoScience & Nutrition. 4 (6), 7p.
26. Brouillard R., Figueiredo P., Elhabiri M. et Dangles O. (1997) Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the colour of fruits and vegetables. p. 30 - 49. In: Phytochemistry of fruit and vegetables Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Oxford, UK: Clarendon Press.
27. Brownlee H. E., Hedger J. et Scott I. M. (1992) Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. Phys. Mol. Plant Pathol. 40, 227 - 232.
28. Bruneton J. (1993) Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Paris, France : Lavoisier. 278-279.
29. Bruneton J. (1995) Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Paris, Lavoisier.

30. Bruneton J. (1999) Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3ème éd.). Paris: Editions médicales internationales. Editions Tec & Doc Lavoisier. 1120p.
31. Burnichon N. et Texier A. (2003) l'antibiogramme : la détermination des sensibilités au antibiotiques. DES bactériologies.
32. Burton G. W., Traber M.G., Acuff R.V. et al. (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.
33. Caillard J. (2003) Les plantes, des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires. CRDP Midi-Pyrénées. 6p.
34. Cakatay U., Telci A., Kayali R. et al. (2000) Effect of α -lipoic acid supplementation on oxidative protein damage in the streptozotocin-diabetic rat. *Res Exp Med.* 199, 243-251.
35. Caree P. (1953) précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Ed. Ballière JB. et fils.
36. Carty J. L., Bevan R., Waller H. et al. (2000) The effects of vitamin C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. *Biochem Biophys. Res Com.* 273, 729-735.
37. Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L et Lin J-K. (2004) Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. *eCAM.* 1(2), 175-185.
38. Chevallier A. (1996) Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersley Pty Limited, St Leonards, NSW.
39. Chu C. J. et Kemper K. J. (2001) *Lavender (Lavandula spp.)*. Longwood Herbal Task Force. 32p.
40. Cowan M. M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12 (4), 564-582.
41. Cuvelier M-E., Berset C. et Richard H. (1990) Use of a new test for determining comparative antioxidant activity of BHA, BHT, α - and γ -tocopherols and extracts from rosemary and sage. *Sci. Aliments.* 10, 797-806.
42. Cuvelier M-E., Richard H. et Berset C. (1992) Comparaison of antioxidant activity of some acid phenols: structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 324-325.
43. Cuvelier M-E., Richard H. et Berset C. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J.am.oil Chem. Soc.* 73, 645-652.
44. Das H. C., Wang J. H et Lien E. J. (1994) Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids : A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. p. 133 – 136. In : Jucker E ed. *Progress in Drug Research* . Basel : Birkhauser Verlag. Das H. C. et

- Weaver G. M. 1972. Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances. *J. Chromatogr.* 67, 105 – 111.
45. Dastidar S. G., Manna A., Kumar K A., Mazumdar K., Dutta N.K., Chakrabatary A.N., Motohashi N. et Shirataki Y. (2004) Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 23, 99-102.
 46. Davies J. R. (2000) Hawthorn. Element Books Limited, Boston, MA.
 47. Delaveau P. (1987) Les Epices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Albin Michel Editeur. 372 p.
 48. Demetzos C., Mitakus., Loukis A. and Harvala C. (1994) A new Drimane Sesquiterpene, Isomers of manoyl oxid and other volatile constituents from the resin "Ladano" of *Cistus incanus subsp Creticus* (L) Heywood. *J. Essential oil Res.* 6, 37-41.
 49. De Oliveira M. M., Sampaio M. R. P., Simon F., Gibert B. et Mors W. B. (1972) Antitumor activity of condensed flavenols. *An. Acad. Brasil.* 44, 41 - 44.
 50. De Pascual J. T., Bellido I. S., Basabe P., Marcos I. S., Ruano I. F. et Urones J. G. (1982) Labdane diterpenoids from *Cistus ladaniferus*. *Phytochemistry.* 21 (4), 899-901.
 51. Devienne Karina F. et Raddi Maria Stella G. (2002) Screening for Antimicrobial Activity of Natural Products Using a Microplate Photometer. *Braz. J. Microbiol.* 33 (2). São Paulo.
 52. Didry N., Pinkas M. et Torck M. (1982) Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de *grindelia*. *Pl. Med. Phytother.* XVI, 7 - 15.
 53. Dubey V. S, Bhalla R. et Luthra R. (2003) An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J. Biosci.* 28 (5), 637-646.
 54. Dubois G. E., Grosby G.A. et Saffron P. (1977) Non nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. *Science.* 195, 397 - 399.
 55. Dudareva N., Andersson S., Orlova I., Gatto N., Reichelt M., Rhodes D., Boland W. et Gershenzon J. (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. Ed. Rodney B. Croteau, Washington State University, Pullman, WA. *PNAS.* 102 (3), 933-938.
 56. Dweck A. C. (2002) Herbal Medicine for the Skin. Their Chemistry and Effects on Skin and Mucous Membranes. *Personal Care Magazine.* 3(2), 19-21.
 57. Ericsson H.M.A. et Sherris J.C. (1971) Antibiotic sensitivity testing. Report of an International Collaborative Study. *Acta path Microbiol Scand. B Suppl.* 217, 90.
 58. Esiyok D. et al. (2004) Herbs as a Food Source in Turkey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 5, 334-339.

59. European pharmacopoeia. (1999). 3rd ed. Suppl. 2000. Strasbourg, Council of Europe.
60. Farombi E. O. (2003) African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *African Journal of Biotechnology*. 2 (12), 662-671.
61. Fernandez M. (2003) de Quelques Plantes dites Medicinales et de leur Fonctions. Editions Aenigma. 63p.
62. Ferreres F., Barberan F. A. T. et Tomas F. (1986) Flavonoids From *Lavandula dentata*. *Fitoterapia*. 57, 199-200.
63. 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.
64. Fleuriet A. et Macheix J. J. (1977) Effet des blessures sur les composés phénoliques des fruits de tomates " cerises " (*Lycopersicon esculentum var cerasiforme*). *Phys. Veg.* 15, 239 - 250.
65. Fong Harry H.S. et Bauman J. L. (2002) Hawthorn. *Journal of Cardiovascular Nursing*. 16 (4) , 1-8.
66. Fouché J. G., Marquet A. et Hambuckers A. (2000) Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. *Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman*.
67. Garcia Vallejo M. C., Garcia Vallejo I. et Valasco Negueruela A. (1989) Essential Oils of Genus *Lavandula* L. in Spain 11TH International Congress of Essential Oils. *Fragrance and Flavours*. New Delhi. 4, 15-26.
68. Gazi M. R., Kanda K. et Kato F. (2004) Optimisation of Various Cultural Conditions on Growth and Antioxidant Activity Generation by *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2373. *Journal of Biological Sciences*. 4 (2), 224-228.
69. Georgetti S. R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS. Et Fonseca Maria. JV. (2003) Evaluation of the Antioxidant Activity of Different Flavonoids by the Chemiluminescence Method. *AAPS PharmSci*. 5 (2), 5p.
70. Gören A. C., Topçu G., Bilsela G., Bilsela M., Aydoğmuş Z. et Pezzuto J. M. (2002) The Chemical Constituents and Biological Activity of Essential Oil of *Lavandula stoechas* ssp. *Stoechas*. *Z. Naturforsch.* 57c, 797-800.
71. Grieve M. (1931). *A Modern Herbal: The Medicinal, Culinary, Cosmetic and Economic Properties, Cultivation and Folklore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs and Trees with All Their Modern Scientific Uses*. Jonathan Cape Limited, London.
72. Gruenwald J. et al. (1998) *PDR for Herbal Medicines*. 1st ed. Montvale, MJ. Medical Economics Company. Inc.

73. Guérin-Faublée V. et Carret G. (1999) L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GTV-INRA. 5-12.
74. Gülçin İ., Uğuz M. T., Oktay M., Beydemir Ş. et Küfrevioğlu Ö. İ. (2004) Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.). Turk J Agric. 28, 25-33.
75. Hadi M. (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro- oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur Domaine : Pharmacochimie. 155p.
76. Hale A. L. (2003) Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Office of Graduate Studies of Texas A&M University. Genetics. 260p.
77. Halliwell B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutr. Rev. 52, 253-265.
78. Harborne JB. (1989) Methods in plant biochemistry, I: Plant phenolics. Academic Press, London,UK.
79. Harikrishna D., Appa Rao A. V. N. et Prabhakar M. C. (2004) Pharmacological investigation of prunin-6"-O-p-coumarate: A flavonoid glycoside. Indian J Pharmacol. 36 (4), 244-250.
80. Hatanaka A., Kajiwara T. et Sekiya J. (1987) Biosynthesis pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. Chem Phys Lipids. 44, 341–361.
81. Hayase F. et Kato M. (1984) Antioxidant compounds of sweet potatoes. J. Nutri. Sci. Vitaminol. 30, 37 - 46.
82. Hegarty V.M. et al. (2000) "Tea Drinking and Bone Mineral Density in Older Women." Am J Clin Nutr. 71(4 1), 3-7.
83. Heilerová L., Bučková M., Tarapčík P., Šilhár S. et Labuda J. (2003) Comparison of Antioxidative Activity Data for Aqueous Extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*Origanum vulgare* L.), Thyme (*Thymus vulgaris* L.), and Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by Conventional Methods and the DNA-Based Biosensor. Czech J. Food Sci. 21 (2), 78–84.
84. Holetz F. B., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B. P., Garcia Cortez D. A., Palazzo Mello J. C. et Vataru Nakamura C. (2002) Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivated in defined medium. Maringá. 24 (3), 657-662.
85. Hosein S. R., et Lytle M. (2001) Les Antioxydants. Traducteur : Alain Boutilier. Catie Feuillet d'information. 5p.

86. Huang D-J., Lin C-D, Chen H-J. et Lin Y-H. (2004) Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents Bot. Bull. Acad. Sin. 45, 179-186.
87. Inouye S., Tsuruoka T., Uchida K. et Yamaguchi H. (2001) Effect of Sealing and Tween 80 on the Antifungal Susceptibility Testing of Essential Oils. Microbiol. Immunol. 45 (3), 201-208.
88. Janot M-M. (1965).Précis de botanique. Tome II. Edition masson. P. 131.
89. Joffin J-N. et Leyral G. (2001) Microbiologie Technique. 1 Dictionnaire des techniques. Collection Biological Technique. 3^e edition. CNDP. 312p.
90. Jukić M. et Miloš M. (2005) Catalytic Oxidation and Antioxidant Properties of Thyme Essential Oils (*Thymus vulgarae* L.). Croatica Chemica Acta. 78 (1), 105-110.
91. Julve P. (2004) écologique et chorologique de la flore de France. Baseflor. Index botanique.version :23.
92. Kahler W. et al. (1993) "Diabetes Mellitus—A Free Radical- Associated Disease. Results of Adjuvant Antioxidant Supplementation." Z Gesamte Inn Med. 48(5), 223-32.
93. Kaid Slimane I. L. (2004) contribution à l'étude de la composition chimique et du pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* de la région de Tlemcen. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Biologie. Option : Contrôle de Qualité et Analyse. Faculté des Sciences.univ.ABB.Tlemcen.
94. Kalpoutzakis E., Aligiannis N., Mitaku S., Chinou I., Harvala C. et Skaltsounis A.L.(2001) New semisynthetic antimicrobial Labdane. Type diterpenoids derived from the resin"Ladano" of *Cistus creticus*. Z.Naturforsch.56 C, 49-52.
95. Karumi Y., Onyeyili P.A. et Ogugbuaja V.O. (2004) Identification of Active Principles of *M. balsamia* (Balsam Apple) Leaf Extract. J. Med. Sci. 4 (3), 179-182.
96. Khallil Abdel-Raouk M. (2001) Phytofungitoxic Properties in the Aqueous Extracts of Some Plants. Pakistan Journal of Biological Sciences. 4 (4), 392-394.
97. Koenigs R. et Guelz P.G (1974) Monoterpenes in the essential leaf oil of *Cistus ladaniferus*. Z. Pflanzenphysiol. 72, 237-248.
98. Kokkalou E. (1988) The Constituents of the essential oil from *Lavandula stoechas* growing wild in Greece. Planta Med. 54, 58-59.
99. Kreofsky T., Schlager J. W., Vuk-Pavlovic Z., Abraham R. T. et Rohrbach M. S. 1992. Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages. Am. J. Resir. Cell. Mol. Biol. 7, 172 - 181.
- 100.Krippeit-Drews P., LANG F., Haussinger D. et Drews G. (1994) H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. Pflugers Arch. 426, 552 - 554.

101. Lafont R. (2002) Méthodes Physiques de Séparation et d'Analyse et Méthodes de Dosage des Biomolécules. Biologie et Multimédia.
102. Lahlou M. (2004) Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytother. Res.* 18, 435-448.
103. Lahouel M. & Fillastre J-P. (2004) Role of flavonoids in the prevention of haematotoxicity due to chemotherapeutic agents. *Haema.* 7(3), 313-320.
104. Lamaison J.L.C. et Carnet A. (1990). Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegus monogyna Jacq* et de *Crataegus laevigata (Poiret D. C)* en fonction de la vegetation. *Pharm. Acta. Helv.* 65, 315-320.
105. Lamarti A., Badoc A., Deffieux G. et Carde J. P. (1994) Biogénèse des Monoterpènes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 133, 69 –118.
106. Laverdière F., Holstein A., Thiebaut L., Mallee R., Gravejat G. et Desclozeaux B. (1999) Les Principales Methodes D'analyse. Dossier Couplage. Centre Sciences des Processus Industriels et Naturels (SPIN). 51p.
107. Lawrence B.M. (1996) Progress in essential oils. *Perfumer & Flavorist* 21, 55-68.
108. Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. et Lee C. Y. (2003) Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7292-7295
109. Leitão G. G., Leitão S. G. et Vilegas W. (2002) Quick Preparative Separation of Natural Naphthopyranones with Antioxidant Activity by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Z. Naturforsch.* 57c, 1051-1055.
110. Lopes N., Kato M. J., Andrade Eloisa H-A., Maia J. G. S., Yoshida M., Planchart A. R. et Katzin A. M. (1999). Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. *Journal of Ethnopharmacology.* 67, 313–319.
111. Lugasi A., Hóvári J., Sági K. V. et Bíró L. (2003) The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis.* 47(1-4), 119-125.
112. Lyons L. et Nambiar D. (2005) Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH. CATIE. 60p.
113. Mabry T. J et Ulubelen A. (1980) Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.* 28, 188 - 196.
114. Maganga A. (2004) Influence of Variety and Organic Cultural Practices on Yield and Essential Oil Content of Lavender and Rosemary in Interior BC. (STOPA). *Ecorational Technologies.* Kamloops. BC.23p.

115. Marfak A. (2003) Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de leur Réactivité avec les Radicaux Issus des Alcools : Formation de Depsides. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges. Spécialité : Biophysique. 187p.
116. Mariotti J.P., Tomi F., Casanova J., Costa J. et Bernardini A. F. (1997) Composition of the Essential oil of *Cistus ladaniferus* L. Cultivated in Corsica (France). Flavour and Fragrance Journal. 12, 147-151.
117. Markham K. R. (1982) Techniques of Flavonoid identification. Biological Techniques Series. Ed. Treherne J. E. et Rubery P. H. Academic Press. 113p
118. Masquelier J., Dumon M. C. et Dumas J. (1979) Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. Acta therapeutique. 1, 101 - 104.
119. Mastelic J.M. et Kustrak D. (1997) Essential oil and glycosidically bound volatiles in aromatic plants: I. *Lavandin* (*Lavandula hybrida reverchon*). Acta Pharmaceutica. 47, 133-138.
120. Mathon C.C. (1986) Potagères autrefois répandues et aujourd'hui disparues. Suggestions pour une typologie. JATBA, 121-126.
121. Maydani M^a. (2000) Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. Am J Clin Nutr. 71(suppl), 1665S-1668S.
122. Maydani M^b. (2000) Vitamin E and prevention of heart disease in high-risk patients. Nutr Rev. 58, 278-281.
123. Mcanlis G. T., Mceneny J., Pearse J. et Young I.S. (1998) Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification. Eur. J. Clin Nutr. 52, 202-206.
124. McGuffin M., Hobbs C., Upton R. et Goldberg. A. (1997) Botanical Safety Handbook. New York: CRC Press. 37.
125. Medić- Šarić M., Jasprića I., Smolčić-Bubalo A. et Mornar A. (2004) Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. Croatica Chemica Acta. 77 (1-2), 361-366.
126. Mendoza L., Tapia L., Wilkens M. et Urzua A. (2002) Antibacterial Activity of 13-Epi-Sclareol, Alabdane Type Diterpene Isolated from *Pseudognaphalium heterotrichum* and *P. Cheiranthifolium* (Asteraceae). Bol.Soc.Chil.Quím. 47 (2), 91-98.
127. Mensor L. L., Menezes F. S., Leitão G. G., Reis A. S., Santos T. C., Coube C. S. et Leitão S. G. (2001) Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. Phytother. Res. 15, 127-130.
128. Mergaert P., Vaubert D., Györgyey J., Jahni G., Maunoury N., Chaparro Egaña C., Villarreal R., Kelemen Z., Kelemen K., Vinardell J-M., Kondorosi A. et Kondorosi E.

- (2001) Utilisations d'arrays d'ADNc pour l'étude du développement des nodosités symbiotiques chez *Medicago truncatula*. Ecole thématique Biologie végétale. 7p.
129. Meyer A.S., Yi O.S., person D.A. et al. (1997) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes. *J. Agricult Food Chem.* 45, 1638-1643.
 130. Mishra A. K. et Dubey N. K. (1994) Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (4), 1101-1105.
 131. Misirli A., Küden A., Demir G. et Gülcan R. (2001) Determination of phenolic compounds in some almond hybrids varying in resistance to *Pseudomonas amygdali*. In: Ak B.E. (ed.). 11 GREMPA Seminar on pistachios and almonds = 11ème Colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier. Zaragoza. CIHEAM-IAMZ. P.71-86.
 132. Mölleken U., Sinnwell V. et Kubeczka K-H. (1998) Essential Oil Composition of *Smyrniolum olusatrum*. *Phytochemistry*. 49 (6), 1709-1714.
 133. Molyneux P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarini J. Sci. Technol.* 26 (2), 211-219.
 134. Morel Y. et Barouki R. (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* 342 (3), 481-496.
 135. Motiejūnaitė O. et Pečiulytė D. (2004) Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality. *Medicina (Kaunas)*. 40 (4), 787-794.
 136. Mrabet N., Lahlou H. et Benjilali B. (1999) Effect of Moroccan *Cistus ladaniferus* L. (rockrose) extracts on the growth of four fungi. *Cryptogamie Mycologie*. 20 (1), 23-33.
 137. Murtaza N., Mirza M. Yaqeen Z. et Badar Y. (1994) Studies on antibacterial activity of *Nelumbium speciosum* Wild seed oil extracts. *PJSIR*. 37, 269-272.
 138. Nagai T., Inoue R., Suzuki N., Myoda T. et Nagashima T. (2005) Antioxidative ability in a linoleic acid oxidation system and scavenging abilities against active oxygen species of enzymatic hydrolysates from pollen *Cistus ladaniferus*. *International Journal of Molecular Medicine*. 15, 259-263.
 139. Nakagawa K., Kawagoe M., Yoshimura M., Arata H., Minamikawa T., Nakamura M. et Matsumoto A. (2000) Differential Effects of Flavonoid Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and Lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fractions of Mice. *Journal of Health Science*. 46(6), 509-512.
 140. Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. (2001) Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33, 2-16.
 141. Naves Y.R. (1974) Technologie et chimie des parfums naturels, Essences concrètes, Résinoïdes, Huiles et pommades aux fleurs. Editeurs Masson & Cie, Paris.

142. Nemezc G. (2001) Hawthorn. Communication January/February. P. 10-13.
143. Nitsch J. P et Nitsch C. 1961. Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. Bull. Soc. Fr. 26, 2237 – 2240.
144. Nostro A., Germanò M. p., D'Angelo V., Marino A. et Cannatelli M.a. (2000) Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lettres en microbiologie appliquée. 30 (5), p379.
145. Novelli G. P. (1997) Role of free radicals in septic shock. J Physiol Pharmacol. 48, 517-527.
146. Ohran H., Marol S., Hepsen I.F. et Sahin G. Effects of some probable antioxidants on selenite-induced cataract formation and oxidative stress-related parameters in rats. Toxicology. 139, 219-232.
147. Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M. et Takahara Y. (1993) Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. Phytochem. 33, 557 – 561.
148. Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatano T., Okuda H. et Arichi S. (1983) Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver. Chem. Pharm. Bull. 31, 1625 - 1631.
149. Packer L. et al. (1995) “Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant.” Free Radical Biology and Medicine. 19, 227-250.
150. Panda K., Chattopadhyay R., Fhosh M. K. et al. (1999) Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. Free Radicals Biol Med. 27, 1064-1079.
151. Panichayupakaranant P. et Kaewsuwan S. (2004) Bioassay-guided isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata* L. leaves. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26(1), 103-107.
152. Panovska K.T., Kulevanova S. et Stefova M. (2005) *In vitro* antioxidant activity of some *Teucrium* species (*Lamiaceae*). Acta Pharm. 55, 207–214.
153. « PARFUM – L’EXPO ». (2002) Le monde magique du parfum. Une exposition proposée par le Comité Français du Parfum. Fondation Claude Verdan.
154. Pedneault K., Léonhart S., Angers P., Gosselin A., Ramputh A., Arnason J. T. et Dorais M. (2001) Influence de la Culture Hydroponique de Quelques Plantes Médicinales sur la Croissance et la Concentration en Composés Secondaires des Organes Végétaux. Texte de conférence - 5ième Colloque sur les produits naturels d'origine végétale. Université Laval, Qc, Canada. 2p.

155. Pieroni A., Janiak V., Dürr C. M., Lüdeke S., Trachsel E. et Heinrich M. (2002) In vitro Antioxidant Activity of Non-cultivated Vegetables of Ethnic Albanians in Southern Italy. *Phytother. Res.* 16, 467–473.
156. Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J. O. (1998) Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *MS.* 73.
157. Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J. O. (1999) L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumon.* 4 (5).
158. Pizarro C. M. (1966) Sinopsis de la Flora Chilena. Santiago, Ediciones de la Universidad de Chile.
159. Ponponio R., Gotti R., Gotti R., Alfredo Santagati N. and Cavrini V. (2003) Analysis of catechins in extract of *cistus* species by microemulsion electro kinetic chromatography. *Journal of chromatography A.* 990, 215-223.
160. Porter N. (2001) Essential oils and their production. *Crop & Food Research.* Number 39.
161. Psotová J., Lasovský J. et Vičar J. (2003) Metal-Chelating Properties, Electrochemical Behavior, Scavenging And Cytoprotective Activities Of Six Natural Phenolics. *Biomed. Papers* 147(2), 147–153.
162. Quezel P. et Santa S. (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. C.N.R.S. Paris.
163. Rahman M. et Gul S. (2002) Antibacterial Activity of Hydrodistilled Essential Oil of *Psammogeton canescens* N.O. Umbelliferae. *Biotechnology,* 1 (1), 55-60.
164. Rai M. K., Acharya D. et Wadegaonkar P. (2003) Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, In: *Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects,* Haworth press, N-York, London, Oxford. 165-185.
165. Rajendran S., Deepalakshmi P. D., Parasakthy K., Devaraj H. et Niranjali Devaraj S. (1996) Effect of tincture of *Crataegus* on the LDL-receptor activity of hepatic plasma membrane of rats fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis.* 123 (1-2), 235-241.
166. Rakotoarison D. A., Gressier B., Trotin F. et al. (1997) Antioxidant activities of polyphenolic extracts from flowers, in vitro callus and cell suspension cultures of *Crataegus monogyna*. *Pharmazie.* 52, 60-64.
167. Ravn H., Andary C., Kovacs G. et Molgaard P. (1984) Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochem. Syst. Ecol.* 17, 175 - 184.
168. Rees S. B. et Harborne J. B. (1985) The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochem.* 24, 2225 – 2231.
169. Richard H. et Multon J.L. (1992) Les arômes alimentaires. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 438 p.

170. Ristorcelli D., Tomi F. et Casanova J. (1998) ^{13}C -NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas*. Flavour Fragr. J. 13, 154-158.
171. Rose J. et Treadway S. (1999). Herbal Support for a Healthy Cardiovascular System. Adv. Nutrition Pub. Inc. 6 (16), 6p.
172. Sarkar A., Bishayee M. et 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.
173. Schnaubelt K. (1998) Advanced Aromatherapy. Vermont: Healing Arts Press.
174. Schwämmle B., Winkelhausen E., Kuzmanova S. et Steiner W. (2001) Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms. Biotechnol. 39 (4), 341-345.
175. Scientific Correspondence. (2003) Broad spectrum antimycotic drug for the treatment of ringworm infection in human beings. 85 (1), 30-34.
176. Serafini M., Laranjinha J.A, Almeida L.M, Maiani G. (2000) Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. J Nutr Biochem, 11, 585-590.
177. Sharma S., Sangwan N. S. et Sangwan R. S. (2003) Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. Current Science. 84 (4-25), 544-550.
178. Sidi Boulenouar K. et Ziane A. (2003) Etude phytochimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. et *Lavandula stoechas* L. de la région de Tlemcen. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études supérieur en biologie. Option : Biochimie. Faculté des Sciences.univ.ABB.Tlemcen.
179. Simpson William T. (1999) Drying and Control of Moisture Content and Dimensional Changes. Gen. Tech. Rep. FPL-GTR-113. Madison, Forest Products Laboratory. 463 p.
180. Singleton V. L., Ortofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. In: Packer L. (ed). Methods in Enzymology. Orlando. Academic Press. 152-178.
181. Skoula M., Abidi C. et Kokkalou E. (1996) Essential oil variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in crete (Greece). Biochemical Systematics and Ecology. 24 (3), 255-260.
182. Smallfield B. (2001) Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research. Number 45, 4p.
183. Sousa EMBD., Chiavone-Filho O., Moreno M.T., Silva D.N., Marques M.O.M. et Meireles M.A.A. (2002) Experimental Results for the Extraction of Essential Oil From *Lippia sidoides* Cham. Using Pressurized Carbon Dioxide. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 19 (02), 229-241.

184. Souza Lúcia K. H., De Olivera Cecília M. A., Ferri Pedro H., De Olivera Júnior J. G., De Souza Júnior A. H., De Fátima O., Fernandes L. et Silva Maria do Rosario R. (2003) Antimicrobial Activity of *Hyptis ovalifolia* Towards Dermatophytes. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 98 (7), 963-965.
185. Stavric B. et Matula T. I. (1992) Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health. p. 274 - 294. In : ONG ASH et Packer L eds. Lipid soluble and antioxidants: Biochemistry and clinical applications. Basel : Birkhauser Verlag.
186. Stefanovits-Bányai É., Tulok M. H., Hegedűs A., Renner C. et Varga I. S. (2003) Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) clones. Acta Biologica Szegediensis. 47 (1-4), 111-113.
187. Subrahmanyam M., Hemmady A. et Pawar S.G. (2001) Antibacterial Activity Of Honey On Bacteria Isolated From Wounds. Annals of Burns and Fire Disasters. XIV (I)
188. Sun J., Khtan B., Huang S-H., Whiteman M. et Zhu Y-Z. (2002) Effects of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. Acta Pharmaco. 23 (12), 1142 -1151.
189. Svedström U., Vuorela H., Kostianen R. Tuominen J., Kokkonen J., Rauha J-P., Laakso I. et Hiltunen R. (2002) Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. Phytochemistry. 60 (8), 821-825.
190. Svoboda K.P. et Hampson J.B. (1999) Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
191. Takeoka G. (1998) Flavor chemistry of vegetables. In Flavor chemistry. Thirty years of progress. Teranishi R. et al. (Ed.). Cluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 287-304.
192. Talavera S., Gibbs PE. et Herrera J. (1993) Reproductive biology of *Cistus ladaniferus* (Cistaceae). Plant Syst. and Evol. 186, 123-134.
193. Teixeira da Silva J-A. (2004) Mining the essential oils of the Anthemideae. African Journal of Biotechnology. 3 (12), 706-720.
194. Thanos C. A., Georghiou K., Kadis C. et Pantazi C. (1992) Cistaceae: A Plant Family With Hard Seeds. Isr. Journal of Botany. 41, 251-263.
195. Tutin T.G. (1976) Flora Europea. Cambridge, Cambridge University Press. Vol 4.
196. Twidwell E. K., Wagner J. J. et Thiex Nancy J. (2002) Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages. ExEx 8077. p2.

197. Upson T. M., Grayer R. J., Greenham J. R., Williams C. A., Al-Ghamdi F. et Chen F-H. (2000) Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28, 991-1007.
198. Vansant G. (2004) Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.
199. Veličković Dragant T., Randjelović Novica V., Ristić Mihailo S., Veličković Ana S. et Šmelcerović Andrija A. (2003) Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. *J.Serb.Chem.Soc.* 68 (1), 17–24.
200. Veluri R., Weir Tiffany L., Bais Harsh P., Stermitz Frank R., et Vivanco Jorge M. (2004) Phytotoxic and Antimicrobial Activities of Catechin Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1077-1082.
201. Vergé S., Soulet S., Lacan F., Mas T., Arnaudinaud V., Nay B., Castagnino C., Delaunay J.C., Chèze C., Monti J.P., Deffieux G., Mérillon J.M., Nuhlich A. et Vercauteren J. (1999) Les Polyphénols du Vin : de La Chimie Pour La Vie. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 138, 75-90.
202. Wang J. et Mazza G. (2002) Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4183-4189.
203. Wang S-Y., Wu J-H., Shyur L-F., Kuo Y-H. et Chang S-T. (2002) Antioxidant Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. *Holzforschung*. 56 (5).
204. Wichtl M. et Anton R. (1999) Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Edition Tec et Doc E M urter, 3^{ème} édition.
205. Wiesenfeld E. (1999) Aroma Profiles of Various *Lavandula* Species. SIS: Scientific Instrument Services.
206. Wilson C. L., Solar J. M., El Ghaouth A. et Wisniewski M. E. (1997) Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81, 204-210.
207. Yrjönen T. (2004) Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Conference Room 513 at Viikki Infocentre (Viikinkaari 11), Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. 64p.
208. Zapatero J. M. (1999) Selections from current literature: effects of Hawthorn on the cardiovascular system. *Family Practice*. 16 (5), 534-538.
209. Zhu Q. Y., Hackman R. M., Ensunsa J. L., Holt R. R. et Keen C. L. (2002) Antioxidative Activities of Oolong Tea. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6929-6934.

Annexes

Tous les résultats de chaque test sont exprimés par la moyenne de trois répétitions (n=3)
Chaque moyenne est représentée par la (Moyenne \pm SD)
SD : écart type

**Tableau A1: Teneur en eau de différentes plantes
(g/100g de plante sèche « % »)**

La plante	Humidité en %
<i>L. stoechas Oum el alou</i> (Automne)	52.50 \pm 0.7071
<i>C. ladaniferus</i> (Automne)	52.03 \pm 0.02828
<i>C. oxyacantha</i> (Printemps)	66.2 \pm 0.1000
<i>S. olusatrum</i> (Printemps)	81.8 \pm 0.2000

**Tableau A2 : Rendement en huile essentielle des différentes plantes
(g/100g de plante sèche « % »)**

La plante	Rendement en %
<i>L. stoechas Oum el alou</i> (Automne)	2.01 \pm 0.02082
<i>L. stoechas Aïn fezza</i> (Automne)	0.46 \pm 0.005774
<i>C. ladaniferus</i> (Automne)	0.09 \pm 0.01000
<i>S. olusatrum</i> (Printemps)	0.037 \pm 0.001414

Tableau A3 : Densité des huiles essentielles

La plante	Densité moyenne
<i>lavandula stoechas Oum el alou</i> (Automne)	0.813 \pm 0.1080
<i>lavandula stoechas Aïn fezza</i> (Automne)	0.855 \pm 0.1443
<i>cistus ladaniferus</i> (Automne)	0.757 \pm 0.1051
<i>smyrniium olusatrum</i> (Printemps)	0.889 \pm 0.04250

Tableau A4 : Résultat de la mise en évidence des flavonoïdes

Origine végétale de l'extrait brut	Lecture / coloration
<i>Lavandula stoechas</i>	+ / rouge
<i>Cistus ladaniferus</i>	+ / rouge
<i>Crataegus oxyacantha</i>	++ / rouge vif
<i>Smyrniium olusatrum</i>	++ / rouge foncé

**Tableau A5 : Rendement en extrait sec brut
(g/100g de matériel végétal sec)**

La plante	Rendement moyen en % (p/p)
<i>Lavandula stoechas</i>	2.398 ± 0.3300
<i>Cistus ladaniferus</i>	3.613 ± 0.2973
<i>Crataegus oxyacantha</i>	4.553 ± 0.05774
<i>Smyrniium olusatrum</i>	1.082 ± 0.2973

Tableau A6 : Valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage des polyphénols

Dose mg/ml	0.35	1.04	1.73	2.42	3.12	3.46
Abs (660 nm)	0.108	0.133	0.313	0.376	0.373	0.416
	0.123	0.194	0.294	0.356	0.395	0.383
	0.098	0.169	0.315	0.365	0.417	0.490
Abs moyenne	0.109	0.165	0.307	0.366	0.395	0.429
	± 0.01258	± 0.03066	± 0.01159	± 0.01002	± 0.02200	± 0.05479

Tableau A7: Valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Dose µg/ml	5	15	25	35	45	50
Abs (367nm)	0.055	0.069	0.094	0.088	0.112	0.121
	0.058	0.060	0.093	0.093	0.113	0.121
	0.050	0.064	0.085	0.094	0.110	0.126
Abs moyenne	0.054	0.064	0.091	0.092	0.112	0.123
	± 0.004041	± 0.004509	± 0.004933	± 0.003215	± 0.001528	± 0.002887

Tableau A8 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes (résultat exprimé en équivalent gramme de l'étalon employé par 100g de plante sèche en poudre)

La plante	Qté moyenne des polyphénols en mg eq. résorcinol/100g matériel végétal sec	Qté moyenne des flavonoïdes en mg eq. catéchol/100g matériel végétal sec
<i>Lavandula stoechas</i>	686.71 ± 42.439	87.76 ± 6.824
<i>Cistus ladaniferus</i>	1035.99 ± 33.225	41.59 ± 2.728
<i>Crataegus oxyacantha</i>	457.17 ± 27.483	74.28 ± 2.946
<i>Smyrniium olusatrum</i>	94.56 ± 30.353	20.35 ± 2.572

Tableau A9 : AntibioGramme
Diamètre de l'auréole d'inhibition en mm

ATB Les souches	Dose	NA (30µg)	SP (100µg)	SXT (1,25/23,75) µg	TE (30µg)	E (15 UI)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (p4)	0	1	14	0	5	
	0.5	1	13	0	5	
	0.5	1	13	0	5	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	0.5	0.5	0	0	5	
	0.5	0.5	0	0	5	
	0.5	0.5	0	0	5	
<i>Enterobacter cloacea</i> (En)	12	7	0	5	0.5	
	10	7	0	5	0.5	
	10	5.5	0	5	0.5	
<i>Klebsiella pneumoneae</i> (KL1)	0	2	12	5	5	
	0	2	12	5	5	
	0	2	12	5	5	
<i>E. coli</i> ATCC25922	19	4	15	6	12	
	19	5	15	6	12	
	19	5	15	6	12	
<i>E. coli</i> (E1)	15.5	4	14	0.5	4	
	16	10	15	0.5	4	
	15.5	4	15	0.5	4	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	0.5	3	14	3	5.5	
	0.5	4	14	3	6	
	0.5	3	14	4	5.5	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ST1) ATCC 601.	0.5	5	4	3	0.5	
	0.5	6	3	4	0.5	
	0	4	0	5	0	
<i>Salmonella typhi</i> (SL)	0	5	12	2	6	
	0	5	12	2	6	
	0	5	14	2	8	
<i>Citrobacter</i>	18	4.5	0.5	0.5	0.5	
	18	5	0.5	0.5	0.5	
	18	5	0.5	0.5	0.5	
<i>Listeria monocytogenes</i> (L11)	1	4	0	0.5	1	
	1	4	0	0.5	0.5	
	1	4	0	0.5	1	
<i>Proteus mirabilis</i> (Pr)	0	19	0	0	18	
	0	19	0	0	17	
	0	20	0	0	17	

Tableau A10 : Antifongigramme (Antifongique : nystatine (Mycostatine))

1) Les moisissures
Diamètre de la colonie en cm

La souche	La dose	5µl (50ppm)	40µl (400ppm)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	48heures	6.6	2.1
		6.7	2.35
		6.7	2.4
<i>Mucor sp</i>	4jours	2	1.3
		1.5	1.4
		1.8	1.35
<i>Trichoderma sp</i>	4jours	8	2
		8	1.1
		8	2.3
<i>Alternaria sp</i>	4jours	0.9	0.6
		1	0.6
		1	0.6
<i>Aspergillus flavus</i>	7jours	3.8	2.1
		3.4	3.2
		3.6	2.9
<i>Fusarium sp</i>	7jours	0	0
		0	0
		0	0
<i>Penicillium sp</i>	7jours	0.9	0.7
		0.6	0.7
		0.7	0.6

2-Les levures
Diamètre de l'auréole d'inhibition en mm

La souche	Dose	Diametre
<i>Candida albicans</i> 444	30ppm	13.33
		10.5
		13.5

Tableau A11 : Activité de la Mycostatine sur la croissance des moisissures exprimée en % d'inhibition de la colonie mycélienne

	% d'inhibition dans les trois tests	% moyen	% d'inhibition dans les trois tests	%moyen
La souche \ La dose	5µl (50ppm)	5µl (50ppm)	40µl (400ppm)	40µl (400ppm)
<i>Rhizopus stolonifer</i> 48heures incubation	17,5	16,67 ± 0,7417	73,75	71,46 ± 2,009
	16,25		70,63	
	16,25		70	
<i>Mucor sp</i> 4jours incubation	23,08	57,44 ± 29,84*	80	79,23 ± 0,7692
	76,92		78,46	
	72,31		79,23	
<i>Trichoderma sp</i> 4jours incubation	0	0 ± 0	75	77,5 ± 7,806
	0		86,25	
	0		71,25	
<i>Alternaria sp</i> 4jours incubation	80,43	77,95 ± 2,417	86,96	86,33 ± 0,8472
	75,61		85,37	
	77,78		86,67	
<i>Aspergillus flavus</i> 7jours incubation	9,52	9,25 ± 1,437	50	30,48 ± 17,61*
	10,53		15,79	
	7,69		25,64	
<i>Fusarium sp</i> 7jours incubation	100	100 ± 0	100	100 ± 0
	100		100	
	100		100	
<i>Penicillium sp</i> 7jours incubation	68,97	70,8 ± 3,651	75,86	72,53 ± 8,229
	68,42		63,16	
	75		78,57	

* : pas tout à fait significatif

Tableau A12 : Test antifongique
1) Les huiles essentielles
(Diamètre des colonies en centimètre)

[HE] µl/20 ml MC	HE. <i>Lavandula stoechas</i>							HE. <i>Cistus ladaniferus</i>								
	4	10	20	40	100	110	120	4	10	20	40	100	110	120	125	150
Les souches																
<i>R.stolonifer</i>	8	6.9	3.4	0	0			5.4	5	3.2	1.9	0.7		0		
48 heures	8	6.9	3.45	0	0			5.4	5.05	3.2	1.85	0.7		0		
	8	6.8	3.4	0	0			5.35	5	3.1	1.85	0.8		0		
<i>Mucor sp</i>	4.4	3.7	4	1.4	0			2.9	1.4	1.2	0	0				
4 jours	3.9	3.8	3.5	1.5	0			2.9	1.55	1.15	0	0				
	4.2	3.7	4	1.5	0			2.8	1.5	1.1	0	0				
<i>Trichoderma sp</i>	7.5	5.5	3	1.1	0			2.8	2.8	1.65	1.3	1		0.7	0	
4 jours	8	5.8	2.7	1.1	0			3.0	2.9	1.7	1.4	1.1		0.65	0	
	7.8	5.7	2.9	1.1	0			3.0	2.9	1.6	1.35	1.05		0.75	0	
<i>Alternaria sp</i>	4	3.15	2.1	1	0			2.5	2.1	1.6	1	0				
4 jours	2	3.3	2.3	1	0			2.55	2.2	1.5	1.1	0				
	3	3.2	2.15	1	0			2.45	2.0	1.55	1.2	0				
<i>A. flavus</i>	3.7	3.1	2.7	1.5	0.9		0	2.9	2.3	1.9	1.85	1.35		1.2		0
	3.7	3.5	2.55	1.6	0.8		0	2.7	2.3	1.8	1.65	1.3		1.2		0
	3.8	3.2	2.6	1.55	1.0		0	2.8	2.3	1.85	1.8	1.3		1.2		0
<i>Fusarium sp</i>	3.3	2.1	1.5	0	0			3.15	1.8	1.7	1.55	0				
7 jours	3.1	2.0	1.55	0	0			2.1	1.85	1.6	1.35	0				
	3.2	2.05	1.5	0	0			3.2	1.85	1.65	1.4	0				
<i>Penicillium sp</i>	2.6	2.1	1.5	1.1	0.6	0		1.15	1.3	1.1	1.1	0.6	0			
7 jours	2.55	2.0	1.1	1.2	0.6	0		1.1	1.35	1.1	1	0.6	0			
	2.75	2.1	1.3	1.2	0.6	0		1.2	1.3	1.1	1.1	0.6	0			

**Tableau A12 (suite) : Test antifongique
2) Les flavonoïdes
(Diamètre des colonies en centimètre)**

[EF] µl/20ml MC Les souches	Témoin1 (PDA)	Témoin2 (PDA+DMSO)	EF. <i>Lavandula</i>			EF. <i>Crataegus</i>			EF. <i>Cistus</i>				EF. <i>Smyrniun</i>		
			300	500	700	300	500	700	300	500	700	1 000	300	500	700
<i>R. stolonifer</i>	8	8	6,2	5,8	5,3	8	7,7	7,45	5.1	4	3,2		3,4	1,4	0,8
	8	8	6.0	6	5,4	8	7,5	7	5.3	4	3,3		3,1	1,3	0,7
	8	8	6.4	5.9	5.4	8	7.8	7.35	5.2	4	3.4		3.2	1.3	0.8
<i>Mucor sp</i>	6,5	8	8	6,9	5,8	8	8	8	2,6	2,0	1,7		8	8	7,0
	6,5	8	7,4	6,1	5,3	8	8	8	2,3	1,7	1,6		8	8	6,6
	6,4	8	7.6	7.2	5.5	8	8	8	2.4	1.6	1.7		8.0	8.0	6.8
<i>Trichoderma sp</i>	8	8	3.6	2.8	2.2	8	7.0	5.2	8	7	2.8		2.4	4	1.5
	8	8	3.3	2.7	2.4	8	7.2	5	8	8	2.1		2.0	2	1.1.7
	8	8	3.9	2.9	2.4	8	7.4	5.3	8	7.0	2..5		2.8	2	1.8
<i>Alternaria sp</i>	4,6	2	2,5	2,4	2,0	2,45	3,1	5,15	1,5	1,4	1,4		2,2	1,9	1,6
	4,1	1.65	2,5	2	1,85	2,5	3,3	3,1	1.55	1.45	1,3		2	1,8	1,6
	4,5	4	2,5	2,4	2,1	4	3,5	3,1	1.45	1.35	1,4		2,1	1,8	1,6
<i>Aspergillus sp</i>	4,2	5	4,6	4,4	4,1	6,45	6,2	6,3	3,95	3,8	3		6,6	6,5	4,65
	3,8	4.6	4,8	4,6	4,4	6,3	7,4	6,2	4	3,1	2,6		6,75	6,6	4,7
	3,9	5	4.55	4,6	4,4	6.35	6,7	6,4	3.05	3,3	3,1		6.65	6,5	4,8
<i>Fusarium 7j</i>	3,1	1.9	4,5	2	1,4	1,9	1,8	1,4	0.6	0.6	0.6	0	5	1.8	1,6
	2,85	2.1	2,4	1,9	1,5	1,7	1,6	1,4	0.6	0.6	0.6	0	7,5	3,6	2,3
	5.0	2.1	4.3	2.0	1.5	1.8	1.7	1.3	0.6	0.6	0.6	0	4,9	4.95	2.7
<i>Penicillium 7j</i>	2,9	2.8	3,1	2,6	2,1	3,2	3,4	3,4	1.8	1,75	1,8		2,1	1,9	1,4
	1.9	1.95	2,2	2,3	2,1	3,5	3,7	3,2	1,85	1,8	1,6		1.15	1,6	1,3
	2,8	2.2	3,2	2,4	2.2	3,3	3,5	3,2	1.75	1.65	1.65		2,85	1,8	1,4

**Tableau 28 (A13) : Essai Antioxydant
(Capacité de réduction du radical libre mesuré à 518 nm)**

Réduction de l'Absorbance en fonction de la dose de l'extrait

Nature de la substance chimique	Dose (µg/ml) de l'antioxydant	Absorbance			Abs
		Abs 1	Abs 2	Abs 3	(Moyenne ± SD)
Contrôle (DPPH)	0	0.478	0.471	0.448	0.466 ± 0.01570
EF. <i>L. stoechas</i>	4	0.248	0.255	0.236	0.246 ± 0.009609
	5	0.227	0.215	0.303	0.248 ± 0.04772
	7	0.123	0.157	0.132	0.137 ± 0.01762
	10	0.033	0.094	0.036	0.054 ± 0.03439
	15	0.032	0.041	0.041	0.038 ± 0.005196
	30	0.035	0.024	0.041	0.033 ± 0.008622
	50	0.025	0.022	0.028	0.025 ± 0.003000
	100	0.022	0.023	0.027	0.024 ± 0.002646
EF. <i>C. ladaniferus</i>	5	0.443	0.419	0.395	0.419 ± 0.02400
	7	0.327	0.384	0.335	0.349 ± 0.03086
	10	0.254	0.239	0.241	0.245 ± 0.008145
	13	0.161	0.196	0.176	0.178 ± 0.01756
	15	0.156	0.156	0.105	0.139 ± 0.02944
	20	0.154	0.122	0.114	0.130 ± 0.02117
	30	0.016	0.019	0.019	0.018 ± 0.001732
	50	0.011	0.014	0.008	0.011 ± 0.003000
EF. <i>C. oxyacantha</i>	0.8	0.309	0.241	0.246	0.265 ± 0.03790
	3	0.227	0.102	0.175	0.116 ± 0.1054
	5	0.115	0.062	0.079	0.085 ± 0.02706
	10	0.078	0.060	0.058	0.065 ± 0.01102
	30	0.050	0.056	0.055	0.0537 ± 0.003215
	50	0.054	0.053	0.049	0.052 ± 0.002646
	100	0.046	0.048	0.052	0.0487 ± 0.003055
	EF. <i>S. olusatrum</i>	1	0.464	0.467	0.419
3		0.420	0.397	0.414	0.410 ± 0.01193
5		0.388	0.381	0.397	0.389 ± 0.008021
7		0.358	0.335	0.347	0.347 ± 0.01150
10		0.250	0.223	0.165	0.213 ± 0.04343
15		0.072	0.069	0.075	0.072 ± 0.003000
30		0.060	0.038	0.049	0.049 ± 0.01100
40		0.033	0.042	0.025	0.033 ± 0.008505
50		0.035	0.028	0.020	0.028 ± 0.007506
60		0.026	0.015	0.005	0.015 ± 0.01050
Trolox	0.8	0.254	0.253	0.255	0.254 ± 0.001000
	2	0.216	0.173	0.250	0.213 ± 0.03859
	4	0.055	0.033	0.060	0.049 ± 0.01436
	5	0.031	0.044	0.024	0.033 ± 0.01015
	6	0.004	0.001	0.003	0.003 ± 0.001528
	12	0.001	0.001	0.001	0.001 ± 0.000
	Acide ascorbique	0.5	0.339	0.438	0.397
1		0.211	0.229	0.220	0.220 ± 0.009000
1.2		0.189	0.178	0.200	0.189 ± 0.01100
5		0.015	0.014	0.013	0.014 ± 0.001000
10		0.011	0.013	0.012	0.012 ± 0.001000
20		0.007	0.009	0.005	0.007 ± 0.002000

Tableau 28 (suite A13) : Test antioxydant (suite résultat)

Nature de la substance chimique	Dose (µg/ml) de l'antioxydant	Absorbance			Abs
		Abs 1	Abs 2	Abs 3	(Moyenne ± SD)
Contrôle (DPPH)	0	0.467	0.478	0.473	0.507 ± 0.06473
HE <i>S. olusatrum</i>	2	0.451	0.458	0.465	0.458 ± 0.007000
	10	0.456	0.468	0.444	0.456 ± 0.01200
	20	0.454	0.458	0.450	0.454 ± 0.004000
	100	0.450	0.410	0.430	0.430 ± 0.02000
	300	0.371	0.377	0.383	0.377 ± 0.006000
	500	0.314	0.389	0.395	0.366 ± 0.04513
	600	0.394	0.306	0.350	0.350 ± 0.04400
	700	0.347	0.348	0.346	0.347 ± 0.001000
	1 000	0.347	0.348	0.340	0.345 ± 0.004359
	3 000	0.258	0.253	0.259	0.257 ± 0.003215
	5 000	0.180	0.213	0.185	0.193 ± 0.01779
	7 000	0.175	0.184	0.166	0.175 ± 0.009000
	9 000	0.149	0.154	0.140	0.148 ± 0.007095
11 000	0.095	0.062	0.057	0.071 ± 0.02065	
13 000	0.053	0.050	0.055	0.053 ± 0.002517	
HE <i>L. stoechas</i>	2	0.468	0.459	0.450	0.459 ± 0.009000
	10	0.455	0.448	0.441	0.448 ± 0.007000
	20	0.439	0.443	0.399	0.427 ± 0.02433
	100	0.495	0.463	0.473	0.477 ± 0.01637
	300	0.399	0.480	0.382	0.420 ± 0.05237
	400	0.457	0.393	0.382	0.411 ± 0.04050
	500	0.355	0.379	0.374	0.369 ± 0.01266
	600	0.345	0.345	0.330	0.34 ± 0.008660
	1 000	0.259	0.257	0.260	0.259 ± 0.001528
	3 000	0.140	0.145	0.132	0.139 ± 0.006557
	5 000	0.087	0.097	0.080	0.088 ± 0.008544
	7 000	0.075	0.078	0.072	0.075 ± 0.003000
	9 000	0.062	0.062	0.063	0.062 ± 0.0005774
11 000	0.033	0.031	0.038	0.034 ± 0.003606	
13 000	0.031	0.029	0.033	0.031 ± 0.002000	
HE <i>C. ladaniferus</i>	2	0.461	0.452	0.461	0.461 ± 0.009000
	10	0.449	0.440	0.458	0.449 ± 0.009000
	20	0.441	0.454	0.428	0.441 ± 0.01300
	300	0.402	0.396	0.403	0.403 ± 0.08200
	500	0.392	0.321	0.402	0.393 ± 0.005033
	1 000	0.218	0.193	0.169	0.193 ± 0.02450
	3 000	0.089	0.064	0.069	0.074 ± 0.01323
5 000	0.053	0.058	0.053	0.0547 ± 0.002887	

**Tableau A14 : Résultat du test Antioxydant exprimant l' EC50
et la Puissance Antioxydante**

Extrait	EC50	ARP
Extrait naturel		
EF <i>L. stoechas</i>	4,98463188 5,51590076 5,38393399	0,20061662 0,18129405 0,18573779
EF <i>C. ladaniferus</i>	10,7963896 11,9421251 11,5328673	0,09262356 0,08373719 0,08670871
EF <i>C. oxyacantha</i>	3,06265187 2,4453605 2,74609215	0,32651442 0,40893766 0,36415384
EF <i>S. olusatrum</i>	9,92597841 9,50042581 9,62555735	0,10074574 0,10525844 0,10389009
HE <i>L. stoechas</i>	1893,55079 1875,52585 1789,24869	0,00052811 0,00053318 0,00055889
HE <i>C. ladaniferus</i>	1110,76663 856,605124 876,802913	0,00090028 0,0011674 0,00114051
HE <i>S. olusatrum</i>	3496,9444 3595,46994 3496,21989	0,00028596 0,00027813 0,00028602
Les standards		
Acide ascorbique	0,88781625 1,138782 1,10453593	1,1263592 0,8781312 0,9053576
TROLOX	2,05951962 1,92702258 2,19908762	0,48555012 0,51893528 0,45473404

Tableau A15 : Réduction de l’Absorbance du DPPH en solution en fonction du temps

EF <i>L. stoechas</i>		EF <i>C. ladaniferus</i>		EF <i>C. oxyacantha</i>	
Temps (min)	Abs (518nm)	Temps (min)	Abs (518nm)	Temps (min)	Abs (518nm)
0	1.009	0	1,040	0	0.968
1	0,249	1	0,703	1	0,601
2	0,169	2	0,644	2	0,194
3	0,168	3	0,638	3	0,168
4	0,159	4	0,630	4	0,165
5	0,155	5	0,624	5	0,165
6	0,152	6	0,618	6	0,164
7	0,149	7	0,614	7	0,164
8	0,148	8	0,610	8	0,164
9	0,146	9	0,606	9	0,164
10	0,146	10	0,602	10	0,163
11	0,144	11	0,599	11	0,164
12	0,144	12	0,597	12	0,164
13	0,144	13	0,595	13	0,164
14	0,144	14	0,593	14	0,165
15	0,144	15	0,591	15	0,165
16	0,145	16	0,590	16	0,164
17	0,145	17	0,589	17	0,164
18	0,145	18	0,587	18	0,165
19	0,145	19	0,587	19	0,165
20	0,145	20	0,585	20	0,165
21	0,145	21	0,585	21	0,165
22	0,144	22	0,584	22	0,165
23	0,144	23	0,583	23	0,165
24	0,144	24	0,582	24	0,165
25	0,144	25	0,579	25	0,165
26	0,144	26	0,578	26	0,165
27	0,145	27	0,578	27	0,165
28	0,145	28	0,577	28	0,165
29	0,145	29	0,576	29	0,165
30	0,145	30	0,575	30	0,165
		31	0,575	31	0,165
		32	0,575		

T₀ (0 min) solution de DPPH sans extrait naturel ou composé antioxydant
t_i (i>0) solution de DPPH + l’extrait naturel ou composé antioxydant

EF <i>S. olusatrum</i>		EF <i>S. olusatrum</i> (suite)		TROLOX		Acide ascorbique	
Temps (min)	Abs (518nm)	Temps (min)	Abs (518nm)	Temps (min)	Abs (518nm)	Temps (min)	Abs (518nm)
0	0,998	31	0,667	0	1,073	0	1,055
1	0,840	32	0,666	1	0,572	1	0,125
2	0,785	33	0,664	2	0,210	2	0,105
3	0,774	34	0,664	3	0,158	3	0,101
4	0,764	35	0,663	4	0,156	4	0,101
5	0,753	36	0,662	5	0,156	5	0,101
6	0,745	37	0,661	6	0,156	6	0,100
7	0,739	38	0,661	7	0,155	7	0,100
8	0,733	39	0,660	8	0,155	8	0,100
9	0,727	40	0,658	9	0,155	9	0,100
10	0,722	41	0,658	10	0,155	10	0,100
11	0,717	42	0,657	11	0,155	11	0,100
12	0,713	43	0,657	12	0,155	12	0,100
13	0,709	44	0,656	13	0,155	13	0,100
14	0,705	45	0,655	14	0,155	14	0,100
15	0,702	46	0,655	15	0,155	15	0,100
16	0,699	47	0,655	16	0,154	16	0,100
17	0,695	48	0,654	17	0,154	17	0,100
18	0,693	49	0,654	18	0,154	18	0,100
19	0,690	50	0,654	19	0,154	19	0,099
20	0,688	51	0,653	20	0,154	20	0,100
21	0,685	52	0,653	21	0,154	21	0,100
22	0,683	53	0,653	22	0,154	22	0,100
23	0,681	54	0,652	23	0,154	23	0,099
24	0,679	55	0,652	24	0,154	24	0,099
25	0,677	56	0,652	25	0,154	25	0,099
26	0,675	57	0,652	26	0,154	26	0,099
27	0,673	58	0,652	27	0,154	27	0,099
28	0,671	59	0,652	28	0,154	28	0,099
29	0,670	60	0,652	29	0,154	29	0,099
30	0,668	61	0,652	30	0,154	30	0,099
						31	0,099

HE *L. stoechas*

Temps (min)	Abs (518nm)	Temps (min)	Abs (518nm)	Temps (min)	Abs (518nm)	Temps (min)	Abs (518nm)
0	1,078	47	0,712	94	0,654	138	0,621
1	0,942	48	0,711	95	0,654	139	0,620
2	0,903	49	0,709	96	0,652	140	0,619
3	0,881	50	0,708	97	0,651	141	0,619
5	0,866	51	0,706	98	0,650	142	0,618
5	0,854	52	0,705	99	0,649	143	0,617
6	0,842	53	0,704	100	0,648	144	0,617
7	0,836	54	0,702	101	0,647	145	0,616
8	0,829	55	0,701	102	0,647	146	0,616
9	0,823	56	0,699	103	0,646	147	0,615
10	0,817	57	0,698	104	0,645	148	0,614
11	0,811	58	0,696	105	0,644	149	0,614
12	0,806	59	0,695	106	0,643	150	0,613
13	0,802	60	0,694	107	0,642	151	0,613
14	0,798	61	0,692	108	0,641	152	0,615
15	0,793	62	0,690	109	0,640	153	0,615
16	0,789	63	0,690	110	0,639	154	0,612
17	0,785	64	0,688	111	0,639	155	0,612
18	0,782	65	0,687	112	0,638	156	0,612
19	0,778	66	0,685	113	0,637	157	0,613
20	0,774	67	0,683	114	0,638	158	0,613
21	0,771	68	0,682	115	0,638	159	0,613
22	0,768	69	0,681	116	0,637	160	0,610
23	0,764	70	0,680	117	0,636	161	0,610
24	0,761	71	0,680	118	0,635	162	0,610
25	0,758	72	0,678	119	0,635	163	0,610
26	0,755	73	0,677	120	0,634	164	0,608
27	0,752	74	0,676	121	0,633	165	0,608
28	0,749	75	0,674	122	0,632	166	0,608
29	0,747	76	0,673	123	0,631	167	0,608
30	0,744	77	0,672	124	0,630	168	0,608
31	0,742	78	0,671	125	0,630	169	0,606
32	0,739	79	0,670	126	0,629	170	0,606
33	0,738	80	0,669	127	0,628	171	0,606
34	0,735	81	0,668	128	0,626	172	0,606
35	0,733	82	0,667	129	0,625	173	0,606
36	0,730	83	0,666	130	0,624	174	0,606
37	0,730	84	0,664	131	0,623	175	0,606
38	0,727	85	0,663	132	0,623	176	0,606
39	0,725	86	0,662	133	0,622	177	0,606
40	0,726	87	0,661	143	0,622	178	0,606
41	0,724	88	0,660	135	0,622	179	0,606
42	0,722	89	0,659	136	0,622	180	0,606
43	0,720	90	0,658	137	0,622	181	0,606
44	0,718	91	0,657				
45	0,717	92	0,656				
46	0,714	93	0,655				

HE *S. olusatrum*

Tem ps (min)	Abs (518n m)	Tem ps (min)	Abs (518n m)	Tem ps (min)	Abs (518n m)	Tem ps (min)	Abs (518n m)	Tem ps (min)	Abs (518n m)
0	1,173	44	1,004	88	0,899	132	0,766	176	0,625
1	1,128	45	1,002	89	0,896	133	0,763	177	0,622
2	1,116	46	1,000	90	0,893	143	0,759	178	0,619
3	1,106	47	0,997	91	0,890	135	0,756	179	0,616
5	1,100	48	0,994	92	0,889	136	0,753	180	0,613
5	1,096	49	0,992	93	0,885	137	0,749	181	0,610
6	1,092	50	0,990	94	0,882	138	0,746	182	0,607
7	1,089	51	0,988	95	0,879	139	0,742	183	0,604
8	1,085	52	0,985	96	0,876	140	0,739	184	0,601
9	1,083	53	0,983	97	0,874	141	0,736	185	0,598
10	1,080	54	0,982	98	0,871	142	0,732	186	0,595
11	1,078	55	0,980	99	0,869	143	0,729	187	0,592
12	1,076	56	0,978	100	0,865	144	0,726	188	0,589
13	1,073	57	0,976	101	0,863	145	0,723	189	0,585
14	1,071	58	0,974	102	0,858	146	0,720	190	0,582
15	1,068	59	0,972	103	0,855	147	0,716	191	0,579
16	1,065	60	0,969	104	0,853	148	0,713	192	0,576
17	1,063	61	0,968	105	0,850	149	0,710	193	0,573
18	1,061	62	0,964	106	0,847	150	0,706	194	0,571
19	1,059	63	0,962	107	0,844	151	0,703	195	0,568
20	1,056	64	0,960	108	0,842	152	0,700	196	0,565
21	1,054	65	0,957	109	0,839	153	0,697	197	0,562
22	1,052	66	0,954	110	0,836	154	0,694	198	0,560
23	1,050	67	0,952	111	0,833	155	0,691	199	0,569
24	1,048	68	0,949	112	0,830	156	0,687	200	0,558
25	1,046	69	0,947	113	0,827	157	0,684	201	0,554
26	1,043	70	0,944	114	0,824	158	0,680	202	0,553
27	1,041	71	0,942	115	0,821	159	0,678	203	0,549
28	1,039	72	0,940	116	0,818	160	0,675	204	0,548
29	1,036	73	0,937	117	0,815	161	0,672	205	0,545
30	1,034	74	0,934	118	0,812	162	0,669	206	0,542
31	1,032	75	0,932	119	0,808	163	0,666	207	0,541
32	1,029	76	0,930	120	0,805	164	0,662	208	0,537
33	1,028	77	0,928	121	0,802	165	0,659	209	0,536
34	1,025	78	0,925	122	0,798	166	0,656	210	0,533
35	1,023	79	0,922	123	0,795	167	0,653	211	0,531
36	1,021	80	0,920	124	0,792	168	0,650	212	0,528
37	1,019	81	0,917	125	0,790	169	0,647	213	0,527
38	1,017	82	0,914	126	0,785	170	0,643	214	0,524
39	1,014	83	0,911	127	0,782	171	0,640		
40	1,012	84	0,909	128	0,779	172	0,637		
41	1,010	85	0,906	129	0,776	173	0,634		
42	1,008	86	0,904	130	0,772	174	0,631		
43	1,006	87	0,901	131	0,769	175	0,628		

HE *C. ladaniferus*

Tem ps (min)	Abs (518n m)	Tem ps (min)	Abs (518n m)	Tem ps (min)	Abs (518n m)	Tem ps (min)	Abs (518n m)	Tem ps (min)	Abs (518n m)
0	1,087	41	0,555	82	0,370	123	0,257	163	0,184
1	0,968	42	0,549	83	0,367	124	0,254	164	0,183
2	0,950	43	0,544	84	0,363	125	0,252	165	0,181
3	0,934	44	0,538	85	0,359	126	0,250	166	0,180
5	0,925	45	0,533	86	0,356	127	0,248	167	0,179
5	0,920	46	0,527	87	0,353	128	0,246	168	0,178
6	0,912	47	0,522	88	0,349	129	0,244	169	0,177
7	0,884	48	0,517	89	0,346	130	0,241	170	0,176
8	0,873	49	0,512	90	0,343	131	0,239	171	0,174
9	0,856	50	0,507	91	0,340	132	0,237	172	0,174
10	0,836	51	0,501	92	0,337	133	0,235	173	0,174
11	0,820	52	0,496	93	0,333	143	0,233	174	0,171
12	0,807	53	0,491	94	0,330	135	0,231	175	0,171
13	0,792	54	0,486	95	0,327	136	0,229	176	0,171
14	0,778	55	0,481	96	0,325	137	0,227	177	0,171
15	0,765	56	0,476	97	0,321	138	0,225	178	0,171
16	0,751	57	0,472	98	0,319	139	0,223	179	0,175
17	0,738	58	0,467	99	0,316	140	0,221	180	0,176
18	0,725	59	0,462	100	0,313	141	0,220	181	0,176
19	0,715	60	0,458	101	0,310	142	0,218	182	0,176
20	0,703	61	0,453	102	0,307	143	0,216	183	0,176
21	0,694	62	0,449	103	0,305	144	0,214	184	0,175
22	0,686	63	0,445	104	0,302	145	0,212	185	0,174
23	0,677	64	0,440	105	0,299	146	0,211	186	0,174
24	0,670	65	0,436	106	0,296	147	0,209	187	0,174
25	0,662	66	0,431	107	0,294	148	0,207	188	0,174
26	0,654	67	0,427	108	0,291	149	0,205	189	0,174
27	0,647	68	0,423	109	0,289	150	0,203	190	0,174
28	0,639	69	0,419	110	0,286	151	0,202	191	0,174
29	0,632	70	0,416	111	0,283	152	0,199	192	0,174
30	0,625	71	0,411	112	0,281	153	0,197	193	0,174
31	0,618	72	0,407	113	0,278	154	0,196	194	0,174
32	0,611	73	0,403	114	0,276	155	0,195	195	0,174
33	0,605	74	0,399	115	0,273	156	0,193	196	0,175
34	0,598	75	0,395	116	0,271	157	0,191	197	0,174
35	0,592	76	0,392	117	0,268	158	0,190	198	0,174
36	0,586	77	0,388	118	0,266	159	0,188	199	0,174
37	0,579	78	0,385	119	0,264	160	0,187	200	0,175
38	0,573	79	0,38	120	0,261	161	0,186	201	0,175
39	0,567	80	0,377	121	0,259	162	0,185	202	0,175
40	0,561	81	0,374	122					



Photo A1 : Exemples de l'Activité des Antibiotiques sur la croissance des Bactéries



Fig. 41 (Photo A2) : Activité antifongique de l'extrait flavonoïdique du Ciste
(On observe uniquement une germination des spores de *Fusarium*
sans propagation du mycélium dans le milieu de culture)

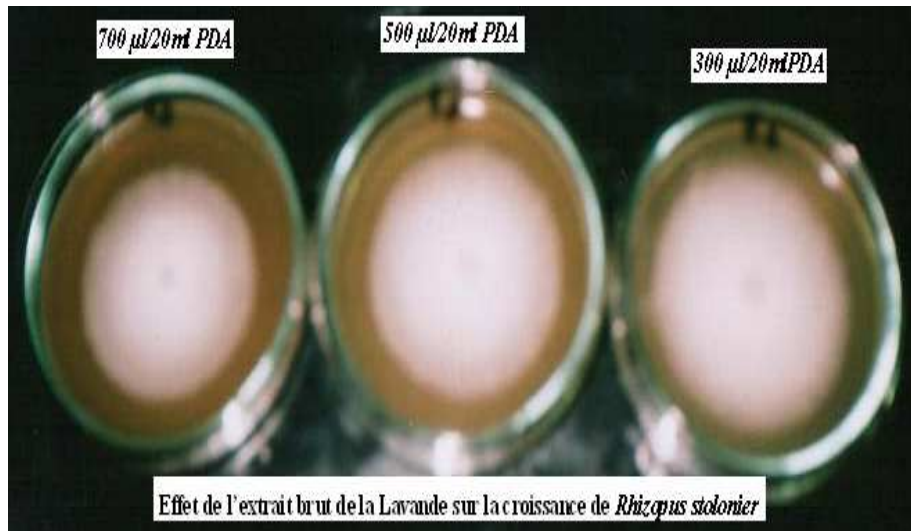


Fig. 41 (Photo A3) : Réduction de la croissance de *R. stolonifer* sous l'effet de l'augmentation de la dose de l'extrait brut de *L. stoechas*

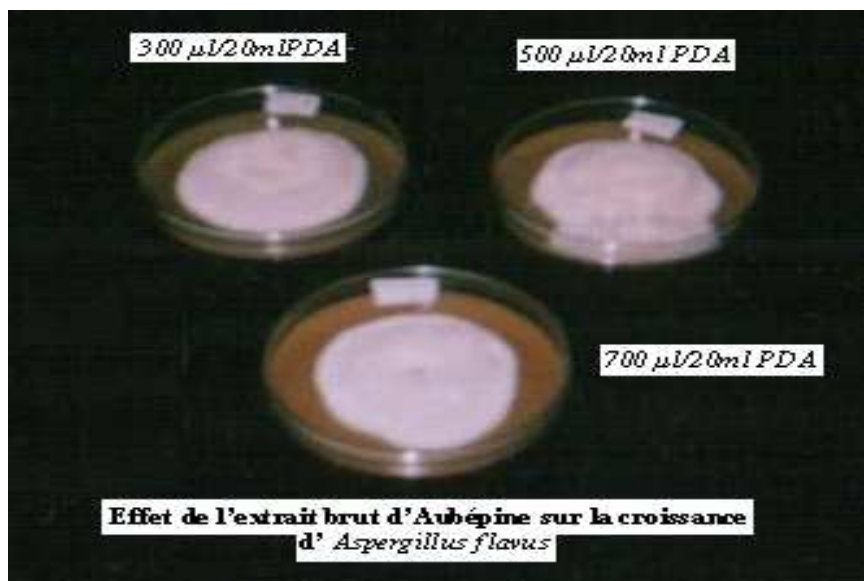


Fig. 41 (Photo A4) : Effet stimulant de la croissance d'*A. flavus* par l'extrait flavonique de *Crataegus*

Milieux de culture

Préparation pour 1litre

Bouillon Nutritif (BN)

Extrait de viande	5g
Peptone pancréatique	10g
Chlorure de sodium	5g
pH= 7.4	

Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande de boeuf	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
pH= 7,2 à 7,4	

Mueller Hinton (Gélose)

Infusion de viande de bœuf	300ml
Hydrolysate de Caseine	17.5g
Amidon	1,5g
Agar	10g
pH= 7.4	

Potatoes Dextrose Agar (PDA)

Filtrat de pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar	15g
Acidifié à pH= 4.5	

Milieu Sabouraud (Liquide)

Peptone pepsique de viande	10g
Glucose	35g
pH= 5, 7 ± 0,2	