



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة الشهيد حمّـة لخضر الوادي  
Université Echahid Hamma Lakhdar d'El Oued



كلية العلوم الدقيقة - قسم الكيمياء

N° de série : .....

N° d'ordre : ... / 2022

# THESE

Pour l'obtention du diplôme de  
**DOCTORAT EN SCIENCES**

SPECIALITE : CHIMIE  
OPTION : CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE

## Intitulé

**Mise en évidence des activités biologiques et des études minérales de certaines plantes médicinales cultivées en Algérie : *Teucrium polium* L, *Matricaria chamomilla* L et *Mentha pulegium* L**

Présentée par **Mohammed Messaoudi**

Soutenue publiquement le 5 Mai 2022

Devant le Jury composé de :

► M. Abdelkrim Rebiai	MCA	Université d'El-oued	Président
► M. Mohamed Amine Ferhat	Professeur	ENS Kouba-Alger	Directeur de Thèse
► Mme Naima Benchikha	Professeur	Université d'El-oued	Co-directeur Thèse
► Mme Aicha Hassani	Professeur	ENS Kouba-Alger	Examinatrice
► M. Mohamed Dehamchia	Professeur	Université d'El-oued	Examinateur

# Dédicace

Cette thèse est dédiée

*A ma très chère MÈRE, qui m'a donné tant de tendresse et d'amour, que Dieu tout puissant lui accorde sa sainte miséricorde et à l'accueillir en son vaste paradis.*

*A Mon cher père, en témoignage d'affection et de reconnaissance*

*A mes frères et mes sœurs.*

*A ma Femme.*

*A ma fille Mariam Inas*

*A mon fils fille Anis Abdeslam*

*MESSAOUDI Mohammed*

## *Remerciements*

En préambule à ce travail de Thèse, Je rends grâce à Dieu, qui nous a gratifié force et courage pour l'accomplissement de cette Thèse.

Au moment où s'achève ce travail, permettez-moi de remercier, du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de Thèse, m'ont dirigé, soutenu, aidé et encouragé.

Le présent travail a été réalisé sous la direction de Professeur FERHAT M.A. (Directeur de thèse) et Professeur BENCHIKHA NAÏMA (Co-directeur). Je tiens à vous exprimer, amplement, toute ma gratitude pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit. Je souhaiterais ici vous témoigner ma sincère reconnaissance pour tous les conseils et les remarques objectives apportés.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du Jury, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche, en acceptant d'examiner ce travail.

Le travail de recherche présenté ici a été réalisé grâce à des nombreuses coopérations et se situe à l'interface entre la développement et application des techniques nucléaires et conventionnelles dans les laboratoires et aussi la Chimie organique, la Pharmacologie et la Microbiologie alimentaire. Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable d'adresser mes sincères remerciements à toutes les personnes qui m'ont apporté leur contribution et leur appui et qui ont concouru à l'aboutissement de ce projet.

- Sincères et profonds, j'ai remerciements à Monsieur Hamza Ouakouak.
- j'ai remerciements à madame Baya Berka Zougali (ENS kouba, Alger).
- j'ai remerciements à tous le personnel de chimie de réacteur, ainsi que tous les personnels techniques, administratif de centre de recherche nucléaire (CRNB) et département de NAA au centre de recherche nucléaire de Draria (CRND).
- Mention spéciale pour le personnel du Laboratoire de Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico – chimiques (CRAPC-Bousmail) et le Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT – Constantine), Je vous en serai toujours reconnaissante.
- Sincères et profonds Remerciements au personnel techniques et laborantins de l'unité CRD de SAIDAL (Alger) pour son aimable coopération.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin

## Liste des abréviations

- ® Marque enregistrée
- A Activité
- NAA analyse par activation neutronique
- b barn ( $1 \text{ E}^{-24} \text{ cm}^2$ )
- °C degré Celsius
- c coup, comptage
- C concentration
- cm centimètre
- Cpm coup par minute
- Cps coup par seconde
- Dt temps mort
- E énergie
- eV électronvolt
- FWHM largeur du pic mesuré à mi-hauteur de l'amplitude maximale.
- I Intégrales de résonance
- M Masses atomiques
- n neutron
- N<sub>a</sub> nombre d'Avogadro ( $6.023 \times 10^{23}$  atomes/mole)
- T<sub>1/2</sub> Période demi-vie
- Tc temps de comptage
- Td temps de décroissance
- ε Efficacité du détecteur
- λ constante de désintégration
- σ<sub>0</sub> Section efficace de capture radiative aux neutrons à 2200 m/s donnée en barn
- φ Le flux neutronique ( $\text{n.cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
- ε(E) L'efficacité de la chaîne
- m La masse de l'élément dans l'échantillon
- M La masse atomique de l'élément analysé
- A Masse atomique de l'élément mesurée
- w La masse de l'élément dans l'échantillon

<b>N<sub>p</sub></b>	Nombre de coups sous le pic d'absorption totale,
<b>w<sub>e</sub></b>	Masse de l'échantillon,
<b>q</b>	Abondance isotopique
<b>s</b>	Section efficace
<b>γ</b>	taux d'embranchement
<b>ε(E)</b>	Efficacité de détection pour l'énergie E de l'installation de mesure
<b>T</b>	période
<b>t<sub>i</sub> ,t<sub>d</sub> ,t<sub>m</sub></b>	respectivement ; temps d'irradiation , de décroissance et de collection
<b>m<sub>e</sub></b>	masse de l'échantillon
<b>m<sub>s</sub></b>	masse du standard
<b>N<sub>e</sub></b>	comptage de l'élément dans l'échantillon analyse
<b>N<sub>s</sub></b>	comptage de l'élément dans le standard
<b>α</b>	paramètre de correction de la distribution du flux épithermique par rapport à 1/E
<b>ppm</b>	particule par million (mg/kg)
<b>ppb</b>	particule par billion (ng/g)
<b>AANI (INAA)</b>	Analyse par activation neutronique instrumental
<b>k<sub>0</sub>-INAA</b>	Standardisation k <sub>0</sub> de l'analyse par activation neutronique
<b>RNAA</b>	Séparation radiochimique basée sur l'analyse par activation neutronique
<b>AIEA (IAEA)</b>	Agence Internationale à l'Energie Atomique ( <i>International Atomic Energy Agency</i> )
<b>OMS (WHO)</b>	Organisation Mondiale de la Santé ( <i>World Health Organization</i> )
<b>NIST</b>	National Institute of Science and Technology
<b>SD</b>	Standard Deviation (Écart-type)
<b>CRM</b>	Certified Reference Material
<b>ICP-OES</b>	Spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif
<b>ELL</b>	Extraction par solvant Liquide-liquid
<b>CG/SM</b>	Chromatographie couplée a la spectrométrie de masse
<b>HE</b>	Huile essentielle
<b>Ir</b>	indices de rétention
<b>ANOVA</b>	Analyse de variances
<b>UV</b>	Ultra Violet
<b>ABTS</b>	Acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
<b>DPPH</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>mg</b>	milligramme

<b>mg/L</b>	milligramme par un litre
<b>mL</b>	millilitre
<b>%</b>	Pourcentage
<b>N°</b>	Numéro
<b>h</b>	heure
<b>GAE</b>	gallic acid equivalents
<b>IC50</b>	Concentration Inhibitrice médiane
<b>BHA</b>	HydroxyAnisolButyle
<b>BHT</b>	Butylhydroxytoluène
<b>CG-SM</b>	Chromatographie gazeuse-Spectrométrie de masse
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CMB</b>	Concentration Minimale Bactéricide
<b>DZI</b>	Diamètre de la Zone d'Inhibition
<b>DMSO</b>	Diméthyl Sulfoxyde
<b>MWHD</b>	Microwave Hydrodistillation
<b>HD</b>	Hydrodistillation
<b>HE</b>	Huile Essentielle
<b>HE-J</b>	Huile essentielle de <i>Teucrium polium</i>
<b>HE-Ba</b>	Huile essentielle de <i>Matricaria chamomilla</i>
<b>HE-MP</b>	Huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>
<b>MHA</b>	gélose Mueller-Hinton
<b>PAM</b>	Plantes Aromatique et Médicinale
<b>pH</b>	potentiel d'Hydrogène
<b>PPG</b>	Patte Postérieure Gauche
<b>TR</b>	Temps de Rétention

---

## Résumé

La détermination qualitative et quantitative d'éléments chimiques et de composés organiques, à l'état de traces dans différentes matrices biologiques et environnementales en utilisant des techniques nucléaires et / ou non-nucléaires, présente un grand intérêt pour les sciences de la vie.

Afin de mesurer la concentration des éléments minéraux, il existe de nombreuses techniques analytiques pour déterminer la concentration telles que la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-OES) et l'analyse par activation neutronique instrumentale, mais la méthode d'INAA donne une bonne exactitude et précision, avec la possibilité de son utilisation jusqu'à ppm (ng/g). De plus, pour les composés organiques, et notamment les huiles essentielles, il existe toujours la méthode de chromatographie en phase gazeuse combinée à une méthode de spectrométrie de masse qui donne de bons résultats.

À l'échelle mondiale, les plantes médicinales sont actuellement considérées comme des médecines douces et alternatives et de plus, les tendances récentes favorisent l'utilisation de produits naturels, de préférence biologiques et ce, dans tous les domaines de la vie quotidienne. Mais, ils contiennent des composés actifs soit organiques et / ou inorganiques (minéraux) qui lui confèrent des effets puissants et nécessitent donc une certaine vigilance et un minimum de connaissances quant à son utilisation.

À ce titre, le but de ce travail est d'étudier des plantes cultivées en Algérie en particulier : *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L., sous l'aspect minéral, organique, phytochimique et semi-pharmaceutique.

Les résultats des concentrations des éléments minéraux dans les plants déterminés par INAA, ICP-OES, sont presque comparables. Par ailleurs, les plantes étudiées ont montré qu'elles étaient riches en minéraux nécessaires à l'homme, tels que le calcium, le potassium, le fer, le sodium, le magnésium, le manganèse et le zinc. De plus, les teneurs en éléments toxiques étaient nettement inférieures aux valeurs toxicologiques de référence relativement aux limites de tolérance fixées par l'organisation mondiale de la santé (OMS), ce qui a conféré à ces plantes ses propriétés pharmaceutiques et médicinales particulières.

Grâce aux données obtenues dans ce travail, qu'il s'agisse d'un élément minéral, d'un composé organique ou d'activités phytopharmaceutiques sur les plantes médicinales algériennes à étudier, il est possible de déterminer la consommation quotidienne et l'utilisation de ces plantes par groupes sociaux et professionnels au niveau national, tels que l'utilisation en cuisine, en médecine traditionnelle ou dans les préparations pharmaceutiques.

**MOTS CLES :** Éléments minéraux, Technique Nucléaire, ICP-OES, INAA, Spectrométrie gamma, Plantes Médicinales, *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., *Mentha pulegium* L., activité biologique.

---

---

## Abstract

The qualitative and quantitative determination of chemical elements and organic compounds, at trace levels in different biological and environmental matrices using nuclear and / or non-nuclear techniques, are of great interest to life sciences.

In order to measure the concentration of mineral elements, there are many analytical techniques to determine the concentration, such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-OES), instrumental neutron activation analysis (INAA), but the INAA methods give a good accuracy and precision, with the possibility of their use up to ppm (ng / g). In addition, for organic compounds, particularly in essential oils, there is always the gas chromatography method combined with a mass spectrometry method (GC-MS) which gives good results.

At international scale, the medicinal plants were currently considered as soft and alternative medicine, and recent trends favor the use of natural products, preferably naturally organic, in all areas of daily life. However, they contain active compounds either organic and / or inorganic (minerals) which give it powerful effects and therefore require a certain vigilance and a minimum of knowledge as to its use.

Based on these reasons, the aim of this work is to study plants cultivated in Algeria in particular : *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., and *Mentha pulegium* L., under the mineral, organic, phytochemicals, and semi-pharmaceutical aspects.

The results of the concentrations of mineral elements in the plants determined by INAA and ICP-OES, were found almost comparable. Moreover, the studied plants showed that they are rich in minerals necessary for the human body, such as calcium, potassium, iron, sodium, magnesium, manganese, zinc. In addition, the levels of toxic elements were significantly lower than the toxicological reference values compared to the tolerance limits set by the World Health Organization, which gave these plants their particular pharmaceutical and medicinal properties.

Based on these data obtained in this work, whether it is about mineral elements, organic compounds and phytopharmaceutical activities on algerian medical plants to be studied, it is possible to determine the daily consumption and the use of these plants by social and professional groups, at the national level, like use in cooking, traditional medicine and in pharmaceutical preparations.

**KEYWORDS:** Mineral elements, Nuclear Technique, ICP-OES, INAA, Gamma spectrometry, Medicinal plants, *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., *Mentha pulegium* L., biological activity.

---

## الملخص

إن التحديد النوعي والكمي للعناصر الكيميائية والمركبات العضوية وبالخصوص عند مستويات منخفضة التركيز في المصفوفات البيولوجية والبيئية المختلفة على حد سواء، باستخدام التقنيات النووية و / أو غير النووية، لها أهمية كبيرة في علوم الحياة.

من أجل قياس تركيز العناصر المعدنية، هناك العديد من التقنيات التحليلية لتحديد التركيز، نذكر على سبيل المثال، مقياس الطيف الكتلي للبلازما المقترن حثيًا (ICP-OES) و تحليل التنشيط النيوتروني (INAA) ، حيث تعتبر طريقة INAA الأكثر دقة وفي التحديد وقياس التركيز، مع إمكانية استخدامها في تحديد يصل إلى الجزء في المليون (نانوغرام / غرام). أما بالنسبة للمركبات العضوية، و خاصة المتواجدة في الزيوت الأساسية، هناك دائمًا طريقة كروماتوغرافيا الغاز جنبًا إلى جنب مع طريقة قياس الطيف الكتلي (GC-MS) ، و هي الطريقة التي تعطي نتائج جد دقيقة.

على المستوى العالمي، تُعتبر النباتات الطبية حاليًا من الأدوية الناعمة والبديلة، علاوة على ذلك، نجد أن الاتجاهات الحديثة تفضل استخدام المنتجات الطبيعية في جميع مجالات الحياة اليومية. لكن، هذا لا يمنع أن هذه الأخيرة ممكن لها أن تحتوي على مركبات نشطة إما عضوية و / أو غير عضوية (معادن)، يمكن أن تمنحها تأثيرات جانبية، و بالتالي تتطلب يقظة و كذا معرفة على أساس علمي حول أدنى حد فيما يتعلق باستخدامها.

بناءً على هذه الأسباب، فإن الهدف من هذا العمل هو دراسة نباتات تنمو في الجزائر، و ركزنا على وجه الخصوص على النباتات التالية: *Teucrium polium L.* ، *Matricaria chamomilla L.* و *Mentha pulegium L.* ، بالأخص على الدراسة المعدنية والعضوية و كذلك الدراسة البيولوجية شبه-الصيدلانية.

ان النتائج تركيز العناصر المعدنية في النباتات التي تم تحديدها بطريقتان هما : INAA و ICP-OES ، وجدنا أنها قابلة للمقارنة تقريبًا. علاوة على ذلك، أظهرت النباتات التي تمت دراستها أنها غنية بالمعادن الضرورية لجسم الإنسان، مثل الكالسيوم، الحديد، البوتاسيوم، والصوديوم، والمغنيسيوم، والمنغنيز، والزنك. بالإضافة إلى ذلك، كانت مستويات العناصر السامة أقل بكثير من القيم المرجعية السمية مقارنة بحدود التحمل التي وضعتها منظمة الصحة العالمية، مما أعطت هذه النباتات المدروسة في هذا العمل، خصائص الصيدلانية والطبية جد معتبرة.

بناءً على هذه البيانات التي تم الحصول عليها في هذا العمل، سواء كان الأمر يتعلق بالعناصر المعدنية والمركبات العضوية والأنشطة الصيدلانية للنباتات الطبية الجزائرية التي تمت دراستها، فإنه من الممكن تحديد الاستهلاك اليومي وكذا استخدام هذه النباتات من قبل الفئات الاجتماعية والمهنية على المستوى الوطني، على سبيل المثال استخدامها في الطبخ والطب التقليدي والمستحضرات الصيدلانية.

**الكلمات المفتاحية:** العناصر المعدنية، التقنية النووية، INAA ، ICP-OES ، مقياس طيف جاما ، النباتات الطبية، *Teucrium polium L.*، *Matricaria chamomilla L.*، *Mentha pulegium L.* ، النشاط البيولوجي.

---

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1</b>	Les bienfaits de la présence des oligo-éléments dans l'organisme humain	06
<b>Tableau II.1</b>	Conditions expérimentales d'INAA	22
<b>Tableau III.1</b>	Concentrations en mg/kg des éléments chimiques contenus dans les plantes étudiées : <i>T. polium</i> L., <i>M. chamomilla</i> et <i>M. pulegium</i> L.	40
<b>Tableau III.2</b>	Évaluation de la qualité des résultats analytiques basée sur la comparaison entre les valeurs calculées et certifiées de standards NIST-1573a, NIST-1570a, IPE 189 et IPE 172	43
<b>Tableau III.3</b>	Valeurs d'apport (mg/jour, personne) de certains éléments essentiels et l'apport journalier tolérable pour les adultes (70 kg) (Tolerable Daily Intake) de certains éléments toxiques selon l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO/WHO).	45
<b>Tableau III.4</b>	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i>	54
<b>Tableau III.5</b>	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Matricaria chamomilla</i> .	55
<b>Tableau III.6</b>	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> .	57
<b>Tableau III.7</b>	Propriétés physico-chimiques des HE extraites à partir des plantes étudiées	58
<b>Tableau III.8</b>	Comparaison de nos résultats pour les composés dominants des HEs de <i>M. pulegium</i> avec ceux donnés publiés à littérature.	59
<b>Tableau III.9</b>	Comparaison des composés majoritaires obtenus de l'HE de <i>T. polium</i> avec ceux publiés dans la littérature.	60
<b>Tableau III.10</b>	Comparaison des résultats obtenus pour les composés majoritaires de l'HE de <i>M. chamomilla</i> L. avec ceux publiés par la littérature	61
<b>Tableau III.11</b>	Rendement (%) d'extraction des parties aériennes des plantes <i>Teucrium polium</i> L., <i>Matricaria chamomilla</i> L. et <i>Mentha pulegium</i> L.	62
<b>Tableau III.12</b>	Teneurs en composés phénoliques contenus dans les plantes étudiées	63

---

---

<b>Tableau III.13</b>	Rendements en flavonoïdes totaux (TFC) contenus dans les extraits méthanoliques des parties aériennes de plantes <i>Teucrium polium</i> L., <i>Matricaria chamomilla</i> L. et <i>Mentha pulegium</i> L.	64
<b>Tableau III.14</b>	Comparaison des résultats des TPC et TFC obtenus ( <i>T. polium</i> L., <i>M. chamomilla</i> L. et <i>M. pulegium</i> L.) avec ceux donnés par la littérature	65
<b>Tableau III.15</b>	Concentration inhibitrice IC <sub>50</sub> (µg / mL) <i>in vitro</i> des extraits (huiles essentielles et extraits méthanoliques) obtenus à partir des plantes étudiées	66
<b>Tableau III.16</b>	Résultats de la capacité anti-oxydante des huiles essentielles des plantes étudiées par la méthode de l'ABTS+	69
<b>Tableau III.17</b>	% Inhibition du β-carotène / acide linoléique en fonction de la concentration des extraits	70
<b>Tableau III.18</b>	Inhibition du radical Galvinoxyl (GOR) par les extraits bruts de <i>Teucrium polium</i> L. et <i>Matricaria chamomilla</i> L., et les antioxydants de référence (en fonction de la concentration).	72
<b>Tableau III.19</b>	Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits d'huiles essentielles et méthanoliques obtenus à partir des plantes ( <i>Teucrium polium</i> L., <i>Matricaria chamomilla</i> L. et <i>Mentha pulegium</i> L.), et des antibiotiques de référence	74
<b>Tableau III.20</b>	Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Bactéricides (CMB) des huiles essentielles ( <i>Teucrium polium</i> L., <i>Matricaria chamomilla</i> L. et <i>Mentha pulegium</i> L.) et des extraits méthanoliques ( <i>Teucrium polium</i> L., et <i>Matricaria chamomilla</i> L.)	77
<b>Tableau III.21</b>	Inhibition de la butyrylcholinestérase par les extraits de <i>Teucrium polium</i> L. et <i>Matricaria chamomilla</i> L.	78
<b>Tableau III.22</b>	Inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de <i>Teucrium polium</i> L. et <i>Matricaria chamomilla</i> L.	78
<b>Tableau III.23</b>	Concentrations de 50 % d'inhibition de l'α-amylase par les extraits de <i>Teucrium polium</i> L. et <i>Matricaria chamomilla</i> L. et l'acarbose.	81
<b>Tableau III.24</b>	Inhibition en % de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> par différentes concentrations de l'extrait méthanolique par la méthode de dénaturation de la BSA	84

---

---

**Tableau III.25** Effet de l'inhibition de l'œdème par les extraits aqueux de *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., *Mentha pulegium* L. et Diclofénac de sodium (anti-inflammatoire non-stéroïdien)

---

## Liste des figures

<b>Figure I.1</b>	Processus de l'analyse par activation neutronique par la réaction (n, $\gamma$ )	07
<b>Figure I.2</b>	schématisation de la méthodologie de la méthode NAA	10
<b>Figure I.3</b>	Feuilles de <i>Teucrium polium</i> L.	16
<b>Figure I.4</b>	Feuilles et fleur de <i>Matricaria chamomilla</i> L.	17
<b>Figure I.5</b>	Feuilles de <i>Mentha pulegium</i> L.	19
<b>Figure II.1</b>	Organigramme de séparation radiochimique de l'élément Se	24
<b>Figure II.2</b>	Protocole de mise en solution des échantillons biologiques pour l'analyse des éléments minéraux par ICP-OES.	25
<b>Figure II.3</b>	Montage d'extraction par hydrodistillation (Clevenger) (A); par entraînement à la vapeur d'eau (B) et extraction par micro-ondes (C)	26
<b>Figure II.4</b>	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant.	29
<b>Figure II.5</b>	Plaque de dosage de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase des extraits de <i>Teucrium polium</i> (J) et <i>Matricaria chamomilla</i> (Ba)	34
<b>Figure II.6</b>	Plaque de dosage de l'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BChE) et l'acétylcholinestérase (AChE) des extraits de <i>Teucrium polium</i> et <i>Matricaria chamomilla</i>	35
<b>Figure II.7</b>	Photographie montrant une souris albinos pour l'essai de l'extrait de la plante <i>Mentha pulegium</i> L.	37
<b>Figure II.8</b>	Photo d'une injection sous-plantaire de la carragénine au niveau de la patte arrière gauche de la souris	37
<b>Figure II.9</b>	Photo des pattes arrière gauche et droite coupées à hauteur de l'articulation	38
<b>Figure III.1</b>	Appareillage de séparation radiochimique du sélénium	41
<b>Figure III.2</b>	Spectre de raies gamma de <i>Mentha pulegium</i> L., avant et après la séparation radiochimique	42
<b>Figure III.3</b>	Comparaison entre les valeurs mesurées et la tolérance limites des éléments essentiels et toxiques	46

---

---

<b>Figure III.4</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	63
<b>Figure III.5</b>	Courbe standard pour la solution rutine	64
<b>Figure III.6</b>	% d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des extraits (huiles essentielles, extraits méthanoliques et standards)	67
<b>Figure III.7</b>	Evaluation graphique par la méthode ABTS des activités anti-oxydantes des huiles essentielles contenues dans les trois plantes étudiées et des standards de référence	69
<b>Figure III.8</b>	% Inhibition du $\beta$ -carotène / acide linoléique en fonction de la concentration des extraits bruts des plantes étudiées et des standards de références.	71
<b>Figure III.9</b>	% Inhibition du radical Galvinoxyl (GOR) en fonction de la concentration des extraits bruts des plantes étudiées et des standards de références.	72

---

---

# Liste des publications

Au cours des années de formation doctorale 2018 à 2022, mes travaux ont abouti aux résultats suivants :

## I. Publications Internationales:

**Messaoudi, M.**; Rebiai, A.; Sawicka, B.; Atanassova, M.; Ouakouak, H.; Larkem, I.; Egbuna, C.; Awuchi, C.G.; Boubekeur, S.; Ferhat, M.A. Effect of Extraction Methods on Polyphenols, Flavonoids, Mineral Elements, and Biological Activities of Essential Oil and Extracts of *Mentha pulegium* L. *Molecules* **2022**, *27*, 11.

**Messaoudi, M.**; Begaa, S.; Benarfa, A.; Ouakouak, H.; Benchikha, N.; Ferhat, M.A. Radiochemical separation by liquid-liquid extraction for the determination of selenium in *Mentha pulegium* L.: Toxicity monitoring and health study. *Applied Radiation and Isotopes* **2020**, *159*, 109099, doi:10.1016/j.apradiso.2020.109099.

## II. Communications Internationales:

1. **Mohammed Messaoudi**, Hamza Ouakouak, Samir Begaa, N. Benchikha, Adel Benarfa, Mokhtar Benmohamed, Mohamed Amine Ferhat. Antioxidant activity and phenolic compounds of Algerian *Mentha pulegium* L. Medicinal plant used traditionally for treatment of digestive system disorders, international Seminar on Green Chemistry and Sustainable Engineering At: University of Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued, Algeria, **17-18 December 2019**.
  2. **Mohammed Messaoudi**, Samir Begaa, L. Alghem. Liquid-liquid extraction of Radiochemical separation for the determination of selenium in *Mentha pulegium* L.: Toxicity and health study, the second International Conference on Radiations and Applications (ICRA'2019)/USTHB/**28-30 October 2019**.
-

---

# Sommaire

Dédicace	
Remerciements	
Liste des abréviations	
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des publications	
Sommaire	
Introduction générale	01

## CHAPITRE I

### ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES PLANTES ÉTUDIÉES

I.1. Eléments minéraux, oligo-éléments et techniques d'analyse utilisées	04
I.1.1. Eléments minéraux	04
I.1.2. Oligo-éléments (éléments de traces)	05
I.1.3. Méthodes d'analyse des éléments de traces	06
I.1.3.1. Méthode d'Analyse par Activation Neutronique	07
I.1.3.2. d'Analyse de séparation radiochimique	09
I.1.3.3. Spectroscopie d'émission optique à plasma (ICP-OES)	12
I.2. Généralités sur quelques métabolites secondaires	13
I.2.1. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle	13
I.2.2. Composition chimique (organique) des plantes médicinales	13
I.2.2.1. Composé organique volatil (L'huile essentielle)	13
I.2.2.2. Composés organiques non volatils (les métabolites secondaires)	14
I.3. Présentation des plantes étudiées	15
I.3.1. <i>Teucrium polium</i> L.	16
I.3.1.1. Description botanique	16
I.3.1.2. Propriétés et usages thérapeutiques	16

---

I.3.2. <i>Matricaria chamomilla</i> L.	17
I.3.2.1. Description botanique	17
I.3.2.2. Propriétés et usages thérapeutiques	18
I.3.3. <i>Mentha pulegium</i> L.	18
I.3.3.1. Description botanique	18
I.3.3.2. Utilisations en médecine traditionnelle	19

## CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES

	20
II.1. Introduction	21
II.2. Matériel végétal	21
II.2.1. Critères de choix des plantes	21
II.2.2. Échantillonnage	21
II.3. Analyses élémentaires	21
II.3.1. Analyses par la technique INAA	21
II.3.1.1. Echantillonnage	21
II.3.1.2. Irradiation et mesure	22
II.3.1. Analyses par la technique INAA	23
II.3.1. Analyses par la technique ICP-OES	24
II.4. Extraction des HE et les extraits brut et leur application biologique	25
II.4.1. Extraction des huiles essentielles	25
II.4.2. Extraits bruts (extraction par la méthode de macération)	27
II.4.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux	27
II.4.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux	28
II.4.3. Mise en évidence des activités biologiques des HE et des extraits bruts	28
II.4.3.1. Evaluation des activités antioxydants ( <i>in vitro</i> )	28
II.4.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne ( <i>in vitro</i> )	31
II.4.3.3. Evaluation des activistes enzymatiques ( <i>in vitro</i> )	33
II.4.3.3.1. Evaluation des activistes antidiabétique	33
II.4.3.3.2. Evaluation des activistes Anti-Alzheimer	35
II.4.3.3.3. Evaluation des activistes anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	36
II.4.3.3. Evaluation des activistes anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	36
II.5. Analyse statistique	38

---

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Introduction	39
III.2. Analyse des éléments minéraux	39
III.2.1. Calcul des concentrations élémentaires (minéral)	39
III.2.2. Évaluation des résultats et qualité –contrôle / qualité assurance	42
III.2.3. Évaluation de l'ingestion diététique des éléments traces (RDA)	44
III.3. l'analyse des compositions chimique organique (composé organique volatil et non volatil)	53
III.3.1. Huiles essentielles des plantes	53
III.3.2. les extraits bruts (extraits méthanoliques)	62
III.3.2.1. Rendement d'extraction	62
III.3.2.2. Teneur des composés phénoliques	62
III.3.2.3. Évaluation de teneurs en flavonoïdes	63
III.4. Etude des activités biologiques des huiles essentielles et extraits méthanoliques	66
III.4.1. Pouvoir antioxydant les HE et les extraits méthanolique <i>in vitro</i>	66
III.4.1.1. Activité antioxydant déterminée par la méthode du DPPH	66
III.4.1.2. Activité antioxydant déterminée par la méthode de l'ABTS+	69
III.4.1.3. Activité antioxydant par test de blanchiment du $\beta$ -carotène	70
III.4.1.4. Activité du piégeage du radical Galvinoxyl (GOR)	71
III.3.2. Pouvoir antimicrobien <i>in vitro</i>	73
III.3.3. Activité enzymatique <i>in vitro</i>	78
III.3.3.1. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer (anticholinestérase)	78
III.3.3.2. Evaluation de l'activité antidiabétique <i>in vitro</i>	81
III.3.3.3. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	83
III.3.4. Pouvoir anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	85
Conclusion général	88
Références	91
Annexes	104
Publications internationales	105

---

---

# *Introduction Générale*

---

# Introduction générale

Pendant des années, les herbes fines et les plantes médicinales et aromatiques ont fourni des remèdes pour presque tous les types de pathologies, avec leurs nombreuses propriétés thérapeutiques [1–3], elles sont utiles pour la prévention et pour améliorer l'état de bien-être général, surtout si elles s'accompagnent d'une alimentation saine. Généralement, les plantes médicinales sont cultivées et transformées à des fins culinaires, cosmétiques, industrielles et médicinales ainsi que pour l'élaboration de parfums. Une grande partie de l'intérêt manifesté initialement à leur égard et aux produits naturels et qui repose sur les utilisations médicinales. Les plantes et les herbes à parfum ne sont habituellement pas consommées en grandes quantités, mais utilisées comme assaisonnements ou comme médicament traditionnels où une petite quantité ajoutée de façon régulière et significative aux aliments permet de contribuer à améliorer la qualité de l'alimentation [4].

La majorité des études sur les plantes ont été réalisées *in vitro* à partir des extraits végétaux. L'extrait est utilisé afin d'être en mesure d'isoler et de concentrer les principes actifs, ainsi que pour comprendre les mécanismes d'action. De nombreuses études sur les plantes traitent des propriétés pharmacologiques ; et ces études sont citées soit dans des ouvrages, soit dans des journaux spécialisés ou encore présentées lors de congrès scientifiques ; utilisées pour leurs vertus médicinales, notamment antispasmodiques et analgésiques, les huiles essentielles (HE) ont aussi des propriétés antitussives et expectorantes, vasodilatatrices et anti-inflammatoires (en application externe), astringentes, immuno-stimulantes et vermifuges [5,6].

D'une façon générale les plantes médicinales sont utilisées de médecine dite douce, néanmoins, elles contiennent des composés actifs organiques et / ou inorganiques (minéraux) qui leurs confèrent des effets puissants, ce qui nécessite, par conséquent, une certaine vigilance et un minimum de connaissances concernant leurs usages. Par ailleurs, les tendances actuelles favorisent le recours à des produits naturels, de préférence biologiques, dans tous les domaines de la vie quotidienne [4]. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'étude de certaines plantes endémiques cultivées en Algérie notamment : (*Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L., cette étude porte sur l'étude des huiles essentielles et des extraits bruts, ainsi qu'à la détermination des composants chimiques (organiques et non-organiques) suivie de plusieurs applications biologiques sur les plantes sélectionnées.

Les éléments minéraux sont très importants, en particulier les micro- et macronutriments pour de divers métabolismes, où il a été constaté que près de la moitié des éléments du tableau de Mendeleïev sont biologiquement nécessaires à l'homme. Aussi des études récentes confirment le rôle majeur que jouent les éléments minéraux essentiels et non-essentiels pour la santé humaine comme : Ca, Fe, Zn, Se, ... De ce fait, parmi les objectifs assignés à notre travail (première partie) est de déterminer les concentrations de plusieurs éléments minéraux dans les plantes étudiées (*Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., et *Mentha pulegium* L. ) par l'utilisation des techniques nucléaires d'Analyse par Activation Neutronique (INAA) et par l'utilisation de la spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif (ICP-OES).

La deuxième partie est divisée en trois volets, dont le premier sera consacré à l'analyse de composés organiques volatils (huiles essentielles) extraits des échantillons ciblés. Quant au deuxième volet, il concernera l'analyse des composés organiques non volatils (les extraits bruts ou extraits méthanoliques). Et enfin, le troisième volet sera focalisé sur l'étude des activités

biologiques des HEs et des extraits des échantillons étudiés, avec quelques recommandations envisagées qui y seront exposées.

Ce travail de thèse se compose de trois chapitres ; le premier touchera une synthèse bibliographique portant sur des généralités sur les plantes médicinales avec des descriptions et des informations utiles en particulier sur les plantes étudiées, ainsi qu'une étude bibliographique sur les bio-métaux et sur les méthodes de leurs analyses : (activation neutronique, spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif (ICP-OES)).

Le deuxième chapitre sera consacré au matériel et aux méthodes utilisées pour l'analyse. Le troisième chapitre, sera voué à la présentation des résultats et de leurs interprétations.

Enfin, nous conclurons cette thèse par une conclusion générale et des perspectives envisagées.

---

# *Chapitre I*

---

## *Étude bibliographique sur les plantes étudiées*

---

## Etudes bibliographiques

### I.1. Les éléments minéraux, oligo-éléments et techniques d'analyse utilisées

#### I.1.1. Éléments minéraux

Les éléments minéraux sont des substances inorganiques nécessaires pour les corps humains [7,8]. Au total, les éléments minéraux représentent environ 4% du poids corporel mais interviennent dans une large gamme de fonctions : minéralisation, contrôle de l'équilibre en eau, systèmes enzymatiques et hormonaux, systèmes musculaire, nerveux et immunitaire [9,10]. Les personnes ont des exigences différentes pour chaque minéral et ce, en fonction de leur âge, de leur sexe, de leur état physiologique (grossesse). Les minéraux sont essentiels à l'organisme en combinaison avec d'autres nutriments ; ils assurent le bon fonctionnement de l'organisme. Ils sont souvent absorbés plus efficacement par le corps s'ils sont fournis dans les aliments plutôt que sous forme de compléments. Une alimentation variée aidera à assurer un approvisionnement adéquat de la plupart des minéraux pour l'ensemble des personnes [11,12].

En général, les éléments chimiques présents dans le corps humain et / ou les besoins de leurs aliments sont répartis en trois groupes en fonction de leurs concentrations [13,14] :

1. Cinq éléments de base (C, H, N, O, S) à des concentrations de plusieurs grammes par kilo.
2. Macro-minéraux (Ca, Mg, P, Na, K, Cl) aux concentrations de l'ordre du gramme par kilo et au rôle structurel et fonctionnel.
3. Oligo-éléments, de l'ordre des milligrammes ou microgrammes par kilogramme.

D'autre part, les éléments chimiques sont divisés en termes d'importance ou non, en trois groupes [15,16]:

- Les éléments chimiques essentiels
- Les éléments chimiques non-essentiels
- Les éléments toxiques

On considère un élément chimique comme essentiel pour le corps humain, lorsqu'un apport insuffisant entraîne une perturbation fonctionnelle et que la supplémentation en cet élément à des taux physiologiques empêche ou corrige la perturbation.

### I.1.2. Oligo-éléments (éléments de traces)

Longtemps considérés comme des facteurs marginaux de la biologie et de la nutrition de l'homme, les oligo-éléments ont gagné ces dernières années leurs lettres de noblesse et connaissent même un engouement excessif auprès du grand public. Les oligo-éléments sont des éléments chimiques trouvés en très petites proportions dans les organismes vivants, végétaux et animaux. Ils constituent une classe de nutriments dont la définition ne repose ni sur des propriétés chimiques ni sur des propriétés biologiques homogènes [17,18]. Les oligo-éléments, autrement appelés « éléments de traces », sont les catalyseurs biologiques indispensables au fonctionnement harmonieux des systèmes protéique, enzymatique et génétique [19]. Ces catalyseurs facilitent les fonctions biologiques en diminuant le temps et l'énergie nécessaires à leur réalisation. Les oligo-éléments jouent des rôles spécifiques, puisqu'ils interviennent aux niveaux chimique, physique et informationnel. Ils se comportent comme des cofacteurs enzymatiques, potentialisateurs et activateurs d'enzymes. Ils interviennent aussi bien dans les réactions d'hydrolyse d'anions peptidiques et d'esters phosphoriques, que dans les processus de décarboxylation ou d'oxydoréduction. Ils ont également un rôle important dans la synthèse des protéines et dans leurs stabilités et, enfin, ils s'intègrent dans la structure moléculaire de l'enzyme [20].

Dans le domaine de la santé et de la nutrition on connaît actuellement le rôle d'un grand nombre d'éléments de traces dans les organismes vivants. Les éléments de traces ainsi que les macroéléments, font l'objet de recherches touchant tous les domaines [8,21] : que ce soit la biochimie, la nutrition, l'agriculture, l'environnement, la chimie clinique, etc, ... Leur efficacité métabolique a été démontrée et nous savons aujourd'hui, qu'ils concourent à l'équilibre biologique et physiologique de l'organisme dont ils sont les catalyseurs indispensables. Le déséquilibre nutritionnel, fréquent dans nos sociétés induit des carences nombreuses et variées, qui vont jusqu'à briser les chaînes enzymatiques, entraînant différentes pathologies. Les oligo-éléments devraient être apportés par nos aliments qui sont souvent eux-mêmes carencés et ne remplissent pas leurs rôles essentiels comme sources d'approvisionnements. Ainsi, près de 10% de la population est carencé en zinc et en sélénium ou en fer. Ce constat est le résultat d'erreurs écologiques graves, mais aussi celui de régimes et de modes nutritionnelles souvent aussi aberrantes que fantaisistes [7,10,22].

Les oligo-éléments sont des activateurs essentiels de nombreux mécanismes biologiques sur le plan digestif, musculaire, circulatoire ou cérébral. Bien que présents en très faibles quantités

dans le corps, ils sont indispensables à son fonctionnement et au maintien de son équilibre [7,11,22], Le tableau (1) résume le rôle et les sources alimentaires de quelques éléments de traces tels que Cr, Cu, Fe, F, I, Mn, Se et Zn.

**Tableau I.1** : Les bienfaits de la présence des oligo-éléments dans l'organisme humain

Oligo-éléments	Source alimentaire	Rôle
Fer (Fe)	Boudins, abats, cacao, légumineuses, jaunes d'œufs, fruits secs	Transporte l'oxygène dans les globules rouges
Fluor (F)	Eau de boisson, sels fluorés, poissons de mer	Participe à la fixation du calcium au niveau des os et de l'émail dentaire
Chrome (Cr)	Levure de bière, foie, rognons, germes de blé, pomme de terre	Agit sur le métabolisme des graisses et aide à diminuer le taux du cholestérol
Cuivre (Cu)	Foies d'animaux, coquillages, crustacés, légumes secs	Anti-inflammatoire, Anti-infectieux Affections rhumatismales inflammatoires.
Iode (I)	Algues, fruits de mer, ails, oignons, navets	Contribue au bon fonctionnement de la glande thyroïdale.
Zinc (Zn)	Huîtres, pain complet, foies, jaunes d'œufs, viandes, coquillages,...	Cofacteur des différentes fonctions dont croissance, immunité et réparation de la peau.
Sélénium (Se)	Céréales complètes, viandes, volailles, poissons	Détruit les radicaux libres. Contribue à renforcer les défenses de l'organisme.
Manganèse (Mn)	Céréales, légumes, soja, œufs, café	Etats allergiques.

### I.1.3. Méthodes d'analyse des éléments de traces

Compte tenu de leurs faibles quantités, les éléments de traces sont presque toujours mesurés en utilisant une propriété physique bien spécifique. Les propriétés les plus couramment mises à contribution sont : (la masse de l'élément dans l'échantillon, l'énergie des rayons X de l'élément, la radioactivité de l'élément, ...). Il y a plusieurs techniques qui permettent de mesurer les éléments de traces [23] :

- Analyse par activation neutronique (NAA)
- Émission de rayons X induite par proton (PIXE)
- Spectrométrie d'absorption atomique (AAS)
- Spectrométrie d'émission atomique ICP (*Induced Coupled Plasma*).

Le choix d'une méthode d'analyse pour la détermination des éléments chimiques existants dans un échantillon donné est basé sur plusieurs critères à savoir :

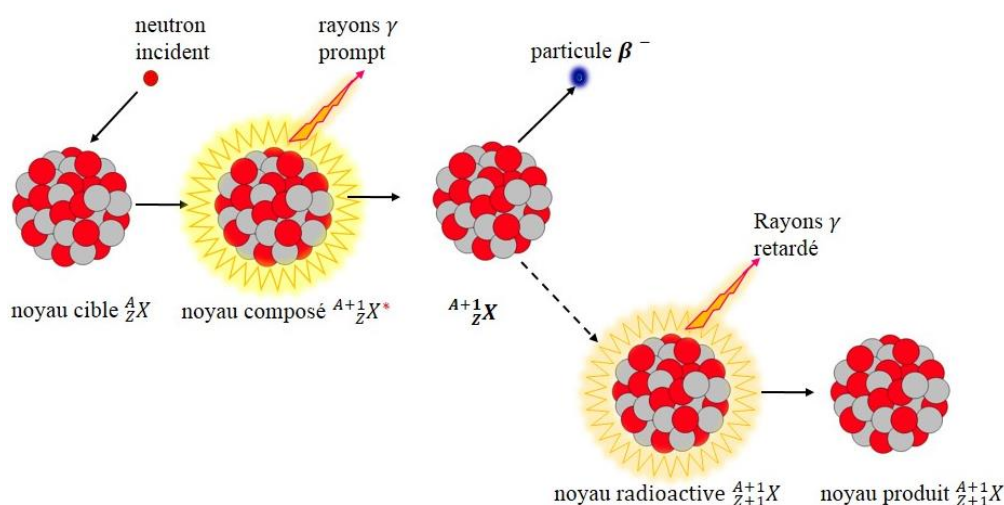
Forte sensibilité pour de faibles concentrations avec une grande précision d'analyse.

Dans ce travail pour nos échantillons, nous avons opté pour la technique nucléaire par activation neutronique (INAA) et la technique de séparation radiochimique RNAA.

### I.1.3.1. Méthode d'Analyse par Activation Neutronique

L'analyse par Activation Neutronique instrumentale (INAA) est une méthode analytique qui permet de déterminer les concentrations d'éléments chimiques dans un grand nombre de matériaux. Indépendamment de l'état d'oxydation des éléments, la méthode INAA permet de détecter un nombre important d'éléments aux concentrations extrêmement faibles. L'échantillon est d'abord rendu radioactif par bombardement avec des projectiles nucléaires, pour que par la suite les isotopes radioactifs formés soient identifiés et leurs concentrations élémentaires déterminées par l'analyse du spectre des rayons gamma qu'ils émettent lors de la désexcitation du noyau final ; la mesure se faisant à l'aide d'un détecteur semi-conducteur au germanium. On choisit un pic photoélectrique le plus intense pour la mesure de chaque élément et le plus dégagé des chevauchements correspond à l'absorption d'un rayon  $\gamma$  par le détecteur. L'aire sous ce pic est une mesure de l'abondance de l'élément initial [24,25].

L'analyse par activation neutronique est basée sur la mesure de l'activité des rayonnements émis par le radionucléide lors de sa décroissance. En effet, lorsque le noyau  ${}^A_ZX$  est bombardé par un neutron, un noyau composé excité  ${}^{A+1}_ZX^*$  se forme. La désexcitation du noyau composé produit un noyau  ${}^{A+1}_ZX$  radioactif accompagné de l'émission d'un rayonnement gamma appelé *gamma prompt* (prompt gamma ray). Le noyau produit se désintègre par décroissance  $\beta^-$  et  $\gamma$  qui sont appelés *rayonnements gamma retardés* (*delayed gamma ray*) (voir la figure 1). L'énergie du rayonnement gamma émis, identifie l'élément émetteur, et son intensité est proportionnelle à sa quantité dans l'échantillon.



**Figure I.1** : Processus de l'analyse par activation neutronique par la réaction (n,  $\gamma$ )

La concentration de l'élément dans l'échantillon à analyser est calculée par l'équation fondamentale de l'analyse par activation neutronique voir (I.1), (où l'échantillon et le standard sont irradiés dans les mêmes conditions).

$$\rho(\mu\text{g} / \text{g}) = \frac{\left[ \frac{N_p/t_m}{DC} \right]_e}{\left[ \frac{N_p/t_m}{DC} \right]_s} \cdot \frac{[\rho W]_s}{W_e} \quad (\text{I.1})$$

Avec :

$$N_p = \frac{\sigma \phi N_a w \theta \gamma \varepsilon(E)}{\lambda M} (1 - e^{-\lambda t_i}) e^{-\lambda t_d} (1 - e^{-\lambda t_m}) \quad (\text{I.2})$$

$$D = e^{-\lambda t_d} \quad (\text{I.3})$$

$$C = \frac{1 - e^{-\lambda t_m}}{\lambda t_m} \quad (\text{I.4})$$

Où :

$N_p$  : nombre de coups sous le pic d'absorption totale,

$D$  : facteur de décroissance,

$C$  : facteur de collection,

$t_m$  : temps de collection,

$W_e, W_s$  : Masse de l'échantillon, masse du standard,

$\sigma$  : section efficace

$\phi$  : flux neutronique.

$N_a$  : nombre d'Avogadro,

$w$  : masse de l'élément dans l'échantillon,

$\theta$  : rapport isotopique,

$\gamma$  : taux d'embranchement,

$\varepsilon(E)$  : efficacité de détection pour l'énergie E de l'installation de mesure,

$M$  : masse atomique de l'élément analysé.

$t_i, t_d$  : temps d'irradiation, de décroissance,

$\lambda$  : constante de désintégration.

Afin d'estimer l'exactitude de la méthode, on compare la concentration de l'élément dosé dans le standard témoin avec celle donnée par le fournisseur. L'exactitude est déterminée selon les paramètres des standardisations  $Z_{\text{score}}$  et  $U_{\text{score}}$  définis comme suit :

Accepté si :

Satisfaisant si  $Z\text{-scorer} \leq 2$ , discutable pour  $2 < Z\text{-score} < 3$  et insatisfaisant pour  $Z\text{-score} \geq 3$ .

$U\text{-scorer} \leq 1$  est satisfaisant et insatisfaisant si  $U\text{-score} > 1$ .

$$U_{\text{score}} = \frac{|X_{\text{Lab}} - X_{\text{Ref}}|}{\sqrt{\mu_{\text{Lab}}^2 + \mu_{\text{Ref}}^2}} \quad (\text{I.5})$$

$$Z_{\text{score}} = \frac{X_{\text{lab}} - X_{\text{Ref}}}{\mu_{\text{Ref}}} \quad (\text{I.6})$$

Avec :

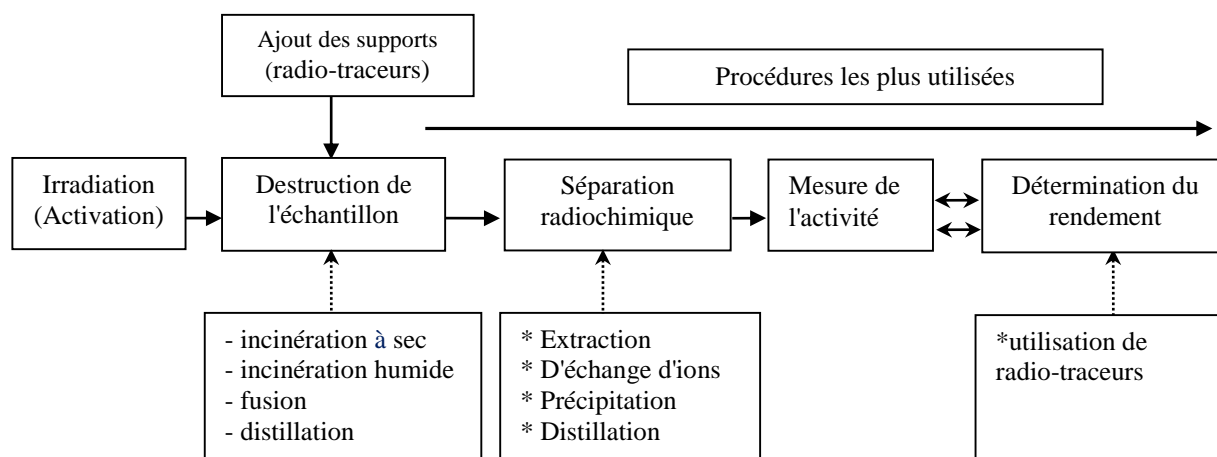
$x_{\text{Lab}}$  et  $\mu_{\text{Lab}}$  : résultats de laboratoire et l'écart-type respectivement

$x_{\text{Ref}}$  et  $\mu_{\text{Ref}}$  : la valeur des incertitudes et l'écart-type respectivement.

### I.1.3.2. Méthode d'Analyse de séparation radiochimique

#### a) Principes et définition

La méthode INAA permet de déterminer près de 40 éléments, sauf pour certains qui sont dans des concentrations assez faibles dans la matière géologique ou biologique et qui ne peuvent être mesurées qu'après la séparation radiochimique, Il y a aussi des d'éléments spécifiques qui sont difficiles à déterminer en raison des pertes de masse au cours de la préparation des échantillons. Pour ces éléments, l'analyse par activation neutronique radiochimique (RNAA) reste une technique très précise [26]. Dans les dernières décennies, la RNAA est devenue une technique d'analyse exceptionnelle pour des déterminations précises et sensibles d'un bon nombre d'oligo-éléments. Ceci est dû aux caractéristiques de la technique, une sensibilité extrême pour de nombreux éléments et une bonne sélectivité. La méthode RNAA permet le dosage des oligo-éléments tels que Se, I, Hg, Cd, etc, ... [27–30]. La procédure de séparation radiochimique appliquée sur un échantillon radioactif est basée sur trois étapes qui sont : irradiation, séparation et comptage (voir figure 2). Le processus d'activation par des neutrons est exactement le même que pour l'analyse par activation neutronique instrumentale (INAA). La méthode RNAA peut utiliser tous les procédés de séparation classiques disponibles comme l'extraction par solvant, la chromatographie d'échange d'ions et la précipitation.



**Figure I.2 :** schématisation de la méthodologie de la méthode RNAA

Pour déterminer la concentration de l'élément ciblé (choisir) dans les échantillons analysés, nous avons utilisé l'équation suivante :

$$\rho(\mu\text{g/g}) = \frac{\left[\frac{N_p/t_m}{DC}\right]_e}{\left[\frac{N_p/t_m}{DC}\right]_s} \cdot \frac{[\rho W]_s}{W_e * R} \quad (\text{I.7})$$

Avec :  $R$  : rendement de séparation

### b) Avantages et limitations

L'analyse par activation neutronique radiochimique (RNAA) est employée dans les cas où la sensibilité est exigée. Dans cette méthode, des séparations radiochimiques sont effectuées sur l'échantillon irradié dans un but d'isoler un élément et / ou un groupe d'éléments. En effet, ces séparations augmentent la sensibilité en éliminant l'interférence et en réduisant le bruit de fond avec une exactitude meilleure.

La méthode RNAA offre de nombreux avantages importants par rapport aux autres méthodes analytiques ; nous en mentionnons quelques-unes [31] :

- absence de réactif blanc.
- insensibilité à la contamination après activation.
- la RNAA est une méthode de séparation, mais aussi qui nous fournis plusieurs informations sur le même échantillon.

Bien que la méthode RNAA soit considérée comme une méthode de référence précise [32], elle a des limites de détection. Le tableau I.2 illustre les limites de détection obtenues avec RNAA exprimée en  $\text{ng.g}^{-1}$  pour des concentrations de nombreux éléments.

**Tableau I.1** : Limites de détection obtenues en  $ng.g^{-1}$  par la méthode RNAA

Élément	Limite de détection $ng.g^{-1}$	Élément	Limite de détection $ng.g^{-1}$
Bismuth (Bi)	1	Mercure (Hg)	0,1
Cérium (Ce)	1	Néodyme (Nd)	1
Dysprosium (Dy)	0,1	Palladium (Pd)	1
Erbium (Er)	1	Platine (Pt)	1
Europium (Eu)	0,1	Rhénium (Re)	0,1
Gadolinium (Gd)	1	Rubidium (Rb)	0,2
Or (Au)	1	Samarium (Sm)	0,1
Holmium (Ho)	1	Terbium (Tb)	1
Indium (In)	1	Thallium (Tl)	0,1
Iridium (Ir)	0,02	Thulium (Tm)	1
Lanthane (La)	1	Ytterbium (Yb)	2
Lutécium (Lu)	0,3		

Dans ce travail, on s'est basé sur la méthode RNAA pour la détermination de l'élément du sélénium. Ce choix dépend de plusieurs facteurs :

- Premièrement, plusieurs méthodes ont été proposées pour la détermination de la teneur totale en sélénium des échantillons d'origine biologique, mais dans la plupart des cas, la détermination précise des traces du (Se) n'est pas certainement précise. La méthode RNAA, en dépit de quelques inconvénients comme par exemple le besoin d'un équipement spécial de laboratoire, est la plus adaptée pour la détermination du sélénium à des concentrations très faibles et avec une précision très significative pour des concentrations à l'état de traces et d'ultra-traces.
- Deuxièmement, ces dernières années beaucoup de revues ont décrit le développement de la recherche de l'élément du sélénium, et la détermination du sélénium à l'état de traces est d'une grande importance en sciences de la vie en raison de son bivalent comme élément essentiel et comme substance toxique. Aussi, bien que sa prévention du cancer [33]. Le sélénium est considéré comme un élément à double rôle : à dose faible, il est un nutriment essentiel à la vie des animaux et des humains. Par contre à doses élevées, il devient toxique. Le sélénium est un oligoélément essentiel à plusieurs voies métaboliques importantes [34–37], y compris le métabolisme de l'hormone thyroïdienne, les systèmes de défense antioxydants et les fonctions immunisées [38,39]. Bien que le sélénium soit un élément toxique, il est un oligo-élément essentiel nécessaire à la prévention d'un certain nombre de maladies de carence graves chez diverses espèces

de bétail et de volaille [29,40]. Les composés du sélénium sont impliqués avec la vitamine E pour la prévention d'un grand nombre de maladies de carence nutritionnelle, Toutefois, en excès, il provoque des cancers, des déformations des cheveux et des ongles, des vertiges et même dans certains cas des dépressions et de la nervosité [27,41].

Il y a de nombreux éléments à l'état de traces et d'ultra-traces dans les échantillons d'origine biologique, géologique et environnementale qui ne peuvent être déterminées par la méthode INAA, en raison de la limite de détection et même parfois à la présence d'éléments d'interférences. Cette problématique ne peut être résolue que par la mise en place de la méthode RNAA [26].

### **I.1.3.3. Spectroscopie d'émission optique à plasma et à couplage inductif (ICP-OES)**

La troisième technique utilisée dans ce travail, pour l'analyse les éléments minéraux, est l'ICP-OES (La spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif).

L'ICP-OES est une technique multi-élémentaire (peut analyser plus de 70 éléments), est surtout employée pour effectuer des analyses quantitatives. L'ICP-OES peut fournir une composition élémentaire quantitative en vrac d'une grande variété de types d'échantillons, y compris des poudres, des solides, des liquides et des suspensions. Les échantillons solides sont généralement dissous ou digérés à l'aide d'une combinaison d'acides. Le principe fondamental de la méthode d'analyse par l'ICP-OES, consiste à injecter l'échantillon sous forme d'un aérosol liquide directement au cœur du plasma via l'injecteur. L'échantillon sous forme liquide, est transformé en aérosol par un nébuliseur. Celui-ci introduit l'aérosol dans une chambre de nébulisation dont le rôle est de filtrer les gouttelettes de taille supérieures à 10µm. L'analyte peut ensuite être détecté et quantifié avec un spectromètre d'émission optique (OES), qui mesure l'intensité du rayonnement émis à la longueur d'onde spécifique de l'élément à partir d'atomes ou d'ions d'analyte excités thermiquement. Les mesures d'intensité sont converties en concentration élémentaire par comparaison avec des normes d'étalonnage. Cette technique est particulièrement puissante pour l'analyse chimique quantitative [42,43].

Pour déterminer la concentration des éléments chimiques présents dans les échantillons analysés, on utilise l'équation suivante :

$$C(\text{échantillon})(\text{mg}/\text{kg}) = \frac{C(\text{échantillon par ICP})(\text{mg}/\text{L}) * V(\text{minéralisation})(\text{L})}{\text{masse de la prise d'essai}(\text{kg})} \quad (\text{I.8})$$

Où : C : concentration.

## **I.2. Généralités sur quelques métabolismes secondaires**

### **I.2.1. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle**

En général, les plantes vivaient sur cette planète bien avant les humains, et ont d'abord servi à le nourrir via la cueillette puis la culture [44]. Leurs emplois ont rapidement évolué suite à leurs propriétés thérapeutiques pour traiter les blessures et les maladies [44]. Actuellement, les plantes médicinales jouent un rôle important dans de nombreux domaines, comme en alimentation, en parfumerie et en thérapeutique, où de nombreuses plantes sont utilisées comme sources de médicaments.

Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie nous montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle, et qui ont été testées, sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques, et d'autre part, seraient quasiment dépourvues de toxicité [45]. Par ailleurs, on sait que le nombre de médicaments dont les principes actifs sont extraits des végétaux sont beaucoup plus importants aujourd'hui que le nombre de médicaments obtenus uniquement par synthèse. Aussi, les plantes médicinales représentent une source importante de molécules variées pouvant être utilisées pour de multiples fins, notamment thérapeutiques.

En Algérie l'usage des plantes médicinales pour les traitements des différentes maladies remonte à bien longtemps (médecine traditionnelle).

### **I.2.2. Composition chimique des plantes médicinales**

#### **I.2.2.1. Composé organique volatil (huile essentielle)**

Les huiles essentielles sont des substances naturelles complexes possédant des caractéristiques physico-chimiques bien définies. Il s'agit d'un extrait pur et naturel provenant des plantes aromatiques. Les huiles essentielles sont définies comme l'essence de la plante, autrement dit son parfum [46,47]. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, très concentrée offrant une large gamme de principes actifs. La quantité de l'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, et parfois très faible. Pour obtenir quelques millilitres d'huiles essentielles, il est nécessaire de traiter une grande quantité de plantes fraîches. Pour cela, la phase la plus délicate pour l'obtention des huiles essentielles est la phase de l'extraction. Il existe plusieurs procédés d'extractions, mais le choix de référence porte sur les procédés traditionnels, à savoir l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation dans le cas des plantes fraîches ou sèches. La connaissance de la composition

chimique des huiles essentielles est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation et leur utilisation. L'analyse des huiles essentielles par la chromatographie en phase gazeuse (GC) est la méthode d'analyse la plus fréquemment utilisée. Les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés biologiques (antispasmodique, expectorante, rafraîchissante, diurétique, ...). Plusieurs travaux de recherche ont mis en évidence leurs puissantes activités contre les bactéries pathogènes, les champignons et même les virus [48].

### **I.2.2.2. Composés organiques non volatils (les métabolites secondaires)**

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes. Ils se trouvent généralement à des concentrations faibles dans les tissus végétaux [49]. Aussi, ils n'exercent pas de fonction directe sur les activités fondamentales de la plante. Biosynthétisées à partir de métabolites primaires, ces molécules jouent un rôle majeur dans l'interaction de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à sa survie dans son écosystème [50]. En 1987, plus de 8500 métabolites secondaires étaient déjà connus. Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les composés phénoliques. Ils représentent une valeur économique énorme (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique) [55]. D'après leur biosynthèse, les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois classes : Polyphenols, terpénoïdes et alcaloïdes [50].

#### **a) Les polyphénols**

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagés dans une autre fonction telle que : éther, ester, hétéroside, ... etc

#### **b) Les terpénoïdes**

Le terme terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène ; ces composés sont majoritairement d'origine végétale [51][52] et sont synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons et même les animaux. L'exploitation de ces composés s'effectue sur d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) via la distillation [53].

Les terpènes sont des composés hydrocarbonés naturels, de structure, soit cyclique, soit à chaîne ouverte. Leur formule brute est  $(C_5H_x)_n$  dont x est variable en fonction du degré d'insaturation

de la molécule et n pouvant prendre des valeurs (de 1 à 8) sauf dans le cas des polyterpènes où il peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base des terpénoïdes est l'isoprène de formule  $C_5H_8$ . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) [53].

### c) Les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent un groupe de métabolites secondaires très diversifiés se retrouvant chez les organismes vivant ; ils ont un large rang de types structuraux, de voies de biosynthèses et d'activités pharmacologiques. En 1803, *Derosne* a isolé le premier alcaloïde semi-pur du latex sec de l'opium (*Papaver somniferum*), une drogue utilisée depuis des siècles pour des propriétés analgésiques et narcotiques. En 1805, *Sertürner* a caractérisé cet alcaloïde et l'a nommée morphine. Puis, entre 1817 et 1820, plusieurs alcaloïdes comme la strychnine, la brucine, et la quinine ont été isolés sous forme de cristalline au laboratoire de *Pelletier* et *Caventou* en France [54].

## I.3. Présentation des plantes étudiées

D'une manière générale, le climat doux et ensoleillé de la région méditerranéenne est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales, et les plantes médicinales algériennes méritent une attention particulière. Il existerait en effet 3139 espèces décrites par *Quézel* et *Santa* [55]. La médecine traditionnelle, généralement basée sur l'emploi des plantes médicinales pour le traitement de plusieurs maladies, continue à être utilisée au cours de ces dernières années, et sa popularité à augmenter. D'autre part, les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activités tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie. Selon l'OMS, près de 80 % des populations des pays en voie de développement de la région d'Afrique ont recours à la médecine traditionnelle [56,57]. Dans cette partie, nous donnons quelques informations sur les plantes sélectionnées dans ce travail :

### I.3.1. *Teucrium polium* L.

#### I.3.1.1. Description botanique

Le genre *Teucrium* présente environ 260 espèces, vivaces, arbustes ou sous-arbrisseaux, rarement annuels, à feuilles persistantes, simples opposées et rarement entières, le plus souvent dentées, crénelées ou pennatifides, fleurs blanches, rarement multiflores et dont la réunion forme des épis ou des grappes ; tiges florales feuillues ou munies de bractées semblables aux feuilles (figure I.3) [58] .

La plante de *Teucrium polium*, en arabe connue sous le nom Jaàdah, est une petite plante blanchâtre, cotonneuse, assez commune dans l'espace méditerranéo-saharien, très polymorphe, elle croît dans les lieux rocaillieux et secs [59,60].

- Famille : labiées (synonyme : lamiacées).
- Nom scientifique : *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq.
- Nom latin : Germandrée tomenteuse
- Synonymes : *Teucrium tomentosum*, *Teucrium gnaphalodes*,
- *Teucrium chamaedrys* et *Teucrium capitatum*

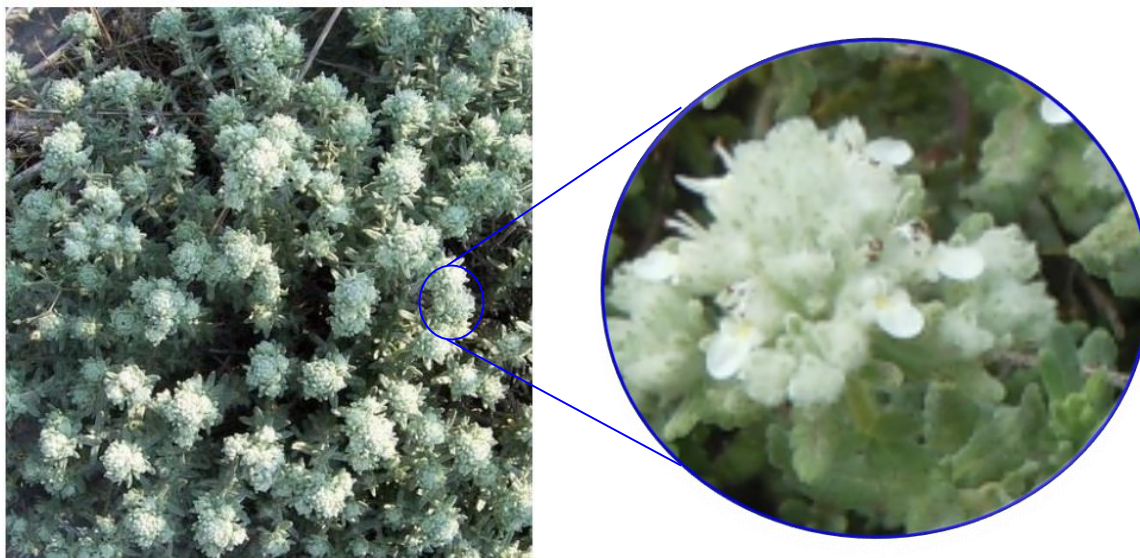


Figure I.3 : feuilles de *Teucrium polium* L.

#### I.3.1.2. Propriétés et usages thérapeutiques

La plante *Teucrium polium* L. est connue pour ses vertus thérapeutiques, par exemple : anti-inflammatoire, astringente, détersive, fébrifuge, hypoglycémiant.

Le feuillage de *T. polium* légèrement poivré, était couramment utilisé pour relever les salades ou parfumer les fromages de chèvres. Une infusion des feuilles et des fleurs était ainsi consommée comme boisson régénératrice [1]. En Algérie, cette plante médicinale est communément utilisée contre une variété de pathologies comme analgésique, antispasmodique et hypolipidémique [59].

### **I.3.2. *Matricaria chamomilla* L.**

#### **I.3.2.1. Description botanique**

*Matricaria chamomilla* appartient à la famille des Astéracées (Asteraceae). C'est une plante annuelle, glabre, aromatique qui peut atteindre une hauteur de 20 à 60 cm, (figure I.4). Le nom de la plante est issu du grec khamaimêlon, pomme rampante, Il fait référence au fait que la camomille pousse près du sol (chamos) et que ses fleurs fraîchement écloses ont un parfum qui rappelle celui de la pomme (melos)[47,61–63].

- Famille : Astéracées (Asteraceae)
- Nom scientifique : *Matricaria chamomilla* L.
- Nom latin : *Matricaria recutita*
- Autres noms : Baboundj
- Nom populaire : camomille allemande, camomille vraie, matricaire commune, camomille sauvage,



**Figure I.4 :** feuilles et fleurs de *Matricaria chamomilla* L.

### I.3.2.2. Propriétés et usages thérapeutiques

Le genre *Matricaria* est caractérisé par une diversité structurale en métabolites secondaires riches en les composés : coumarines, flavonoïdes, terpènes, hétérosides, sesquiterpènes, lactonique.

*Matricaria chamomilla* L. est utilisée comme une tisane en médecine traditionnelle pour traiter les douleurs d'estomac, et le syndrome d'intestin irritable, et comme un remède doux au manque du sommeil ; elle est aussi utilisée comme un laxatif léger, anti-inflammatoire et bactéricide, ainsi que dans les produits cosmétiques. *Matricaria chamomilla* a un effet antispasmodique, anxiolytique et antimutagène, et une activité anti-plaquettaire significative outre un effet baissant le cholestérol[47,61–63].

### I.3.3. *Mentha pulegium* L.

#### I.3.3.1. Description botanique

Menthe (*Mentha*) est un genre de plantes à fleurs comprenant environ 25-30 espèces dans la famille de Lamiaceae [6,64]. Cette famille est l'une des plus grandes familles de plantes qui possèdent une dispersion géographique universelle (cultivée dans le monde entier en dehors de la région de l'Antarctique et du Nord). La forme de la fleur et la présence des huiles essentielles signent cette famille. La menthe est l'espèce la plus importante de cette famille utilisée par l'être humain depuis plus de 2000 ans et ayant un impact commercial remarquable [6,65].

Un certain nombre d'espèces de menthe présentes en Algérie grandit spontanément et peut aussi être transplanté. Ces espèces sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle [66]. Dans ce travail, on a choisi l'espèce *Mentha pulegium* L.

- Famille : labiées (synonyme : lamiacées).
- Nom scientifique : *Mentha pulegium* L.
- Nom latin : Menthe sauvage (ou pouliot)
- Autres noms : pouliot royal, herbes aux puces,



**Figure I.5** : feuilles de *Mentha pulegium* L.

Le recours aux plantes pour se guérir a pris naissance depuis bien longtemps en médecine traditionnelle grecque, romaine, indienne, chinoise et arabo-musulmane [67]. La menthe est, avant tout, une plante bienfaitrice ayant un pouvoir positif sur la santé. La Menthe flio connue du grand public, sous le nom la menthe pouliot (*Mentha pulegium*) [69], est une plante vivace aromatique herbacée pouvant atteindre 40 cm de hauteur, avec de très petites feuilles ovales légèrement dentelées et des épis de fleurs légèrement bleutées figure I.5 [68,69]. Cette espèce pousse sauvagement en milieu humide, et on la trouve aussi au centre, au sud et à l'ouest de l'Europe, au Nord-Africain et en Asie [70,71].

La Menthe (Flio) est fréquemment utilisée en médecine traditionnelle contre l'asthme, la toux, l'enrouement, le hoquet et les affections gastriques. Elle est reconnue comme stimulante et excitante du système nerveux. La Menthe pouliot est également utilisée en pharmacologie, en parfumerie, en confiserie, en alimentation et dans l'industrie des liqueurs. La commercialisation de la Menthe Pouliot se fait sous forme d'huile essentielle dont la production connaît des fluctuations très significatives d'une année en année [72].

### **I.3.3.2. Utilisations en médecine traditionnelle**

En Algérie, la menthe pouliot est connue sous le nom vernaculaire arabe de « flio », elle est largement utilisée en médecine populaire dans de nombreuses cultures [73,74]. Les parties aériennes fleuries de la menthe pouliot sont traditionnellement utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes, expectorantes, carminatives et antispasmodiques dans le traitement du rhume, de la bronchite, de la tuberculose, de la sinusite, du choléra, des intoxications alimentaires, des flatulences et des coliques intestinales [68,75,76]. Depuis l'antiquité, les menthes conservent une grande diversité d'emplois et occupent une large place comme un remède thérapeutique. Elles fortifient tout le système nerveux comme stimulant diffusible et sédatif, et présentent un remède efficace contre la nervosité et les différentes manifestations nerveuses [5].

---

## *Chapitre II*

---

### *Matériel et méthodes*

---

## Matériel et méthodes

### II.1. Introduction

Ce travail de recherche est divisé en deux parties ; la première est basée sur la détermination des éléments minéraux et des oligo-éléments par des techniques d'analyse élémentaires, cette partie de travail a été réalisée au sein du Centre de Recherche Nucléaire de Birine (CRNB) et aussi au Centre de Recherche Nucléaire de Draria (CRND). Pour la détermination de la majorité des éléments se trouvant à l'état de traces, nous avons appliqué la méthode INAA et ICP-OES. A la lumière des travaux réalisés, et en vue de l'amélioration des outils d'analyse en plus performants dans le processus management et qualité, nous avons été conduits à implémenté la méthode de séparation radiochimique pour l'oligo-élément de sélénium [26].

La deuxième partie est focalisée sur les huiles essentielles, les extraits bruts et leurs applications biologiques. Ces travaux ont été réalisés dans plusieurs laboratoires nationaux : (Centre de Recherche Scientifique et Techniques en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC-Bousmail), Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT-Constantine), SAIDAL, etc...

Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions et infusions, mais la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse. Cependant, les connaissances actuelles permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par nos ancêtres.

## II.2. Matériel végétal

### II.2.1. Critères de choix des plantes

Le choix des échantillons étudiés dans ce travail répond parfaitement aux besoins scientifiques, car ces trois espèces végétales sont largement utilisées et consommées par la population algérienne dans son mode culinaire et dans la médecine traditionnelle, ainsi que pour la valorisation de la médecine traditionnelle de notre pays.

### II.2.2. Échantillonnage

Les échantillons de plantes sélectionnées dans le cadre de ce travail sont : *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., et *Mentha pulegium* L. Les parties aériennes (feuilles, tiges et fleurs) qui sont au stade de floraison, où il y a accumulation importante des substances bioactives, ont été récoltées manuellement dans la région de M'sila et Djelfa tôt le matin (07:00) au mois d'avril de l'année 2018. Elles ont été coupées à environ 5 cm au-dessus du sol à l'aide d'un couteau. Elles ont ensuite été placées dans des sacs en polyéthylène. Après la récolte, nos échantillons sont nettoyés, étalés et séchés pendant deux semaines à une température ambiante et à l'abri de la lumière et ce, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Le matériel végétal a été conservé dans des sacs en papier, en vue de procéder aux différentes manipulations. La totalité des échantillons a ensuite été stockée et préparée dans notre laboratoire.

## II.3. Analyses élémentaires par les techniques INAA et ICP-OES

### II.3.1. Analyses par la technique INAA

#### II.3.1.1. Échantillonnage

Les échantillons choisis dans ce travail ont été soigneusement broyés puis pesés à l'aide d'une balance analytique avec une masse maximale d'environ 110-120 mg [12], nous avons préparé trois exemplaires pour chaque type qu'on conditionnera par la suite dans des enveloppes en aluminium de haute pureté. Dans cette partie, nous avons introduit des standards de même matrice que les échantillons étudiés à savoir : WIPAL-IPE172, WIPAL-IPE189, GBW 07605, et CRM-NIST1570a et NIST1573a. Les standards certifiés, doivent accompagner les échantillons à analyser dans toutes les phases du travail d'analyse. L'utilisation des standards seront exploités pour une étape ultérieure qui est la validation et le contrôle-qualité des résultats obtenus. L'ensemble des échantillons et standards sont positionnés dans la capsule d'irradiation

(cylindre en aluminium de haute pureté) avec la manière la plus convenable afin de faire subir les cibles au même flux neutronique.

### II.3.1.2. Irradiation et mesure

Les échantillons et standards ont été placés dans une capsule propre cylindrique en aluminium. Cette capsule d'irradiation est exposée à un flux neutronique thermique de  $4,710^{12} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$  dans le site d'irradiation du réacteur de recherche CRNB et CRND. Le temps d'exposition de la capsule d'irradiation dans le flux neutronique est de six (6) heures. Après une décroissance de 2 jours, la poudre a été mise dans de nouvelles capsules en polyéthylène, et l'ensemble des échantillons et standards sont mesurés par un spectromètre gamma. Au préalable, le détecteur Ge(Hp) a été étalonné en énergie et en efficacité. Cette étape est indispensable dans le processus d'analyse afin d'ajuster les pics dans le spectre en fonction des canaux. En effet, la première mesure concerne l'analyse des éléments ayant des demi-vies moyennes allant d'une dizaine d'heures jusqu'à des dizaines de jours, à titre d'exemple  $^{42}\text{K}$ ,  $T_{1/2} = 12,36 \text{ h}$  et  $^{51}\text{Cr}$  ;  $T_{1/2} = 27,7$  jours ; le temps de collection était de 7200 s. Après la première mesure, les spectres gamma des échantillons et des standards sont collectés après 20 jours de décroissance afin de déterminer les éléments de longues périodes pour un temps de collection de 14400 s.

**Tableau II.1** : Conditions expérimentales d'INAA

Etapes d'analyse	Paramètres	
Temps d'irradiation	8 heures	
Refroidissement	3 jours	20 jours
Moyen de mesure	Spectrométrie gamma	
Temps de collection	7200 s	14400s
Radioéléments analysés	As, Br, Ca, K, La, Na, Sm	Ba, Ce, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, Hf, Rb, Sb, Sc, Sr, Yb et Zn

Dans cette expérience, nous avons utilisé deux géométries différentes : Géo 4 pour la première campagne (les éléments de moyenne période) et Géomètre deux pour la deuxième campagne (les éléments de longue période). La géométrie est la distance séparant l'échantillon de la surface active du détecteur (la géométrie représente environ 2,2 cm).

### II.3.2. Analyses par la technique RNAA

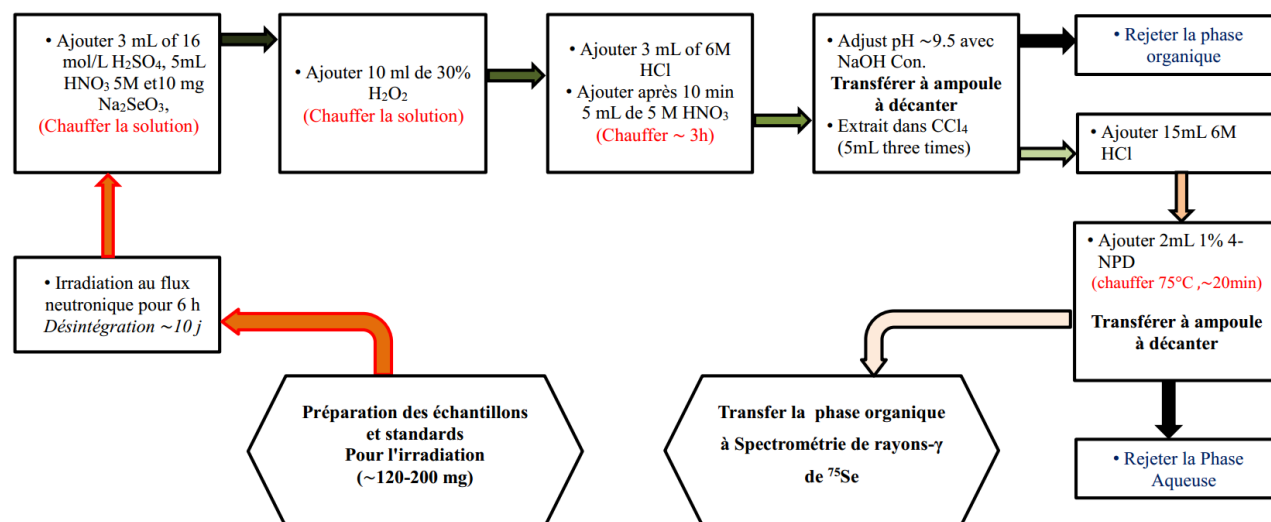
#### II.3.2.1. Préparation expérimentale pour la séparation radiochimique

Un protocole expérimental a été mis en place au niveau du laboratoire radiochimie analytique, ainsi que les conditions expérimentales liées à la préparation des échantillons ; l'irradiation et la séparation radiochimique sont illustrées ci-après. La séparation radiochimique a été réalisée à l'aide de solvants chimiques par dissolution des échantillons radioactifs afin de séparer l'élément d'intérêt et passer par la suite à l'étape suivante qui est l'acquisition des spectres à l'aide d'un système de spectrométrie gamma et ce, sur les plans de la collection et du traitement des spectres gamma, ainsi que le calcul des concentrations de l'élément séparé (Se).

#### II.3.2.2. Séparation radiochimique par extraction par solvant

Dans ce travail, la méthode RNAA est utilisée pour déterminer la teneur en sélénium dans les échantillons de plantes sélectionnées. Après l'irradiation des échantillons, ces dernières subissent la destruction (minéralisation) [26]. Cette opération nécessite un système de montage d'essai déposé sous une hotte fortement ventilée afin d'éviter toute contamination radioactive ainsi qu'un écran (barrière) en plomb pour minimiser le rayonnement ; la figure II.1, représente le processus de séparation radiochimique. Après environ 10 jours d'irradiation, les échantillons sont transférés quantitativement dans des récipients spéciaux en verre pour commencer une éventuelle séparation radiochimique avant d'entamer la collection des spectres des échantillons à analyser. L'échantillon biologique irradié et le standard de Se sont traités séparément. Chacun d'eux est transféré dans un ballon de 200 mL de distillation équipé d'un système efficace de condenseur à reflux. On ajoute 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 16 M, 5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentré et environ 10 mg de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  comme porteur. Le ballon est chauffé jusqu'à ce que la solution soit transparente (claire) puis refroidi pendant cinq minutes avant d'ajouter 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30 %. Cette solution est ensuite chauffée pendant 1 h. Trois (3) mL d'acide chlorhydrique concentré  $\text{HCl}$  sont versés sur la solution. Après 5 à 10 minutes, on ajoute 5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentré. Le chauffage est poursuivi pendant 3 à 5 heures. Le pH de la solution résultante est ajusté jusqu'à 8 à 9,5 (avec une solution de  $\text{NaOH}$  concentrée). Après un temps de refroidissement, la solution est transférée dans une fiole de comptage. Après séparation de la phase organique de la phase aqueuse, on chauffe cette dernière (phase aqueuse) à température modérée avant d'ajouter 15 mL de  $\text{HCl}$  à 6 mol/L et la solution est chauffée jusqu'au point d'ébullition, (15 min à  $100^\circ\text{C}$ ). Le Sélénium ( $\text{Se}+\text{VI}$ ) a été réduit à ( $\text{Se}+\text{IV}$ ), et après addition du réactif de 4-nitro-o-phénylènediamine (4-NPD), la solution résultante est chauffée à une température de  $75^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes, le

chélate résultant 5-nitro-2,1,3 benzoselena-diazole est extrait quatre fois avec 5 mL de  $\text{CCl}_4$  et l'activité gamma de  $^{75}\text{Se}$  dans la phase organique combinée est mesurée par la chaîne de comptage gamma.



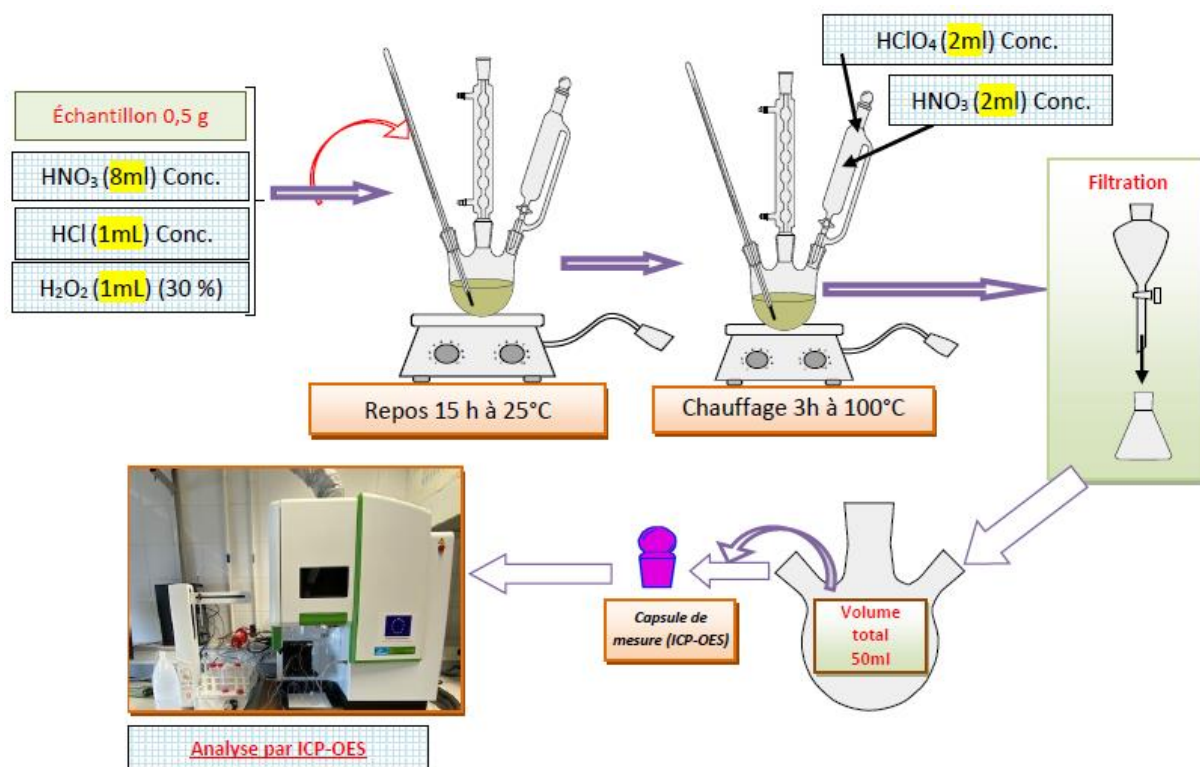
**Figure II.1 :** Organigramme de séparation radiochimique de l'élément Se par RNAA

### II.3.3. Analyse des éléments minéraux par ICP-OES

#### II.3.3.1. Échantillonnage

La dissolution 'Digestion' des échantillons à analyser est réalisée en suivant le protocole représenté sur la figure II.2. Ainsi, la partie aérienne des échantillons est soigneusement broyée puis pesée à l'aide d'une balance analytique avec une masse d'environ 500 mg, et chaque poudre est transférée par la suite dans un ballon de 200 mL de distillation équipé d'un système efficace de condenseur à reflux (voir Figure 2). 8 mL sont ajoutés de  $\text{HNO}_3$  à 65 % (Sigma Aldrich-Germany), 1 mL de  $\text{HCl}$  à 37 % (Sigma Aldrich-Germany) et 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30 %, puis le ballon est laissé à température ambiante pendant 15 heures. Ensuite, le mélange est chauffé à 100 °C sous agitation magnétique « à vitesse moyenne » pendant environ 3 heures (pour assurer que la poudre devienne liquide). Après la mise en solution des échantillons, on laisse cette dernière pour refroidir plusieurs minutes et ensuite on filtre soigneusement dans une fiole jaugée de 50 mL (le diamètre des pores de filtre est inférieur à 0,45  $\mu\text{m}$  (MF-Millipore® Membrane Filter, Germany), pour réduire au maximum la quantité de microparticules lors de l'analyse qui pourraient bloquer l'apport en échantillon liquide ou nuire à la nébulisation de la solution par le plasma utilisé pour les méthodes ICP-OES. Les solutions filtrées ont ensuite été

diluées avec de l'eau désionisée jusqu'à 50 mL. Enfin, chaque échantillon est mis dans un ICP pour la détermination de l'élément minéral, et est analysé en triple.



**Figure II.2** : Protocole de mise en solution des échantillons biologiques pour l'analyse des éléments minéraux par ICP-OES.

#### II.4. Extraction et applications biologiques des huiles essentielles et des extraits bruts

Ce travail vise à fournir une base scientifique profonde et bien définie pour l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle. Cette partie du travail consiste à étudier l'extraction des huiles essentielles et la préparation des extraits aqueux de ces trois plantes sélectionnées dans cette étude et nous en citerons quelques applications biologiques.

##### II.4.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation (HD), par entraînement à la vapeur d'eau (SD) et aussi par extraction par micro-ondes (MAD), par l'utilisation de l'appareil de type Clevenger (voir Figure II.3). 100-300 g environ de chaque type de plante sont placés dans l'appareil et plusieurs distillations sont réalisées par ébullition durant trois heures pour chacune avec un litre et demi d'eau ; ceci, dans un ballon de 2 litres, surmonté d'une

colonne spécifique de distillation de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant (30 minutes pour l'extraction par micro-ondes). La trace d'eau est éliminée par le sel  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , et l'huile essentielle obtenue est ensuite récupérée, pesée, étiquetée et conservée à une température + 4 °C jusqu'à utilisation.

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport de la masse de l'huile essentielle extraite et la matière végétale sèche.

On calcule le rendement d'après la formule ci-dessous (équation 2) :

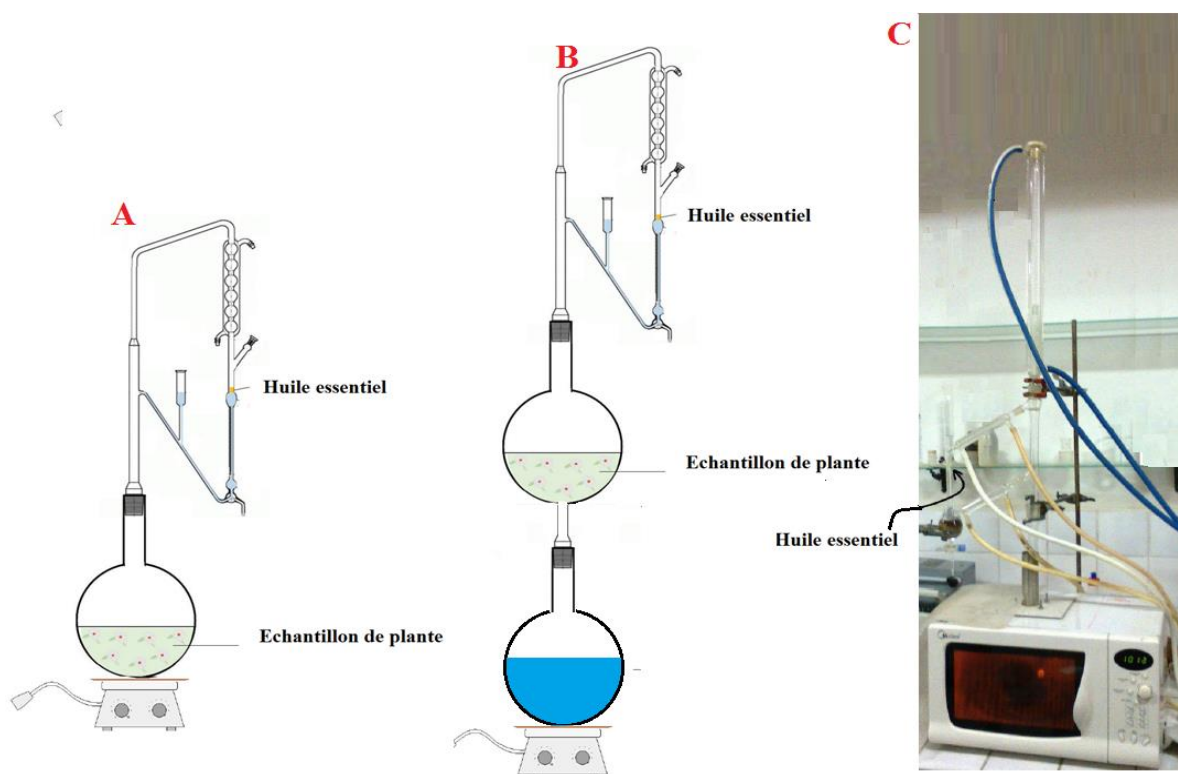
$$R (\%) = (M_{\text{he}} / M_{\text{mv}}) * 100 \quad (\text{II.1})$$

Avec :

R (%) : Rendement de l'huile en %.

$M_{\text{he}}$  : masse de l'huile en gramme

$M_{\text{mv}}$  : masse de la matière végétale en gramme



**Figure II.3 :** Montage d'extraction par hydrodistillation (Clevenger) (A) ; par entraînement à la vapeur d'eau (B) et extraction par micro- ondes (C).

Les composés chimiques des huiles essentielles obtenues des échantillons, sont analysés par Chromatographie en phase Gazeuse avec détecteur d'ionisation de flamme (FID) couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). L'identification des composants des huiles essentielles est

effectuée par la comparaison des temps de rétention et du spectre de masse avec les données de la base de données atomiques de NIST (l'Institut National des Normes et de la Technologie) et la bibliothèque de base de données d'ADAMS [77].

#### II.4.2. Extraits bruts (extraction par la méthode de macération)

Dans ce travail, nous avons utilisé un mélange de solvants tels que l'EtOH (99 °) et l'eau distillée (80 / 20 v/v) respectivement.

- Une quantité de 20 g de la poudre de plante pour trois échantillons émerge dans le mélange de solvants dans un Erlenmeyer pendant 24 h à température ambiante, et ensuite la solution obtenue est filtrée sous vide sur papier filtre (Wattman N°1 de diamètre 0,2 µm). Cette opération est répétée au moins trois fois.
- Le filtrat est récupéré par l'élimination de l'éthanol sous vide à 60 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Enfin, l'extrait sec sous forme solide est ensuite récupéré, pesé, étiqueté et conservé à une température + 4 °C jusqu'à utilisation.

On calcule le rendement des extractions en (%) d'après la formule ci-dessous (équation II.2)

$$R (\%) = (\text{Masse de l'extrait sec} / \text{Masse du plant utilisé}) * 100 \quad (\text{II.2})$$

##### II.4.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux (TPC : *Total Phenolic Content*)

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [78], selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller et al. [79], le réactif FCR (Folin-Ciocalteu reactif), constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). On prend 0,5 mL des solutions préparées de réactif de Folin-Ciocalteu diluées dix fois, et on leur ajoute 2 mL de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 20 % (m / v) et 100 µL de solution de l'extrait ; les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc (même solution sans la solution d'acide gallique). Le contenu phénolique total (TPC) est exprimé par mg EAG / g d'extrait.

#### II.4.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (TFC : Total Flavonoid Content)

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre  $Al^{+3}$  et les flavonoïdes. La méthode de Topçu et al. [80], est utilisée avec quelques modifications. La quantification des flavonoïdes est effectuée avec le trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 430 nm. Le flavonoïde utilisé comme référence dans cette méthode est la rutine. À partir de la solution-mère de la rutine, on a préparé des solutions diluées de concentrations allant de 0,01 à 0,17 mg / mL. On prend chaque fois 1 mL de chaque solution obtenue de la rutine ou de l'extrait, et on ajoute 1 mL de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) à 2 % (m / v) dans l'eau. Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante, la lecture de l'absorbance s'effectue par spectrophotométrie UV / Visible à 415 nm. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu g$  EQ / mg d'extrait).

#### II.4.3. Mise en évidence des activités biologiques des huiles essentielles et des extraits bruts.

Dans cette étude, nous allons nous intéresser qu'à quatre activités biologiques sont, les tests des activités antioxydantes (*in vitro*), les tests des activités antibactérienne qui a été expérimentée sur six souches bactériennes, quatre champignons et une levure, et le dernier test sont l'évaluation des activités enzymatiques (*in vitro*) et l'activité anti-inflammatoire (*in vivo*).

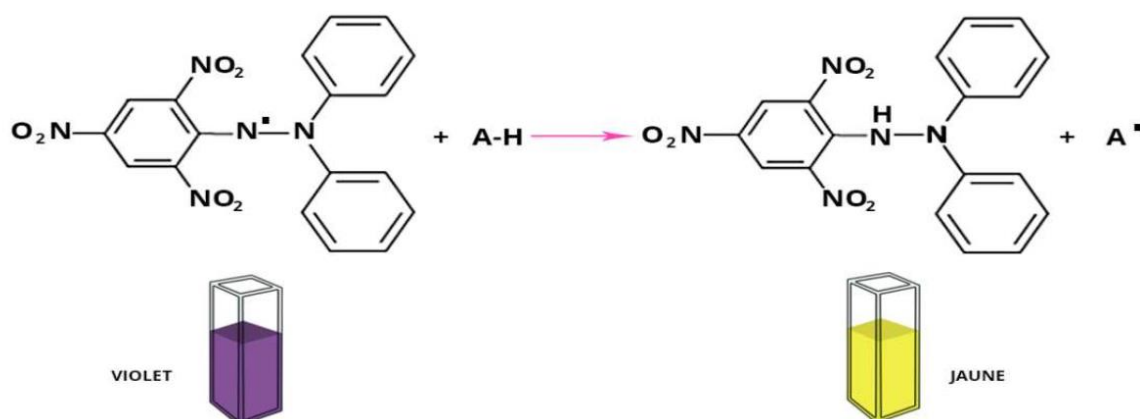
##### II.4.3.1. Évaluation des activités antioxydantes (*in vitro*)

Dans cette étude, l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des huiles essentielles et des extraits bruts (extraits méthanoliques) des parties aériennes des plantes : *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., et *Mentha pulegium* L., a été réalisée par l'utilisation de quatre méthodes : piégeage du radical libre DPPH, piégeage du radical Galvinoxyl GOR, piégeage de l'ABTS et le test de blanchissement de  $\beta$ -carotène.

##### a- Test par radical libre DPPH (2, 2'-diphényl-1-picrylhydrazyle)

Le test antioxydant est réalisé avec la méthode de Braca et al. [81]. En présence du DPPH comme piègeur des radicaux libres, le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyle) de coloration

violette foncée se réduit en (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) de couleur jaune (voir figure II.4) [82].



**Figure II. 4 :** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant.

Pour la mesure de cette activité anti-radicalaire, on prend 2,5 mL de chaque solution des extraits, et on leur ajoute à 0,5 mL de la solution du DPPH préparé dans le méthanol (0,2 mM DPPH dissous dans le méthanol). Après agitation, le mélange est incubé à température ambiante pendant 30 min. en utilisant un spectrophotomètre UV / Vis (SHIMADZU-2450), la lecture de l'absorbance est faite par rapport à un blanc préparé dans les mêmes conditions dans le méthanol à 517 nm. Le pourcentage de l'activité antioxydante ( $I\%$ ) est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité anti-radicalaire de DPPH (\%)} = (A_{\text{témoin}} - A_{\text{échant}} / A_{\text{témoin}}) * 100 \quad (\text{II.3})$$

Avec  $A_{\text{témoin}}$  : Absorbance du témoin.  $A_{\text{échant}}$  : Absorbance des échantillons testés.

La concentration inhibitrice à 50 % ( $IC_{50}$ ) est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la dégradation de 50 % de DPPH (c'est-à-dire les concentrations d'échantillons nécessaires pour piéger 50 % des radicaux libres) ; elle est calculée par régression linéaire à partir des graphes des taux d'inhibition et elle est exprimée en  $\mu\text{g} / \text{mL}$  et comparée avec celle de standard BHT.

#### **b- Test de piégeage du cation radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzo-thiazoline-6-sulphonique))**

Ce test est la base de l'une des méthodes spectrophotométriques qui ont été appliquées dans la mesure de l'activité antioxydante totale des solutions de substances pures [83,84]. ABTS<sup>•+</sup> est

un radical organique synthétique de couleur bleu-vert qui peut être réduit en présence d'antioxydants, avec la décoloration qui en résulte.

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de Roberta et al. [83]. Un volume de 40  $\mu$ L de l'extrait est dilué dans le méthanol à plusieurs concentrations. Le mélange est maintenu à l'obscurité et à température ambiante. Après 10 min. d'incubation, l'absorbance est mesurée à 734 nm par un lecteur de microplaques de 96 puits. Un témoin blanc ou négatif approprié (solution ABTS avec le méthanol) est utilisé. Le BHT et le BHA sont utilisés comme produits antioxydants de référence. Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité scavenger d'ABTS (\%)} = (A_C - A_E / A_C) * 100 \quad (\text{II.4})$$

Où  $A_C$  : est l'absorbance du contrôle négatif,  $A_E$  : l'absorbance de l'échantillon d'essai. L' $IC_{50}$  de chaque échantillon a été déterminée graphiquement ( $n = 3$ )

#### **c- Test de piégeage du radical Galvinoxyl (GOR) :**

L'activité du piégeage du radical Galvinoxyl (GOR) est déterminée par la méthode décrite par Honglian et al. [85]. Dans une microplaque à 96 puits, un mélange contenant 160  $\mu$ l du Galvinoxyl (4 mg dilués dans 100 ml de méthanol) et 40  $\mu$ l de l'extrait dilué à plusieurs concentrations est déposé. Après incubation de 120 minutes, une lecture d'absorbance à 428 nm est réalisée. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité du radical Galvinoxyl (\%)} = (A_C - A_E / A_C) * 100 \quad (\text{II.5})$$

Où  $A_C$  : est l'absorbance du contrôle négatif,  $A_E$  : l'absorbance de l'échantillon d'essai. L' $IC_{50}$  de chaque échantillon est déterminée graphiquement ( $n = 3$ ).

#### **d- Test de blanchissement du $\beta$ -carotène**

Cette étude de l'activité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition des composés volatils et les hydro-péroxydes à doubles liaisons conjuguées qui apparaissent lors de l'oxydation de l'acide linoléique. Donc, elle consiste à mesurer la décoloration du  $\beta$ -carotène (orange) résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique [86]. Le test du  $\beta$ -carotène est effectué selon la méthode décrite par Marco [87], 1 mg de  $\beta$ -carotène est dissous dans 2 mL de chloroforme, puis sont ajoutés à la solution obtenue 50  $\mu$ L de l'acide linoléique et 400 mg de standard tween40. Après évaporation dans le chloroforme par

l'évaporateur rotatif à 40°C, à la fin 200 ml d'eau distillée saturée d'oxygène sont ajoutés sous une agitation vigoureuse de l'émulsion résultante. De cette nouvelle solution, 140 µL sont transférés dans la micro-plaque et 60 µL de chaque extrait à différentes concentrations sont ajoutés. La même procédure est répétée pour les contrôles positifs (BHT et BHA). L'absorbance est mesurée à 490 nm à différents intervalles (0, 30, 60, 90 et 120 minutes), avec l'incubation de la microplaque à 45 °C. L'activité antioxydante (AA%) est calculée par l'équation suivante:

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = (A_C - A_E / A_C) * 100 \quad (\text{II.6})$$

Où :  $A_C$  est le taux de blanchissement du  $\beta$ -carotène sans extrait et  $A_E$  est l'absorbance du  $\beta$ -carotène en présence de l'échantillon. On a obtenu la concentration inhibitrice à 50 % ( $CI_{50}$ ) à partir de l'équation de régression des pourcentages d'inhibition calculés.

#### II.4.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne (*in vitro*)

##### a- Matériel microbiologique :

Comme on le sait, les bactéries et les champignons sont résistants à de nombreux antibiotiques conventionnels. Cette problématique a poussé les scientifiques à tout mettre en œuvre pour découvrir de nouvelles molécules capables de vaincre ces bactéries multi-résistantes qui peuvent être très dangereuses pour les enfants, les personnes âgées et les immunodéprimés. Les propriétés biologiques et plus particulièrement antibactériennes des huiles essentielles et les extraits bruts sont de plus en plus massivement étudiées pour tenter de maîtriser les infections bactériennes et fongiques, et de nombreuses études ont montré qu'elles peuvent être dotées d'un important potentiel en tant qu'agents antimicrobiens et ce, dans divers domaines [88].

Cette application a été effectuée au laboratoire de pharmacotoxicologie du CRD-SAIDAL (Mohammadia). Dans cette étude, les tests sur l'activité antimicrobienne ont été appliqués *in vitro* sur HEs et sur des extraits bruts des parties aériennes des plantes : *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., et *Mentha pulegium* L. La méthode utilisée est celle des dilutions en gélose nutritive ou concentrations minimales inhibitrices (CMI). L'activité antimicrobienne des extraits bruts et d'HE a été testée vis-à-vis de souches contenant des microorganismes pathologiques parmi lesquelles figurent des bactéries à Gram+ et à Gram-, des champignons et des levures.

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des bactéries pathogènes et fréquemment impliquées dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires et sont très souvent rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme, et sont comme suit :

- Bactérie Gram positive : *Listeria monocytogenes* CIP82110 ; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- Bactérie Gram négative : *Escherichia coli* ATCC 8739 ; *Klebsiella pneumoniae* CIP 8291 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- Champignons : *Mucor ramanianus* ; *Aspergillus Flavus* ; *Penicillium expansum* et *Fusarium culmorum*.
- Levure : *Candida albicans* ATCC 10231

#### **b- Milieux de culture :**

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antibactériens sont les suivants :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Mueller-Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries en milieu solide, vis-à-vis de l'antibiotique, des huiles essentielles et des extraits méthanoliques.
- Bouillon Mueller Hinton (MHB), pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI).
- La gélose de Sabouraud pour l'étude de la sensibilité de la levure aux différents extraits.

#### **c- Conservation des souches :**

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur Gélose nutritive, incubées pendant 24 h à 37 °C, et sont conservées à 5 °C dans des tubes contenant de la gélose nutritive inclinée.

#### **d- Préparation d'extraits pour tests antibactériens :**

Tout d'abord, une solution-mère pour le test d'huile essentielle (HEs) est préparée par solubilisation d'huile essentielle brute dans 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO), pour atteindre une concentration initiale de 50 mg / mL. Les HEs sont testées sur les souches bactériennes préalablement sélectionnées, d'une part à l'état brut (pour la méthode des disques) et d'autre part à l'état dilué (pour la détermination de la CMI). Par ailleurs, les extraits méthanoliques sont testés sur les souches bactériennes préalablement sélectionnées. Ils sont dissous dans le même solvant (méthanol) à une concentration finale de 30 mg / mL.

#### **e- Evaluation de l'activité antibactérienne :**

Par utilisation de la méthode des disques de papier Whatman n°1 de 6mm (0,28cm<sup>2</sup> de surface), imprégnés de l'huile essentielle ou de l'extrait méthanolique, et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne, et après incubation. L'effet de l'agent antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure du diamètre de la zone claire autour du disque en millimètres. En fonction du

diamètre d'inhibition, on peut classer les souches étudiées en souches sensibles ou résistantes.

Par utilisation de la méthode de micro-dilution en déterminant les valeurs de CMI, cette technique consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié. Elle a pour but de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée. Elle est réalisable par contact direct en milieu gélosé ou liquide [89].

#### **f- Expression des résultats de tests antibactériens :**

Pendant 24 h, les boîtes ont été incubées à l'étuve à 37 °C, et à la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 6 mm). Dans la littérature relative aux huiles essentielles, les résultats de l'aromatogramme sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibition en mm [90].

### **II.4.3.3. Evaluation des activités enzymatiques (*in vitro*)**

#### **II.4.3.3.1. Evaluation de l'activité antidiabétique (inhibition de l'alpha-amylase)**

La thérapie du diabète consiste principalement à stimuler la sécrétion de l'insuline, diminuer la production hépatique du glucose et / ou réduire la résorption intestinale des hydrates de carbone. Il existe plusieurs types d'enzymes intervenant dans le métabolisme des oses surtout celles agissant dans le catabolisme de ces derniers pendant la digestion. L'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase interviennent dans l'hydrolyse des glucides. L'alpha-amylase comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires. C'est une endo-enzyme qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4) de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d'alpha-dextrines.

L'activité antidiabétique est testée seulement sur les extraits bruts des plants étudiés, et a été testée selon la méthode d'inhibition de l'alpha-amylase et selon la méthode de Zengin [91], avec quelques modifications. Sur une microplaque de 96 puits, un volume de 25 µL d'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 50 µL d'une solution d'alpha-amylase 1U, puis incubé pendant 10 min, à 37°C. Ensuite, 50 µL d'amidon (0,1 %) sont additionnés. Le mélange est incubé une autre fois pendant 10 minutes à 37 °C. Après incubation, 25 µL d'acide

hypochlorique 1 M (un volume de 4.17 mL HCl pur est dilué dans 45.83 mL d'eau et 100  $\mu$ L de potassium d'iode sont ajoutés. La lecture de l'absorbance est réalisée à 630 nm. L'acarbose est utilisé comme standard.

Le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase est calculé par la formule suivante :

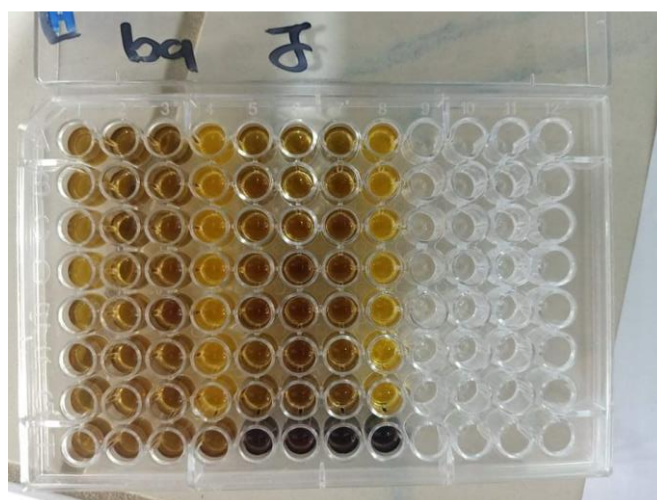
$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - \frac{(Ac - Ae) - (As - Ab)}{(Ac - Ae)} \quad (\text{II.7})$$

Ac = Absorbance [Amidon + IKI + HCl + vol. de solvant d'extrait + vol. tampon-enzyme]

Ae = Absorbance [Enzyme + Amidon + IKI + HCl + vol. de solvant d'extrait]

As = Absorbance [Enzyme + Extrait + Amidon + IKI + HCl]

Ab = Absorbance [Extrait + IKI + 125  $\mu$ l de tampon].



**Figure II.5 :** la plaque de dosage de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase des extraits de *Teucrium polium* (J) et *Matricaria chamomilla* (Ba)

#### II.4.3.3.2. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer (l'activité anti-cholinestérase)

Le test de l'activité anti-cholinestérase de extraits bruts des plants étudiés a été réalisée par la méthode d'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) et a été mesurée en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrique développée par Ellman [92]. AChE de l'anguille électrique et BChE du sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine (ACI) et le chlorure de butyrylthiocholine (BuCi) ont été utilisés comme substrats de la réaction. D-TNB a été utilisé pour la mesure de l'activité du cholinestérase. 150  $\mu$ L de tampon phosphate de sodium 100 mM (pH = 8) sont ajoutés à 10  $\mu$ L de la solution contenant l'échantillon (4 mg / mL) et dissoute dans le méthanol à différentes concentrations. D'autre part, 20  $\mu$ L de solution AChE ou BChE sont préparés dans un tampon

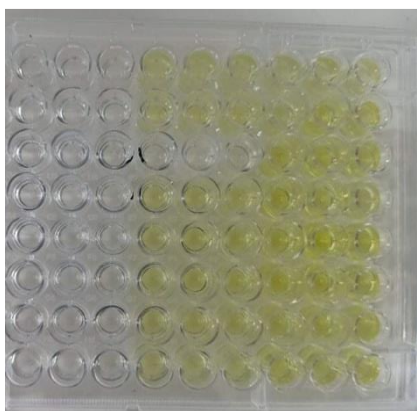
(pH = 8), mélangés et incubés pendant 15 minutes à 25 °C, et 10 µL de D-TNB (0,5 mM) y ont été ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'addition de 10 µL d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou 10 µL de chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). L'hydrolyse de ces substrats est contrôlée par spectrophotométrie par la formation d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate jaune résultant de la réaction du D-TNB avec la thiocholine libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou du chlorure de butyrylthiocholine, à une longueur d'onde de 412 nm en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits. La galanthamine a été utilisée comme composé de référence. Les résultats sont donnés en pourcentage d'inhibition contre des concentrations de 25, 50, 100 et 200 µg / ml, la IC<sub>50</sub> a également été donnée.

Le pourcentage d'inhibition de BChE et AChE est déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(E - S)/E] * 100 \quad (\text{II.8})$$

E : l'activité de l'enzyme sans extrait

S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait



**Figure II.6 :** la plaque de dosage de l'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BChE) et l'acétylcholinestérase (AChE) des extraits de *Teucrium polium* et *Matricaria chamomilla*

#### II.4.3.3.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

On détermine, *in vitro*, l'activité anti-inflammatoire des extraits de la plante étudiée, et ce, via la méthode d'inhibition de dénaturation du BSA. Ce principe consiste par l'inhibition de la dénaturation du BSA (Bovine sérum albumine) provoquée par la chaleur (72°C). L'activité anti-inflammatoire *in vitro* est déterminée par la méthode de Kandikattu (2013) avec de légères modifications. 1 mL de chaque concentration d'extrait ou du standard (Diclofénac) est ajouté à 1 mL de solution de BSA 0,2 % préparée dans le tris-HCl (pH = 6,6). Les solutions sont incubées à 37 °C pendant 15 min. dans l'étuve, puis dans un bain-marie à 72°C pendant 5 min. Après refroidissement, la turbidité est mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre à cuve.

Pour chaque concentration d'extrait, un blanc est préparé dans 1 mL d'extrait et 1 mL de tris-HCl (ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait des résultats obtenus).

#### II.4.3.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

Les différentes activités biologiques (anti-inflammatoires) *in vivo* ont été effectuées sur des souris albinos de souche Swiss provenant de l'institut Pasteur (Alger). Les souris mâles et dont le poids varie entre 20 g à 22 g ont été utilisées ; ces animaux d'expériences ont été stabulés dans des cages en plastique à la température ambiante (25 °C), et un éclairage de 12 heures par jour. Pendant la période d'acclimatation (une semaine avant d'être utilisées dans les différentes expériences), les souris avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture (croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzaréah, Alger). L'activité anti-inflammatoire est évaluée par la méthode de l'inhibition de l'œdème de la patte de souris induit par la carragénine ; le principe de cette étude consiste à injecter sous l'aponévrose plantaire de la patte gauche de la souris de la carragénine pour provoquer une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire (voir figure 16). Cette étude permet la comparaison de l'œdème plantaire après administration de doses égales du produit anti-inflammatoire à tester (l'extrait de la plante à 10 %) et du produit de référence correspondant (Diclofenac sodique à 10 mg / kg).

D'après le protocole expérimental Colot M. 1972 [93], nous avons réalisé les étapes suivantes :

✓ **Première étape : Au temps T<sub>0</sub>**

Les souris ont été réparties en 5 lots, chaque lot contenant 5 souris et constitué de façon aléatoire (voir figure 15) :

- **Le groupe témoin** : chaque souris reçoit 0,5 mL de l'eau physiologique.
- **Le groupe contrôle** : chaque souris reçoit un anti-inflammatoire de référence : le Diclofénac à 10 mg / kg.
- **Le groupe traité** : reçoit la solution-test (MP, Ba et J), et chaque souris reçoit 0,5 mL de l'extrait de la plante à 10 %
  - Un lot essai MP :  $(5,0008 \text{ g} / 50 \text{ mL H}_2\text{O}) \times 100 = 10,00 \%$
  - Un lot essai Ba :  $(10,1480 \text{ g} / 100 \text{ mL H}_2\text{O}) = 10,15 \%$
  - Un lot essai J :  $(10,0252 \text{ g} / 100 \text{ mL H}_2\text{O}) = 10,03 \%$

Avant de commencer les expériences, Nous avons mis les souris à jeun avant de les peser.

Ensuite, nous avons administré, par voie intra-gastrique (gavage) pour les cinq lots, les suspensions suivantes (solution de témoin, référence et de l'extrait méthanolique de la plante).



**Figure II.7:** Photographie montrant une souris albinos pour l'essai de l'extrait de la plante MP (originale)

✓ **Deuxième étape : temps  $T_0 + 30$  minute :**

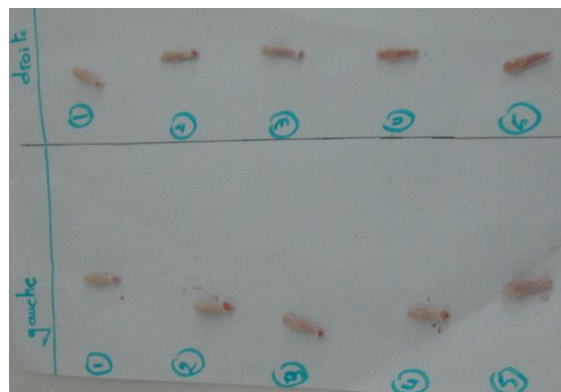
Une demi-heure après l'administration, les souris des cinq lots ont reçu 0,025 mL de la carragénine à 1 % sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de la souris (voir figure 16).



**Figure II.8 :** Photo d'une injection sous-plantaire de la carragénine au niveau de la patte arrière gauche de la souris (originale).

✓ **Troisième étape : temps  $T_0 + 4$  h:**

Quatre heures après cette opération, les animaux ont été sacrifiés par rupture de la nuque, puis les pattes postérieures ont été coupées à hauteur de l'articulation (voir figure 17), puis pesées sur une balance analytique.



**Figure II.9** : Photo des pattes arrière gauche et droite coupées à hauteur de l'articulation (Originale).

L'activité anti-inflammatoire a été calculée en pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l'œdème} = \frac{[(PG - PD) \text{ souris témoin} - (PG - PD) \text{ souris traitée}]}{[(PG - PD) \text{ souris témoin}]} \quad (\text{II. 9})$$

Où :  $P_D$  = poids de l'oreille droite et  $P_G$  = poids de l'oreille gauche

### II.5. Analyse statistique

Tous les résultats des calculs effectués dans le travail de ma thèse, sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (*standard déviation*), par des analyses d'au moins trois essais. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par "Student's t-test" et le test ANOVA univarié. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

---

## *Chapitre III*

---

### *Résultats et discussions*

---

## Résultats et discussion

### III.1. Introduction

Ce chapitre comporte trois parties essentielles dont la première traite l'étude minérale (analyse des éléments minéraux par les techniques (NAA et ICP-OES), réalisée sur les plantes médicinales étudiées au cours de notre travail.

La deuxième partie fait référence à l'analyse des composés organiques volatils (huiles essentielles) et non-volatils ou lourds (extraits bruts méthanoliques) extraits des plantes étudiées.

La troisième partie concerne l'étude des activités biologiques et pharmacologiques des extraits obtenus à partir de nos plantes.

### III.2. Analyse des éléments minéraux

Les concentrations en éléments majeurs, mineurs, traces et ultra-traces des échantillons sélectionnés, ont été déterminées par trois méthodes d'analyse qui sont l'INAA, la RNAA et l'ICP-OES.

#### III.2.1. Calcul des concentrations élémentaires (minérales)

Pour le calcul des concentrations des éléments contenus dans les plantes étudiées, nous avons eu recours respectivement aux équations (I.1), (I.7) et (I.8) (chapitre I), pour les techniques NAA et ICP-OES.

Les résultats obtenus par les trois techniques (NAA et ICP-OES) sont illustrés dans le tableau III.1. Celui-ci représente les concentrations (en mg / kg) des vingt-deux éléments qui sont le Ba, Br, Ca, Cl, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Sb, Sc, Se, Sr, Th, U et Zn contenus dans les échantillons analysés.

**Tableau III.1.** Concentrations en mg/kg des éléments chimiques contenus dans les plantes étudiées : *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., et *Mentha pulegium* L.

Éléments	Plantes étudiées			Techniques utilisées	
	<i>Teucrium polium</i> L.	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	<i>Mentha pulegium</i> L.		
1	Ba	35,10 ± 6,71	1,10 ± 0,27	26,39 ± 3,62	INAA
2	Br	18,86 ± 2,78	126,74 ± 21,69	67,14 ± 11,50	INAA
3	Ca	18267 ± 386	6903 ± 144	31875 ± 47	ICP
4	Cl	219,5 ± 3,0	2885 ± 6	2697 ± 5	INAA
5	Co	0,480 ± 0,041	0,051 ± 0,006	0,776 ± 0,064	INAA
6	Cr	2,29 ± 0,65	0,447 ± 0,138	1,011 ± 0,205	INAA ; ICP
7	Cs	0,111 ± 0,023	0,013 ± 0,005	0,201 ± 0,037	INAA
8	Eu	0,040 ± 0,015	0,006 ± 0,003	0,054 ± 0,021	INAA
9	Fe	983,9 ± 111,9	56,38 ± 4,97	1603,9 ± 183,5	INAA; ICP
10	K	7619,0 ± 2295,0	14298 ± 4310	14216 ± 4294	INAA
11	Mg	230,2 ± 2,0	153,92 ± 4	441,5 ± 5,0	INAA; ICP
12	Mn	39,3 ± 5,0	28,5 ± 3	71,2 ± 4,0	INAA
13	Mo	0,28 ± 0,101	0,633 ± 0,233	0,785 ± 0,256	INAA
14	Na	803 ± 41	9294 ± 466	10790 ± 544	INAA
15	Rb	Nd	4,303 ± 0,598	5,83 ± 0,86	INAA
16	Sb	0,050 ± 0,013	0,015 ± 0,006	0,039 ± 0,013	INAA
17	Sc	0,012 ± 0,001	0,0047 ± 0,0005	0,022 ± 0,002	INAA
18	Se	nd	nd	0,043 ± 0,009	RNAA
19	Sr	138,03 ± 7,97	57,78 ± 3,91	135,40 ± 9,33	INAA
20	Th	nd	0,126 ± 0,066	0,510 ± 0,147	INAA
21	U	0,040 ± 0,013	0,117 ± 0,102	0,063 ± 0,022	INAA
22	Zn	24,22 ± 1,04	19,35 ± 0,77	44,5 ± 2,0	INAA; ICP

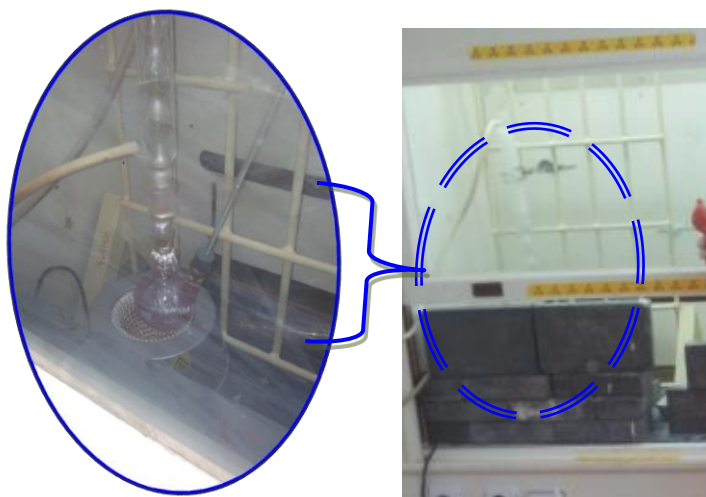
\*nd : non déterminé

✚ De cette analyse, il en découle qu'il y a trois classes d'éléments chimiques présents dans nos échantillons dont certains sont majeurs, d'autres mineurs ou à l'état de traces. On peut également noter que les éléments trouvés dans les plantes étudiées sont répartis selon trois types inhérents aux caractéristiques biologiques suivantes :

- 1) Éléments essentiels et nutritifs : K > Na > Fe > Mg > Mn > Zn > Cr > Co > Se.
- 2) Éléments potentiellement toxiques présents dans le modèle de contenu descendant tels que le Br > Sb > Th.
- 3) Les autres éléments chimiques restants sont non-essentiels.

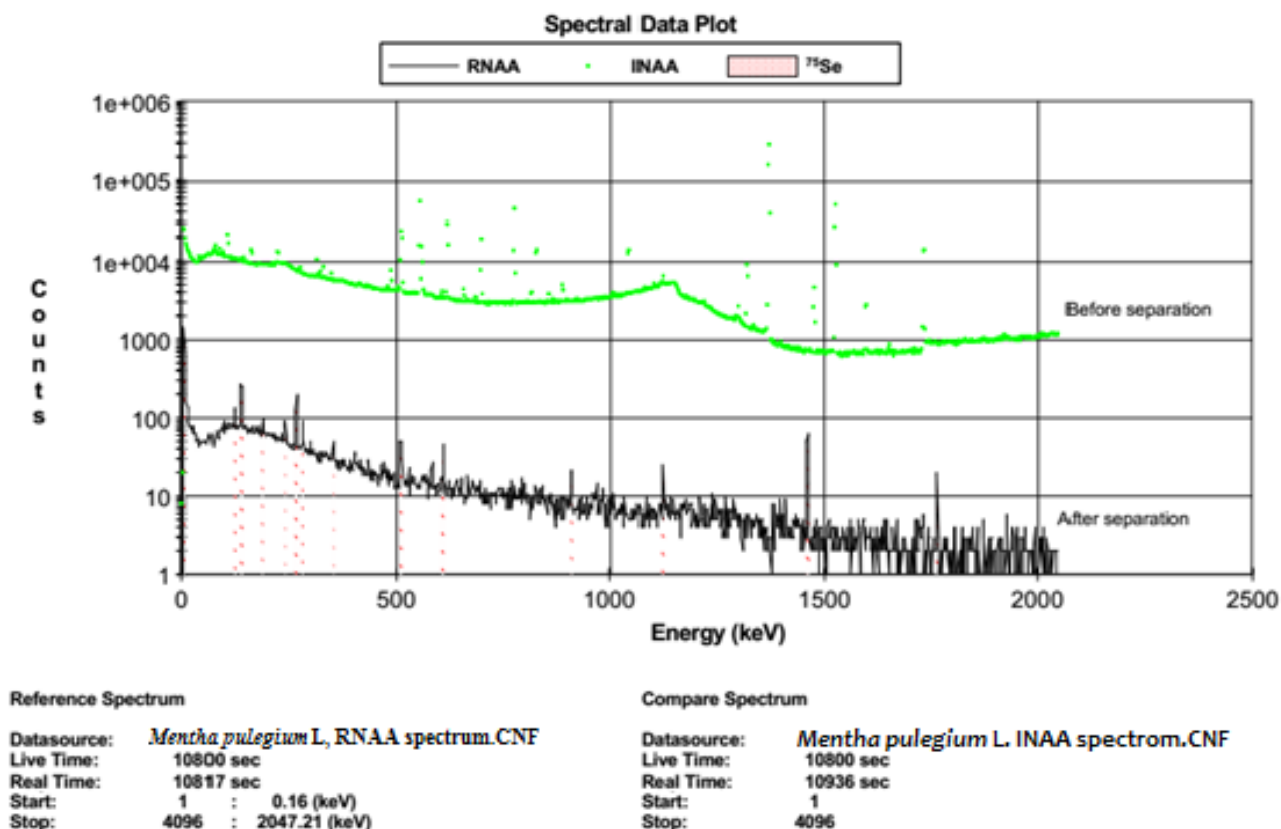
✚ Par ailleurs, pour la détermination de la concentration du sélénium et la mise en place de la technique de RNAA [26], on note que pour les étapes pratiques, la méthode de séparation radiochimique est quasiment similaire à celle de l'INAA et ce, à partir de la préparation de l'échantillon jusqu'à la fin de l'irradiation. Après celle-ci, et avant d'entamer la phase de séparation, on a procédé à la mesure des raies gamma par spectrométrie gamma.

L'accomplissement de cette étape permet de servir de témoin et ce, afin d'illustrer l'absence de l'élément sélénium par rapport aux éléments détectés. La figure III.1 [26], représente le protocole de séparation radiochimique (extraits obtenus par solvant) et le blindage de radioprotection (écrans biologiques) appliqué au cours de ce travail.



**Figure III.1 :** Appareillage de séparation radiochimique du sélénium mis en place au laboratoire CRNB [26]

À la fin de l'étape de séparation radiochimique de la phase organique (fraction radioactive), on a mesuré l'activité gamma du radioélément  $^{75}\text{Se}$  issu de l'échantillon et ce, à l'aide d'un détecteur co-axial de germanium hyper pur de résolution 1.87 keV de type CANBERRA associé à une chaîne de spectrométrie. Les raies gamma principales sont 136 et 264,66 keV avec une demi vie  $T_{1/2}=120,4$  jours (figure III.2). Au cours de cette étude, le rendement de radio-séparation obtenu est de 85,47% et le Se analysé par la méthode RNAA est présent uniquement pour *Mentha pulegium* L.



**Figure III.2 :** Spectre de raies gamma de *Mentha pulegium* L., avant et après la séparation radiochimique (RNAA)

### III.1.2. Évaluation des résultats et qualité –contrôle / qualité assurance (QC / QA)

Les résultats des composés minéraux contenus dans les plantes analysées ont été validés en ayant recours à quatre standards à savoir : NIST 1573a, NIST-1570a, IPE 189 et IPE 172 irradiés simultanément avec les échantillons étudiés. Cette approche permet, d'une part, de vérifier tout le processus d'analyse allant de la préparation, de l'irradiation et aussi de la mesure effectuée dans cette étude, et d'autre part à déterminer la performance des analyses et la signification des résultats obtenus. Ces derniers sont rassemblés dans le tableau III.2. Notons que pour le concept QC/QA, les paramètres statistiques d'évaluation des résultats obtenus à travers U-score et Z-score ont été calculés par les équations (I.5) et (I.6) respectivement (Chapitre I). Leurs évaluations indiquent que la majorité des valeurs des concentrations sont localisés dans les intervalles admissibles :  $\leq |1|$ , et  $\leq |3|$  des paramètres U-score et Z-score respectivement.

**Tableau III.2 :** Évaluation de la qualité des résultats analytiques basée sur la comparaison entre les valeurs calculées et certifiées de standards NIST-1573a, NIST-1570a, IPE 189 et IPE 172, (n = 3),

Élément chimique	Standards																Techniques utilisées
	NIST-1573a				NIST-1570a				IPE 189				IPE 172				
	Valeurs Calculées	Valeurs Certifiées	U-score	Z-score	Valeurs Calculées	Valeurs Certifiées	U-score	Z-score	Valeurs Calculées	Valeurs Certifiées	U-score	Z-score	Valeurs Calculées	Valeurs Certifiées	U-score	Z-score	
<b>Ba</b>	63,08±7,572	(63)	0,01	-	-	-	-	-	74,52±9,518	80,1±5,96	0,5	0,94	17,62±2,37	16,4±0,99	0,48	1,24	INAA
<b>Br</b>	1280±100	1300	0,2	-	-	-	-	-	48,34±29,64	40,6±6,9	0,25	1,12	1,763±0,361	2,1±1,265	0,26	0,27	INAA
<b>Ca</b>	50960±2854	50500±900	0,15	0,51	15128±2000	15260±66	0,07	1,99	6346,5±30,2	6730±402	0,95	0,95	-	-	-	-	INAA, ICP
<b>Ce</b>	1,89±0,17	(2)	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	INAA
<b>Co</b>	0,56±0,02	0,57±0,02	0,35	0,5	0,394±0,078	0,393±0,03	0,01	0,03	0,0775±0,0159	0,0789±0,0132	0,06	0,1	17,62±2,37	16,4±0,99	0,48	1,24	INAA
<b>Cr</b>	0,25±2,02	1,99 ± 0,06	0,12	0,5	-	-	-	-	0,919±0,267	1,18±0,228	0,74	1,14	1,763±0,361	2,1±1,265	0,26	0,27	INAA, ICP
<b>Cs</b>	0,012±0,049	(0,053)	0,12	-	-	-	-	-	0,0903±0,0236	0,089±0,0157	0,04	0,07	17,62±2,37	16,4±0,99	0,48	1,24	INAA
<b>Fe</b>	367±18	368±7	0,05	0,14	-	-	-	-	104,4±12,8	110±7,4	0,38	0,76	67,84±6,51	64,4±6,55	0,37	0,53	INAA, ICP
<b>Hf</b>	0,12±0,01	0,14±0,02	0,86	0,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	INAA
<b>K</b>	27057±1046	27000±500	0,45	0,94	28511±500	29000±260	0,87	1,88	36500,4±4213,1	37100±2160	0,13	0,28	-	-	-	-	INAA
<b>La</b>	2,36±0,02	(2,3)	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	INAA
<b>Na</b>	146,5±17,1	136±4	0,6	2,63	17600±1200	18210±230	0,5	2,65	-	-	-	-	-	-	-	-	INAA
<b>Rb</b>	14,12±1,04	14,89±0,27	0,72	2,85	12,45±0,985	12,7±1,6	0,13	0,15	7,91±0,59	7,5±0,501	0,52	0,82	8,763±1,167	9,07±0,536	0,23	0,56	INAA
<b>Sb</b>	0,059±0,015	0,063±0,006	0,25	0,67	-	-	-	-	0,013±0,007	0,0095±0,0019	0,5	1,88	0,0372±0,0105	0,0482±0,0054	0,92	2,03	INAA
<b>Sc</b>	0,1±0,0013	0,1±0,0013	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	INAA
<b>Se</b>	0,061± 0,009	0,054±0,003	0,74	2,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RNAA
<b>Sm</b>	0,189±0,008	(0,19)	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	INAA
<b>Sr</b>	-	-	-	-	54,54±4,66	55,54±0,5	0,21	1,99	-	-	-	-	43,77±3,14	42,2±2,11	0,42	0,75	INAA
<b>Th</b>	0,13±0,01	-0,12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	INAA
<b>Zn</b>	28,99±1,51	30,9±0,7	1,15	2,73	82,65±5,68	82,3±3,9	0,05	0,09	19,12±1,39	20,1±1,32	0,51	0,74	33,21±2,31	31,6±2,19	0,51	0,74	INAA, ICP

-: non détecté, ( ): non certifié

### III.1.3. Évaluation de l'ingestion diététique des éléments traces (RDA)

Pour les apports nutritionnels recommandés (RDA: *recommended dietary allowances*), les quantités minimales et maximales nécessaires et compatibles avec les fonctions normales de l'organisme sont déterminées en toute sécurité [94]. Généralement, les éléments minéraux nécessaires en petites quantités pour le métabolisme du corps, se composent principalement de macronutriments et micronutriments ; autrement dit d'oligo-éléments. Du point de vue alimentaire, ces derniers peuvent être divisés en trois groupes :

- dans le premier, on retrouve les oligo-éléments essentiels (micronutriments), qui sont des constituants des hormones, des vitamines et des catalyseurs pour les systèmes enzymatiques du processus métabolique cellulaire ;
- dans le deuxième, on a les oligo-éléments principalement essentiels ;
- et enfin, le troisième groupe qui représente les oligo-éléments non-essentiels qui sont constitués d'éléments toxiques et non-toxiques qui n'ont pas de fonction métabolique dans l'organisme vivant [7].

D'un point de vue nutritionnel, il y a un intérêt croissant dans la détermination des macroéléments et oligo-éléments tels que le Ca, Fe, K, Na, Se et Zn dans les aliments qui jouent un rôle important dans la santé humaine. De plus, l'une des plus importantes sources d'éléments toxiques pour le corps humain est la nourriture et l'eau. Pour cette raison, leur ingestion doit être strictement contrôlée.

Les plantes médicinales peuvent être une bonne source d'éléments essentiels. Cependant, le taux de consommation devrait être soumis à un contrôle strict. Les valeurs / jour, l'apport moyen / personne pour les éléments essentiels ou toxiques dans le cas des plantes étudiées doivent être respectés.

Au cours de cette étude, certains éléments essentiels ou toxiques ont été estimés en supposant que leur consommation quotidienne est de 10 g (poids sec) par personne. Le tableau III.3 représente les valeurs des éléments recommandés pour l'apport nutritionnel, les limites d'exigence / tolérance quotidienne recommandée, et les valeurs estimées.

**Tableau III.3** : Valeurs de l'apport (mg / jour, personne) de certains éléments essentiels et l'apport journalier tolérable pour les adultes (70 kg) (*Tolerable Daily Intake*) de certains éléments toxiques selon l'organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO / WHO).

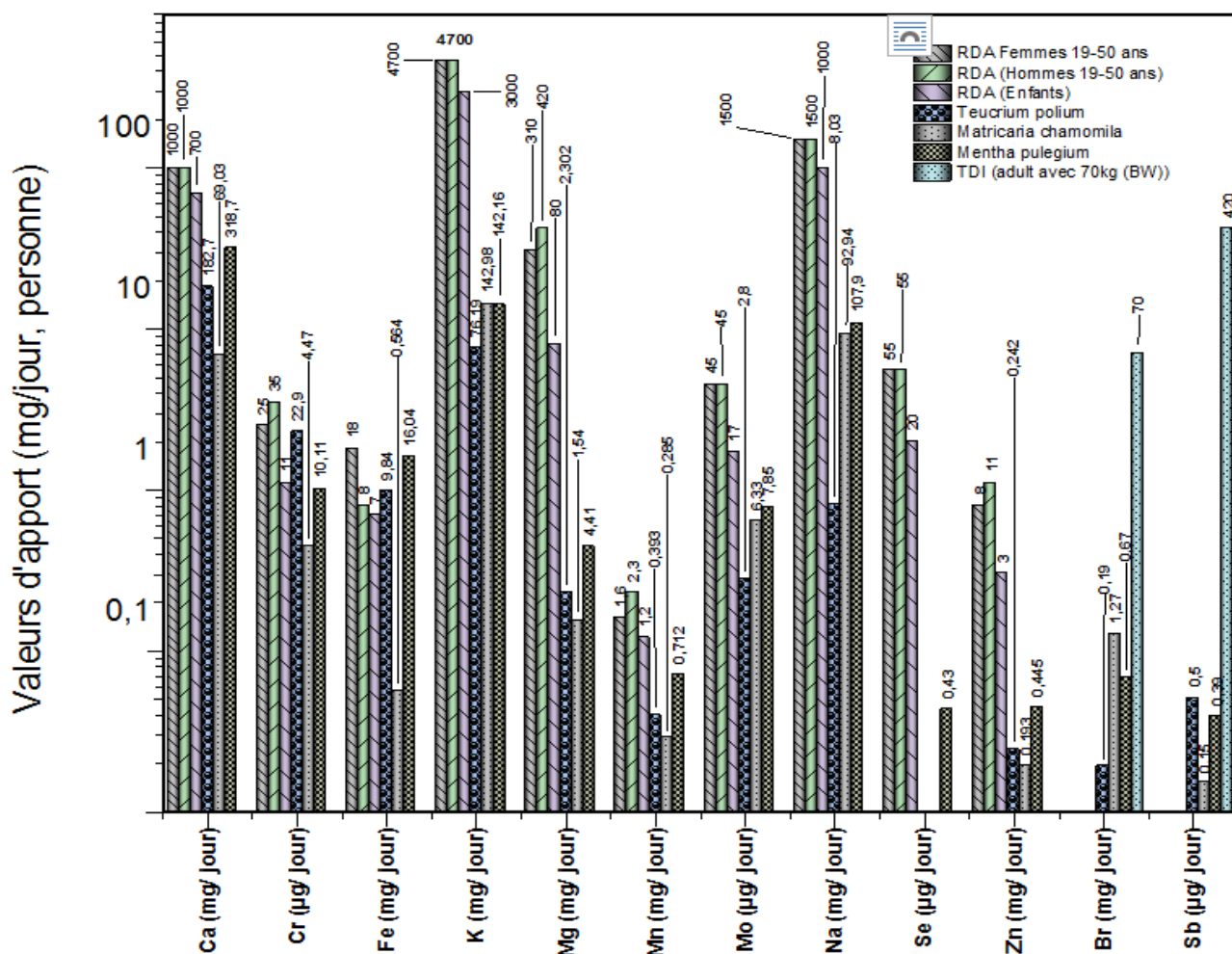
Plantes étudiées; Personne-âge	RDA et AI d'éléments chimiques essentiels										TDI (adulte de 70 kg (BW)) d'éléments chimiques potentiellement toxiques	
	Ca (mg/ jour)	Cr (µg/ jour)	Fe (mg/ jour)	K <sup>a</sup> (mg/ jour)	Mg (mg/ jour)	Mn <sup>a</sup> (mg/ jour)	Mo (µg/ jour)	Na <sup>a</sup> (mg/ jour)	Se (µg/ jour)	Zn (mg/ jour)	Br mg/ jour /person	Sb µg/ jour /person
<i>Teucrium polium</i> L.	182,7	22,9	9,84	76,19	2,302	0,393	2,8	8,03	/	0,242	0,19	0,50
<i>Matricari chamomil</i>	69,03	4,47	0,564	142,98	1,54	0,285	6,33	92,94	/	0,193	1,27	0,15
<i>Mentha pulegium</i>	318,7	10,11	<b>16,04</b>	142,16	4,41	0,712	7,85	107,9	0,43	0,445	0,67	0,39
Enfants 1-3 ans	700	11	7	3000	80	1.2	17	1000	20	3	Nd	Nd
Hommes 19-50 ans	1000	35	8	4700	420	2.3	45	1500	55	11	70	420
Femmes 19-50 ans	1000	25	18	4700	310	1.6	45	1500	55	8	70	420
Femmes enceintes 19-50 ans	1000	30	27	4700	<b>350</b>	2.0	50	1500	60	11	70	420
Lactation 19-50 ans	1000	45	9	5100	<b>310</b>	2.6	50	1500	70	12	70	420

**RDA\*** : *Recommended daily allowance*. Exprimée en mg / jour, par personne pour les hommes adultes. Toutes les valeurs sont exprimées sur le poids sec.

<sup>a</sup> : (**AI** : *Adequate Intake*), Apport suffisant, exprimé en mg/jour, par personne pour les hommes et les femmes adultes)

À titre d'observation préliminaire, l'estimation des valeurs d'apport probables pour la consommation de ces échantillons montre que les teneurs en éléments toxiques sont inférieures aux valeurs toxicologiques de référence. Elles se sont avérées conformes aux recommandations alimentaires, sauf pour le fer lors de la consommation de 10 grammes par jour de plante *Mentha pulegium*, pour laquelle les résultats montrent que les apports journaliers en Fe (16 mg/jour) sont supérieurs aux apports journaliers recommandés pour les hommes (8 mg/jour) et la femme allaitante (*Lactation*) (9 mg/jour) (Figure. III.2).

Pour les autres éléments essentiels, ils sont tous inférieurs aux limites admissibles recommandées par la commission conjointe OMS-WHO / FAO. Notons que la teneur en éléments toxiques est bien inférieure aux valeurs toxicologiques de référence (Tableau III.3) et s'avère conforme aux recommandations nutritionnelles (Tableau III.3).



**Figure III.3 :** Comparaison entre les valeurs mesurées et la tolérance limite des éléments essentiels et toxiques

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les remèdes traditionnels à base de plantes sont des substances naturelles qui sont utilisés pour traiter et soulager localement de nombreuses maladies [95]. La surveillance de la teneur en minéraux des plantes médicinales est considérée comme l'un des aspects les plus importants de la sécurité avant d'évaluer l'utilisation pharmaceutique. Cette étude rapporte le contenu des concentrations en éléments minéraux dans la partie aérienne des trois plantes étudiées et évalue leurs risques pour la santé.

- Les oligo-éléments essentiels sont très importants pour l'activité physique et nutritionnelle du corps humain, où la santé humaine en a besoin de beaucoup d'entre eux tels que le calcium, le potassium, le fer et le sodium.

Description et apports des oligo-éléments essentiels pour le corps humain :

- **Calcium** : est un minéral essentiel de symbole (Ca) dans le tableau périodique des éléments. Le Ca est le seul minéral le plus abondant dans le corps humain, environ 1 à 1,2 kg chez l'adulte. La fonction principale de cet élément est celle d'édification et de renouvellement du squelette. En effet, 99 % du calcium contribue à la formation et à la solidité des os et des dents. La faible part de calcium extra-osseux (1%) est toutefois tout aussi importante que la vaste réserve squelettique puisqu'elle intervient dans de multiples fonctions indispensables telles que la contraction musculaire et cardiaque, la coagulation sanguine, les échanges cellulaires, la perméabilité membranaire, la libération d'hormones et la transmission de l'influx nerveux. À tout âge, il est donc primordial d'assurer une couverture permanente et suffisante des besoins en calcium. Un apport suffisant de celui-ci et conforme aux apports nutritionnels conseillés aurait un effet préventif vis-à-vis de l'hypertension artérielle. Par contre, un régime alimentaire faible en calcium, peut créer des carences comme autres la fragilisation des os qui se manifestent la plupart du temps tardivement. En conséquence, il est indispensable de s'assurer une quantité suffisante en calcium de manière permanente. Pour cela, il est nécessaire d'avoir une alimentation variée et équilibrée. En outre, un complément alimentaire à base de calcium peut être pris. Dans cette étude, les concentrations obtenues pour Ca varient de 6903 à 31875 mg / kg. Notons que la plus faible concentration concerne la plante *M. chamomilla* L. En revanche, la plante *Mentha pulegium* L., est la plus riche en calcium. Une prise de 10 grammes de cette plante, permet d'obtenir une grande proportion de calcium soit 319 mg de Ca / jour, personne, soit près du tiers des 1000 mg / jour, personne recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé OMS - WHO/FAO
- **Chrome** : de symbole Cr dans le tableau périodique des éléments, c'est un oligo-élément dont la fonction principale est majeure pour le fonctionnement de l'organisme : il régule la sécrétion de l'insuline pancréatique de façon à maintenir constant le taux de sucre dans le sang (glycémie). La concentration de Cr varie de 0,45 à 1,01 mg / kg. On remarque que la plante *T. polium* L. est la plus riche en Cr. En revanche, la plante *M. chamomilla* L. en contient la plus faible teneur. Lors de la consommation des plantes étudiées en particulier *Teucrium polium* L., la valeur RDA recommandée par l'OMS / FAO doit être prise en considération.

- **Cobalt** : de symbole Co dans le tableau périodique, le cobalt est un élément métallique dur et gris. C'est un élément essentiel pour la santé humaine. Il doit son caractère essentiel en tant qu'atome de liaison central à la vitamine B12 (également appelée cobalamine) qui est nécessaire pour le métabolisme des folates et des acides gras. En effet, le cobalt entre dans la structure de la vitamine B12 (le cobalt n'est présent dans l'organisme qu'en compagnie de la vitamine B-12). Celle-ci est essentielle à la production des globules rouges (érythropoïèse). Il est également nécessaire au bon fonctionnement du système nerveux. Il fait partie du cycle de Krebs biotine-dépendant. C'est le processus que le corps utilise pour décomposer les sucres en énergie. L'organisme humain ne peut fabriquer de la vitamine B12 sans apport de cobalt. Le cobalt via la vitamine B12 permet de combattre l'anémie et la carence en fer dans le sang. L'oligo-élément est également utilisé pour combattre les migraines et pour les troubles vasculaires qui se déclarent dans les membres inférieurs. Cependant, une forte concentration en Co peut avoir des effets très néfastes sur la santé [96–98]. Les résultats obtenus au cours de notre étude montrent que les concentrations en Co varient de 0,051 à 0,78 mg / kg. La plante *Mentha pulegium* L. présente la plus forte teneur en cobalt, contrairement à la plante *Matricaria chamomilla* L. qui a la plus faible concentration en Co (Tableau III.1). L'apport journalier recommandé (RDA) en cobalt n'a pas été fixé, car sa seule forme d'existence est la vitamine B12 dont il fait partie intégrante. Au Royaume-Uni (United Kingdom), on a fixé l'apport quotidien en vitamine B12 à 2.4 microgrammes / jour pour les adultes, 2.6 microgrammes / jour pour les femmes enceintes et 2.8 microgrammes / jour pour les femmes allaitantes.
- **Fer** : de symbole Fe dans le tableau périodique des éléments chimiques, le fer compte parmi les oligo-éléments essentiels pour le sang, En conséquence, il est important de consommer du fer tous les jours. Il intervient dans beaucoup de fonctions physiologiques, et plus particulièrement dans le transport et le stockage de l'oxygène dans le sang en tant que constituant de l'hémoglobine et le pigment rouge des globules sanguins. Le fer de l'hémoglobine transporte l'oxygène de l'air inspiré vers tous les organes de l'organisme. Les globules rouges, quant à eux, distribuent l'oxygène des poumons vers l'ensemble des cellules de l'organisme, leur permettant de produire l'énergie corporelle nécessaire. Le fer est également

essentiel au métabolisme énergétique cellulaire. Il intervient dans le stockage de l'oxygène au sein des cellules musculaires. Celles-ci ont la capacité de stocker l'oxygène pour permettre des réactions rapides. Dans les muscles, l'oxygène et les protéines contenant du fer se lient pour former la myoglobine, pigment d'origine respiratoire présent dans le muscle. Les analyses effectuées sur les plantés étudiées montrent que les concentrations en fer varient de 56 à 1604 mg / kg. Comme dans le cas du Co, *M. pulegium* L. présente la plus grande concentration en fer contrairement à la plante *M. chamomilla* L., dont la concentration est la plus faible.

\*\* Malgré l'importance du fer pour la santé humaine, son apport doit être respecté en-deçà des limites admissibles recommandées par le Comité mixte de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) / Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Afin d'éviter les risques d'intoxication due au fer, la consommation journalière de la plante *M. pulegium* L. doit être inférieure à 5 grammes.

- **Potassium** : de symbole K (dans le tableau périodique des éléments), le potassium compte parmi les sels minéraux. C'est un nutriment essentiel à l'alimentation. Il est présent dans chacune des cellules de l'organisme et joue un rôle majeur dans le bon fonctionnement de l'organisme humain, le maintien et l'équilibre de la différence de concentrations entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Il est à l'origine d'un potentiel d'action appelé influx nerveux qui permet d'activer les cellules nerveuses et musculaires. Les concentrations en potassium résultant de notre étude varient de 7619 à 14298 mg / kg. La plus faible des concentrations est attribuée à la plante *Teucrium polium* L.
- **Magnésium** : de symbole Mg, celui-ci est un minéral essentiel à de nombreuses fonctions de l'organisme humain. Cependant, il est surtout connu pour préserver l'équilibre nerveux et musculaire. Le magnésium (Mg) est impliqué dans plus de 300 réactions enzymatiques indispensables pour l'organisme. Le corps d'un adulte contient environ 25 grammes de ce minéral, dont environ 60 % sont stockés dans les os permettant de maintenir leur structure. Par ailleurs, 25 % sont utilisés par les muscles. Au sein de l'organisme, le magnésium participe à de nombreux processus tels que la production, le stockage et le transfert de l'énergie, le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, le fonctionnement du

système nerveux et des muscles, la réduction de la fatigue et le fonctionnement psychique. Il contribue également à la décontraction musculaire. Par ailleurs, le magnésium sert à la transmission de l'influx nerveux, à la fabrication de protéines et à la régulation du rythme cardiaque. Les teneurs en Mg déterminées dans notre étude varient de 145 à 441.5 mg / kg, la plus faible des concentrations concerne *M. chamomilla* L. La plante *M. pulegium* est, quant à elle, la plus riche en Mg.

- **Manganèse** : de symbole Mn, le manganèse fait partie des oligo-éléments essentiels, non-synthétisés par l'organisme. Il entre dans la composition de nombreuses enzymes indispensables à de multiples réactions avec celui-ci. Le manganèse contribue à l'assimilation des lipides et des glucides par notre corps. Il aide également à réguler notre taux de sucre dans le sang et à lutter contre les radicaux libres. Cependant, lorsque qu'il est présent à des concentrations trop élevées, il devient toxique. Le corps humain renferme environ 20 mg de manganèse répartis principalement dans les os, le foie, et les reins. Les risques en carences de ce minéral peuvent entraîner l'apparition de certains troubles tels que les atteintes nerveuses et osseuses.

Les concentrations de manganèse (Mn) obtenues dans cette étude varient de 28 à 71 mg / kg. La plus faible et la plus grande des concentrations concernent respectivement la plante *M. chamomilla* L. et la plante *M. pulegium* L.

- **Molybdène** : de symbole Mo, le molybdène compte là aussi parmi les oligo-éléments essentiels à l'organisme. On le retrouve en très faibles quantités dans l'organisme. Il est stocké surtout dans le foie et les reins. Cet élément permet notamment la synthèse de protéines, d'enzymes et des purines qui entrent dans la composition de l'ADN. En effet, il entre dans la composition de l'enzyme qui permet l'absorption du fer au niveau des intestins. Le molybdène renforce la solidité des dents et des os, il favorise entre autres la rétention du fluor. Sa carence dans l'organisme entraîne un dysfonctionnement du foie, ainsi que des problèmes buccaux et des inflammations gingivales. Ce manque (de molybdène) peut aussi aggraver certaines maladies telles que celles de Crohn, la sarcoïdose ou encore celle de Wilson, et causer migraines, vomissements et tachycardies. Les concentrations de molybdène (Mo) obtenues au cours de cette étude varient de 0,28 à 0,78 mg / kg. La plante *Teucrium polium* L. en présente la plus faible teneur.

- **Sodium** : élément chimique de symbole Na, il est le sixième élément le plus abondant dans la croûte terrestre, qui en contient 2.83 % et ce, sous différentes formes. Après le chlore, le sodium est le deuxième élément le plus abondant dissous dans l'eau de mer. Les sels de sodium les plus importants trouvés dans la nature sont le chlorure de sodium (sel de roche), le carbonate de sodium (soude), le borate de sodium (borax), le nitrate de sodium et le sulfate de sodium. Les sels de sodium sont trouvés dans l'eau de mer, les lacs salés, les lacs alcalins et dans l'eau de source minérale. Les concentrations de sodium (Na) obtenues dans cette étude varient de 803 à 10790 mg / kg. La plus faible concentration revient à la plante *Teucrium polium* L. La plante *Mentha pulegium* L. renferme la plus grande concentration en sodium
- **Zinc** : de symbole Zn dans le tableau périodique des éléments, le zinc est un oligo-élément essentiel pour la santé humaine. Il intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques et joue un rôle important dans la fonction immunitaire et ce, en protégeant le corps humain contre diverses maladies courantes. Il contribue également dans le rôle du métabolisme de la plante. Les concentrations en zinc (Zn) contenues dans les plantes étudiées varient de 19,35 à 44.5 mg / kg. La plus grande et la plus faible des concentrations reviennent respectivement aux plantes *M. pulegium* L. et *M. chamomilla* L. L'apport quotidien en zinc est entre 0.193–0.445 mg / jour. Cet apport nutritionnel est beaucoup moins important que celui recommandé par la DRA (8-12 mg / jour).

- **Les éléments potentiellement toxiques et apport quotidien tolérable (TDI)**

Plusieurs études se sont concentrées sur les problèmes toxicologiques et l'effet nocif des oligo-éléments sur la santé humaine. L'adoption de limites maximales acceptables pour leur consommation quotidienne peut avoir des effets néfastes sur la santé. Parmi ces éléments chimiques toxiques et nocifs pour la santé humaine, on retrouve le brome (Br), le thorium (Th) et l'antimoine (Sb). Le tableau III.3 montre que ces éléments potentiels toxiques (Br, Th et Sb) sont présents à des teneurs de traces tout comme le reste des éléments chimiques non-essentiels.

- ✚ Pour valider les résultats obtenus lors de notre travail, nous avons procédé à l'analyse des standards de références à savoir : NIST 1573a, NIST-1570a, IPE 189 et IPE 172.

Les choix judicieux de ces standards et des conditions d'irradiation, de décroissance et de mesure pour ce type d'analyse permettraient sans aucun doute d'améliorer la qualité des résultats. Généralement, l'évaluation est basée sur les comparaisons d'une part, des résultats calculés et certifiés de ces standards et d'autre part, des paramètres statistiques d'U-score et de Z-score.

L'évaluation à l'aide de l'U-score inclut les incertitudes des mesures et l'incertitude de la valeur trouvée. D'autre part, dans le cas du Z-score, l'incertitude de la mesure n'est pas prise en compte dans l'évaluation de la performance. Cependant, la performance de la méthode est plus significative par l'application de l'U-score.

Dans ces contextes, on note que les valeurs calculées sont en accord avec les valeurs certifiées pour la majorité des éléments analysés. Les paramètres statistiques d'évaluation indiquent que les résultats obtenus sont considérés acceptables du point de vue analytique. Les valeurs des paramètres statistiques Z-score et U-score révèlent que la validation par les CRM est la démarche la plus recommandée par la norme ISO17025 : 2005. Pour la majorité des éléments, on remarque que les valeurs calculées et les valeurs certifiées sont proches.

D'une manière générale, les standards de NIST-1570a et NIST-1573a présentent les meilleurs résultats en comparaison avec le IPE 189 et IPE 172. Par voie de conséquence, on conclut que parmi les deux standards de NIST, celui utilisé pour doser les éléments est le meilleur choix quant à son utilisation dans le dosage des éléments de nos échantillons.

✚ Au cours de cette étude et lors de la détermination des éléments minéraux par la technique d'INAA, on n'a observé que l'absence de l'élément sélénium (Tableau III.1). Notons que cette technique est utilisée en routine dans notre laboratoire pour le dosage des éléments minéraux, notamment ceux de faible concentration. Parmi les raisons qui n'ont pas permis de détecter le sélénium, c'est sa faible concentration qui a entraîné des hauteurs de pics du Se négligeables (21,12 keV, 136 keV, 264,66 keV, 279,54 keV, 400 keV) en présence d'autres pics plus émergents et qui s'imposent dans le plateau de Compton (Figure III.2). Pour pallier ce problème analytique, il a été nécessaire de mettre en place la technique de séparation radiochimique (RNAA) du sélénium pour les échantillons en question.

Les résultats des teneurs en sélénium présent dans les échantillons de *M. pulegium* L. obtenus par la méthode RNAA sont présentés dans le tableau III.11, avec un rendement de radio-séparation suffisant et égal à  $(85,47 \pm 1,53) \%$  [26,99,100]. D'autre part, pour estimer correctement ce résultat et valider la méthode de RNAA implémentée, on a utilisé le standard de NIST-1573a comme référence. Le résultat de NIST1573a de sélénium

obtenu par RNAA est présenté dans le tableau III.1. À partir de ces résultats obtenus, on peut conclure que la validation de la technique RNAA a été satisfaisante.

### III.3. Analyse des compositions chimiques organiques (composés organiques volatils et non-volatils)

Dans cette partie, l'analyse des compositions chimiques organiques se compose de deux volets dont le premier est consacré aux huiles essentielles extraites à partir des trois plantes étudiées à savoir : *Mentha pulegium* L., *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L. Quant au second, il est dédié pour l'analyse des composés organiques non-volatils des extraits bruts (extraits méthanoliques).

#### III.3.1. Huiles essentielles des plantes

Dans cette partie, les huiles essentielles (HE) des parties aériennes des trois plantes, *T. polium* L., *M. chamomilla* L. et *M. pulegium* L., ont été extraites par hydro-distillation (HD) avec un appareil de Clevenger, à l'exception de *M. pulegium* où les HE ont été obtenues par trois méthodes qui sont l'hydro-distillation (HD), la distillation à la vapeur (SD) et la distillation aux micro-ondes (MAD)). Tous les d'extraits d'HE ont été collectés séparément dans des vials sombres, séchés au sulfate de sodium anhydre, étiquetés et conservés à une température +4°C jusqu'à leur utilisation.

Le rendement moyen pour l'ensemble des plantes varie de 0,023 % à 0,204 % (mL / g, poids humide) (Tableaux III.4-6). Au vu des résultats obtenus, on note que les meilleurs rendements reviennent à *M. pulegium* L. La différence des rendements des huiles essentielles est une routine courante puisqu'ils dépendent de plusieurs facteurs, à savoir la géographie des espèces, les pratiques culturales, la technique d'extraction, ...etc. Plusieurs travaux scientifiques ont montré que le rendement d'extraction des huiles essentielles varie en fonction de l'origine de la plante [101,102]. Les résultats montrent que le rendement en huiles essentielles de ces trois plantes étudiées est relativement faible.

Pour identifier l'ensemble des composés des extraits, l'analyse des huiles essentielles des trois plantes étudiées, *T. polium* L., *M. chamomilla* L. et *M. pulegium* L., a été réalisée dans un premier temps par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flammes (CPG / FID). Dans un deuxième temps, toutes les huiles essentielles ont été analysées par

chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). L'identification des constituants chimiques d'HE des trois plantes a été obtenue par l'utilisation des indices de rétention (IR) sur colonnes, polaire et apolaire, par l'analyse des spectres de masse des composés constitutifs, et par la comparaison de ces données à celles des bases de données électroniques, WILEY et NIST, ainsi que des bases bibliographiques [77].

Les analyses chromatographiques de l'huile essentielle de *T. polium*, ont révélé la présence de 37 composés (Tableau III.4). Les monoterpènes hydrocarbonés qui représentent 71,46 % de la teneur totale en huiles essentielles sont le groupe principal. Ils sont suivis par les sesquiterpènes hydrocarbonés dont le taux s'élève à 16,32 %. Les monoterpènes oxygénés et les sesquiterpènes oxygénés sont présents à des taux respectifs de 4,64 % et de 0,60 % de la teneur globale. Cette huile est caractérisée par sa richesse en  $\beta$ -pinène, avec une teneur de 36,68 %, suivie par l' $\alpha$ -pinène (14,62 %), le D-germacrène (9,97 %), le limonène (9,78 %), et enfin le myrcène (7,98 %). Les autres composés détectés ont une teneur inférieure à 1,5%.

**Tableau III.4 :** Composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L.

N°	Composés <sup>a</sup>	IR <sup>a</sup>	HD	
			TR	%
1	2-hexenal	854	8,462	0,13
2	$\alpha$ -thujène	931	13,073	0,15
3	$\alpha$ -pinène	939	13,661	<b>14,62</b>
4	Camphène	953	14,454	0,3
5	$\beta$ -Pinène	980	16,948	<b>36,68</b>
6	Myrcène	991	18,033	<b>7,98</b>
7	Limonene	1031	20,642	<b>9,78</b>
8	Cis-Ocimène	1040	21,348	0,260
9	trans-Ocimène	1050	22,126	<b>1,30</b>
10	$\gamma$ -Terpinène	1062	22,738	0,1
11	Terpinolène	1088	24,916	0,29
12	Linalool	1098	25,960	0,68
13	Nonanal	1098	26,272	0,13
14	Nopinone	1137	28,387	0,20
15	trans-Pinocarveol	1139	28,569	0,86
16	Camphor	1143	28,912	0,19
17	trans-Verbenol	1144	29,066	0,27
18	Pinocarvone	1162	30,313	0,64
19	Borneol	1165	30,539	0,14
20	4-Terpineol	1177	31,417	0,18
21	$\alpha$ -Terpineol	1189	32,453	0,15
22	Myrtenal	1194	32,779	<b>1,26</b>
23	Nerol	1228	35,197	0,14
24	Bornyl acetate	1285	39,097	0,27
25	alpha,-Cubebène	1351	43,346	0,10
26	alpha,-Copaene	1376	44,977	0,12
27	$\beta$ -Bourbonène	1384	45,565	<b>1,06</b>
28	$\beta$ -elemène	1391	46,072	0,16

29	Germacrène-D	1480	51,799	<b>9,97</b>
30	$\beta$ -Selinène	1485	51,986	1,08
31	bicyclogermacrène	1494	52,603	<b>2,56</b>
32	$\alpha$ -Guaïène	1500	48,972	0,18
33	delta,-Cadinène	1524	54,192	0,93
34	Germacrène B	1556	56,009	0,16
35	Spathulenol	1576	57,224	0,36
36	$\beta$ -Eudesmol	1649	61,294	0,18
37	alpha,-Cadinol	1653	61,564	0,28
	<b>Total Identifié</b>			<b>93,84</b>
	<b>Rendement d'HE (v/w) %</b>			0,048
	<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>			71,46
	<b>Monoterpènes oxygénés</b>			4,64
	<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>			16,32
	<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>			0,82
	<b>Autres composés</b>			0,60

Avec: <sup>a</sup>: IR Indices de rétention déterminés expérimentalement et TR: Temps de rétention

✚ L'analyse de l'huile essentielle de *M. chamomilla* a révélé la présence de 45 composés (Tableau III.5). Cette huile se caractérise par sa richesse en 1,8-cinéole dont le taux s'élève à 13,63 %. Il est suivi de près par le D-germacrène (12,40 %), puis de l'artémisia cétone (8,38 %), le sabinène (7,28%), l' $\alpha$ -pinène (5,20 %), le  $\beta$ -pinène (3,25 %), l' $\alpha$ -muroloène (2,84 %), le 4-terpinéol (2,74 %), trans-caryophyllène (2,67 %), le  $\delta$ -élémente (2,55 %) et le trans-chrysanthényle acétate (2,27 %). Les autres composés détectés sont présents à des taux inférieurs à 1,8 %. On note également que les monoterpènes oxygénés (35,11 %) représentent la principale classe de cette HE suivis par celle des sesquiterpènes hydrocarbonés (26,94 %), des monoterpènes hydrocarbonés (20,06 %), et enfin des sesquiterpènes oxygénés (2,89 %).

**Tableau III.5 :** Composition chimique de l'huile essentielle de *Matricaria chamomilla* L.

N°	Composés	IR <sup>a</sup>	HD	
			TR	%
1	Santolina triène	908	11,831	0,39
2	$\alpha$ -pinène	939	13,576	<b>5,20</b>
3	Camphène	953	14,427	0,29
4	Sabinène	976	16,561	<b>7,28</b>
5	$\beta$ -pinène	980	16,694	<b>3,25</b>
6	Myrcène	991	17,854	<b>1,50</b>
7	Yomogi alcool	998	18,663	0,77
8	$\alpha$ -terpinène	1018	19,538	0,73
9	1,8-cinéole	1033	20,869	<b>13,63</b>
10	$\gamma$ -terpinène	1063	22,798	<b>1,1</b>
11	Artemisia cétone	1071	23,414	<b>8,38</b>
12	Artemisia alcool	1083	24,795	0,26
13	Erpinolène	1088	24,968	0,32

14	$\alpha$ -thujone	1102	26,295	<b>1,30</b>
15	chrysanthenone	1123	27,697	0,70
16	Trans-pinocarveol	1139	28,607	0,58
17	Camphor	1143	28,969	0,43
18	Pinocarvone	1162	30,373	0,83
19	Pinocamphone	1160	31,229	<b>1,70</b>
20	4-terpinéol	1177	31,698	<b>2,74</b>
21	$\alpha$ -terpinéol	1189	32,656	0,90
22	Myrtenal	1193	32,918	<b>1,60</b>
23	Myrtenol	1194	33,049	0,74
24	Citronellol	1228	35,457	0,33
25	Trans-chrysanthényl acétate	1235	35,837	<b>2,27</b>
26	Geraniol	1255	37,17	0,22
27	Cis-chrysanthényl acétate	1262	37,526	0,40
28	Bornyl acétate	1285	39,151	0,52
29	$\delta$ -élémente	1339	42,676	<b>2,55</b>
30	Neryl acétate	1365	44,548	0,55
31	Cyclosativène	1368	44,417	0,60
32	$\alpha$ -Copaène	1376	45,045	0,83
33	Geranyl acétate	1383	45,811	0,32
34	$\beta$ -élémente	1391	46,165	0,99
35	Trans-caryophyllène	1418	47,859	<b>2,67</b>
36	$\alpha$ -humulène	1454	49,84	0,52
37	(E)- $\beta$ -farnésène	1458	50,451	<b>0,51</b>
38	Germacrene-D	1480	51,952	<b>12,40</b>
39	Bicyclogermacrène	1494	52,661	<b>1,70</b>
40	$\alpha$ -Muuroène	1499	52,964	<b>2,84</b>
41	$\delta$ -cadinène	1524	54,266	<b>1,33</b>
42	Elémol	1549	55,728	0,26
43	spathuléol	1576	57,373	0,78
44	Caryophyllène oxide	1581	57,648	<b>1,22</b>
45	$\alpha$ -cadinol	1653	61,695	0,63
Composés totaux identifiés				<b>89,060</b>
Rendement d'HE (v/w) %				0,023
Monoterpènes hydrocarbonés				20,06
Monoterpènes oxygénés				35,11
Sesquiterpènes hydrocarbonés				26,94
Sesquiterpènes oxygénés				2,89
Autres composés				4,06

Les 26 constituants identifiés de l'huile essentielle contenue dans les parties aériennes de *Mentha pulegium* L. sont rapportés dans le tableau III.6. Ces composés représentent 85.74 % de la composition globale de cette huile. La pulégone, présente avec une teneur très importante de 74.81 %, est le composé majoritaire. Elle est suivie, mais de loin, par la menthone dont le taux s'élève à 13.01 %. D'autres composés, entre autres, la pipéritone (3.82 %), le limonène (1.55 %), la Cis-isopulégone (1.31 %) enrichissent la composition de cette HE. Les autres constituants présents ont une teneur inférieure à 1%.

Notons que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. se caractérise par une présence majoritaire très élevée en monoterpènes oxygénés dont la teneur est près de 94 %. Avec

des taux beaucoup moins importants, ils sont suivis par les monoterpènes hydrocarbonés (2,54 %), les sesquiterpènes hydrocarbonés (0,64 %) et enfin, les sesquiterpènes oxygénés (0,03 %).

**Tableau III.6 :** Variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. en fonction du mode d'extraction

N°	Composés	IR <sup>a</sup>	Techniques d'extraction					
			HD		SD		MAD	
			TR	%	TR	%	TR	%
1	$\alpha$ -Thujène	931	-	-	-	-	13,014	0,01
2	$\alpha$ -Pinène	939	13,415	0,42	13,441	0,24	13,415	0,07
3	Cyclohexanone, 3-methyl	952	14,494	0,07	14,532	0,04	14,494	0,01
4	Camphène	953	-	-	-	-	14,397	0,01
5	Sabinène	976	16,28	0,06	-	-	16,275	0,01
6	$\beta$ -Pinène	980	16,412	0,30	16,437	0,24	16,407	0,05
7	3-Octenone	986	17,408	0,20	17,439	0,17	17,418	0,04
8	Myrcène	991	17,731	0,16	17,757	0,11	17,726	0,01
9	3-Octanol	993	18,094	0,03	18,118	0,03	18,198	0,01
10	Pseudolimonène	1004	18,472	0,03	18,494	0,03	18,462	0,03
11	Limonène	1031	20,415	<u>1,55</u>	20,464	<u>1,37</u>	20,384	0,17
12	Terpinolène	1088	24,896	0,02	-	-	-	-
13	Linalool	1098	-	-	25,987	0,01	-	-
14	Menthone	1154	30,114	<u>13,01</u>	30,166	<u>8,69</u>	30,418	<u>5,72</u>
15	Isomenthone	1164	30,559	0,73	30,577	0,45	30,734	0,18
16	Cis-Isopulégone	1172	31,428	<u>1,37</u>	31,441	<u>1,11</u>	31,471	0,13
17	Menthol	1173	31,156	0,11	-	-	31,025	0,02
18	$\alpha$ -Terpineol	1189	33,356	0,14	34,004	0,18	32,965	0,02
19	Pulegone	1237	37,071	<u>74,81</u>	37,549	<u>73,17</u>	36,697	<u>71,52</u>
20	M'nthyl acetate	1294	38,592	0,23	38,754	0,28	38,503	0,02
21	Piperitone	1340	42,972	<u>3,82</u>	43,247	<u>5,77</u>	42,869	0,39
22	(E)-Caryophyllène	1418	47,728	0,16	47,779	0,18	47,685	0,04
23	$\alpha$ -Humulène	1454	49,849	0,43	49,911	0,56	49,800	0,07
24	Germacrène D	1480	51,542	0,05	51,565	0,03	52,513	0,08
25	(-)-Caryophyllène oxide	1581	57,495	0,01	57,519	0,05	57,490	0,14
26	Humulene Oxide	1606	59,001	0,02	59,032	0,09	59,004	0,20
Composés totaux identifiés			<b>97,73</b>		<b>92,80</b>		<b>78,95</b>	
Rendement d'HE (v/w) %			0,204		0,200		0,175	
Monoterpènes hydrocarbonés			2,54		1,99		0,36	
Monoterpènes oxygénés			93,99		89,38		77,98	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,64		0,77		0,19	
Sesquiterpènes oxygénés			0,03		0,14		0,34	
Autres composés			0,53		0,52		0,08	

Avec : (-) : non déterminé

Les propriétés physico-chimiques des HE telles que l'indice de réfraction, la densité et l'indice de réfraction, constituent un moyen de vérification et de contrôle de leur qualité. Dans cette étude, nous avons déterminé quelques propriétés des huiles essentielles obtenues par hydro-distillation à partir de *T. polium*, *M. chamomilla* et *M. pulegium*. Les

analyses ont été réalisées selon un protocole de normes émis par l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO). Les résultats sont rapportés dans le tableau III.7.

**Tableau III.7 :** Propriétés physico-chimiques des HE extraites à partir des plantes étudiées

Caractéristiques	<i>T. polium</i> L.	<i>M. chamomilla</i> L.	<i>M. pulegium</i> L.
Couleur	vert clair	Jaune pâle	jaune clair
Densité à 25°C (mg/ml)	870,2	933,9	933,9
Indice de réfraction	1,4727	1,4727	1,4760

Les plantes médicinales (PM) telles que la *T. polium* L., la *M. chamomilla* L. et la *M. pulegium* L., sont une source importante de substances naturelles utilisées en thérapeutique et ce, dans le monde entier et plus particulièrement en Algérie. D'après la littérature, il y a près de la moitié des médicaments, utilisés aujourd'hui, qui sont d'origine végétale, et le quart de ces médicaments renferme des extraits de plantes ou des molécules actives provenant directement de plantes. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 21 000 plantes ont une valeur médicinale sur 300 000 espèces disponibles dans le monde [103]. Cependant, malgré l'importance de ces substances naturelles, il est à noter qu'à peine près de 3000 plantes ont fait l'objet d'études scientifiques, chimiques, biologiques ou pharmacologiques [104].

Dans cette étude, pour les trois huiles essentielles extraites à partir des plantes étudiées, les résultats obtenus et répertoriés dans les tableaux III.4, 5 et 6, montrent des différences aussi bien qualitatives que quantitatives. Les rendements s'échelonnent entre 0,023 et 0,204 %.

En Algérie, la plante médicinale *M. pulegium* L. est largement utilisée en médecine traditionnelle. Le tableau III.8, représente la comparaison des teneurs en composés majoritaires de notre huile essentielle avec celles publiées dans la littérature [105–113]. La plupart des études ont indiqué que les monoterpènes oxygénés, avec à leur tête les trois cétones, la menthone, la pulégone et la pipéritone, sont majoritairement présents dans l'huile essentielle de *M. pulegium*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans notre étude, comme le montre le tableau III.8. Ce dernier montre également que nos résultats présentent une variabilité dans les teneurs des composés majoritaires avec les travaux scientifiques publiés dans la littérature [105,110,112].

**Tableau III.8 :** Comparaison des teneurs des composés majoritaires obtenus et présents dans l'HE de *M. pulegium* L. avec ceux publiés dans la littérature

Pays	Teneurs en % des composés majoritaires présents dans l'HE de <i>M. pulegium</i> L.					Technique d'extraction	Organe utilisé	Humidité (sec ou frais)
	Limonène	Menthone	Menthol	Pulegone	Piperitone			
<b>Nos données</b>	1,55 1,37 0,17	13,01 8,69 5,72	0,11 - 0,02	74,81 73,17 71,52	3,82 5,77 0,39	HD SD MAD	Partie aérienne	Fraîche
<b>Algérie</b> [105]	2,1	0,4	-	76,9	1,3	HD	Aériennes	sèche
<b>Algérie</b> [106]	4,29	19,24	-	38,82	6,35	HD	Aériennes	sèche
<b>Maroc</b> [107]	0,1	0,1	-	69,8	3,1	SD	Aériennes	sèche
<b>Maroc</b> [108]	0,2	4,8	-	74,6	-	HD	Aériennes	sèche
<b>Egypte</b> [109]	1,31	-	-	43,46	12,2	SD	Feuilles	sèche
<b>Portugal</b> [110]	0,40	9	1,3	80,6	0,04	HD	Feuilles	-
<b>Italie</b> [111]	0,70	1	-	86,2	-	HD	Aériennes	-
<b>Croatie</b> [112]	1,2	14	-	54,4	3,7	HD	Aériennes	fraîche
<b>Chili</b> [113]	-	20,48	28,79	29,33	-	HD	Aériennes	fraîche

Le tableau III.9 représente la comparaison des teneurs des composés majoritaires de l'huile essentielle de la plante *T. polium* L.

La comparaison des résultats obtenus avec ceux de la littérature montre dans un premier temps qu'il y a une prédominance des monoterpènes hydrocarbonés. Par ailleurs, cela n'exclut pas l'existence de certaines différences notamment pour le  $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -pinène en particulier pour *T. polium* L. de la Jordanie [114], la Croatie [115] et la Tunisie [116].-Cette variabilité-peut être attribuée aussi bien aux facteurs extrinsèques qu'aux facteurs intrinsèques.

En effet, selon Sofowora (1996) [117], la composition d'une plante en métabolites secondaires varie en fonction de la situation géographique, de l'organe prélevé, de la période, du moment de prélèvement et des conditions de stockage. Selon plusieurs auteurs, ces métabolites secondaires sont responsables des propriétés bioactives des plantes.

**Tableau III.9** : Comparaison des composés majoritaires obtenus de l'HE de *T. polium* avec ceux publiés dans la littérature.

Pays	Teneurs en % des composés majoritaires présents dans l'HE de <i>T. polium</i> L.					
	$\alpha$ -pinène	$\beta$ -pinène	Myrcène	Limonène	Germacrène-D	bicyclogermacrène
<b>Nos données</b>	14,62	36,68	7,98	9,78	9,97	2,56
<b>Algérie Bouira</b> [118]	3,30	11,3	1,7	4	25	10,4
<b>Algérie M'sila</b> [60]	9,7	32,8	7,8	7,3	16,6	3,2
<b>Iran</b> [119]	6,97	12,97	2,19	3,45	Nd	1
<b>Jordanie</b> [114]	0,74	1,48	0,48	0,66	2,38	Nd
<b>Croatie</b> [115]	Nd	0,3	0,1	5,9	8,7	Nd
<b>Tunisie</b> [116]	6,6	5,8	15,5	2,2	9	Nd
<b>Maroc</b> [120]	6,76	19,82	2,9	5,71	18,33	3,21

Avec : Nd: non déterminé

En ce qui concerne l'huile essentielle de la *M. chamomilla* L., sa composition chimique a été étudiée dans différents pays, entre autres, la Bosnie, l'Iran, le Népal, l'Égypte et l'Éthiopie [121–125]. Ces études ont montré sa grande variabilité aussi bien qualitative (composés différents) que quantitative (proportions différentes de certains composés).

D'après les résultats présentés dans le tableau III.10, il y apparaît des différences dans la concentration des composés. Ces variations peuvent parfois être dues à des changements climatiques, géographiques, saisonniers, ou tout simplement à la quantité d'arrosage ou à la fertilisation utilisée. Les pratiques culturales peuvent également jouer un rôle important dans la variabilité de la composition chimique des huiles essentielles. Le régime hydrique appliqué à la plante ou l'apport d'engrais vont avoir une grande influence sur les caractéristiques de l'huile essentielle. Ces variations peuvent également avoir une origine génétique.

Enfin, ces variations sont également attribuées aux méthodes d'extraction des HE [126].

**Tableau III.10** : Comparaison des résultats obtenus pour les composés majoritaires de l'HE de *M. chamomilla* L. avec ceux publiés par la littérature.

Teneurs en (%) des composés majoritaires	Pays					
	Algérie (Nos données)	Bosnie[121]	Iran[122]	Népal[123]	Égypte[124]	Éthiopie[125]
$\alpha$ -pinène	5,20	1,9	0,32	0	0,22	6,953
Sabinène	7,28	0,6	0,14	0,2	0,29	Nd
1,8-cinéole	13,63	0,1	0,13	Nd	Nd	4,139
Artemisia cétone	8,38	0,7	1,05	Nd	nd	Nd
Germacrene-D	12,40	6,2	3,82	9,1	3,71	Nd

Avec : Nd: non déterminé

Dans un souci écologique, économique, production de produits d'une part, à haute valeur ajoutée et d'autre part, les plus proches possible de leurs structures originelles (sans dénaturation), et afin de satisfaire du mieux possible les critères exigés pour la qualité d'une huile essentielle, ces dernières années, plusieurs techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques ont été développées. On retrouve celles assistées par micro-ondes, aux ultrasons ou encore l'utilisation d'un solvant supercritique ou la détente instantanée contrôlée (DIC) [73,127,128] .

En effet, les composés volatils constituant les huiles essentielles sont connus pour être sensibles à la chaleur et aux réactions chimiques. Lors de leur extraction, certaines techniques peuvent entraîner une perte de composés ou leur décomposition (composés insaturés) par action thermique ou par hydrolyse. L'extraction par solvants organiques est quant à elle pointée du doigt, car souvent elle est à l'origine d'une présence résiduelle de solvants organiques plus ou moins toxiques.

### III.3.2. Les extraits bruts (extraits méthanoliques)

#### III.2.2.1. Rendement d'extraction

L'extraction par macération à froid dans le méthanol a été appliquée pour les trois plantes étudiées (*Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., et *Mentha pulegium* L.).

Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = ((P_{S1} - P_{S2}) / P_{S3}) \dots \text{ ( Equation III.1)}$$

Avec :

$P_{S1}$  : poids du bécher avec l'extrait sec ;  $P_{S2}$  : poids du bécher vide ;  $P_{S3}$  : poids de la poudre initiale.

Le Tableau III.11 représente le rendement d'extraits bruts exprimés en (%) obtenus par macération à froid dans le méthanol et ce, pour les 3 plantes. Les rendements varient entre 15 et 20 %, le plus élevé a été obtenu pour la plante *Teucrium polium* L. (20,45 %) suivi par celui de *Matricaria chamomilla* L. (18,32 %) et de *Mentha pulegium* (15,16). Ces différences en taux d'extraction laissent suggérer que l'abondance des métabolites secondaires dépend entre autres de leur localisation dans chacune de ces plantes et de la structure cellulaire de celles-ci. [129].

**Tableau III.11** : Rendement (%) d'extraction des parties aériennes des plantes *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L.

plantes	Rendement (%)
<i>Teucrium polium</i> L.,	20,45±0,4
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	18,32 ± 0,34
<i>Mentha pulegium</i> L.	15,17 ± 0,17

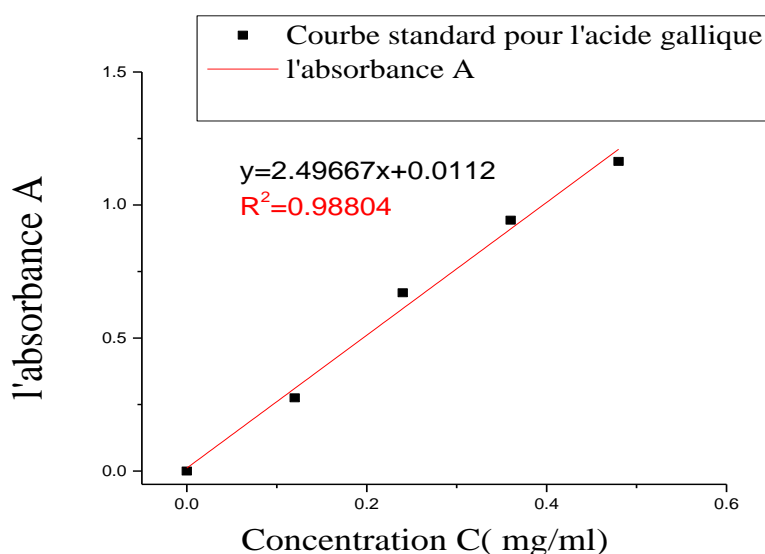
#### III.3.2.2. Évaluation des teneurs en composés phénoliques (TPC)

La mesure de l'absorbance d'une série de solutions de concentrations connues d'acide gallique a permis de tracer la droite d'étalonnage (Figure III.4). Les teneurs en composés phénoliques de chaque extrait obtenu à partir des plantes *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L., ont été alors déterminées à partir de cette courbe d'étalonnage de l'acide gallique pris comme référence.

La mesure de l'absorbance pour chacun des extraits soumis au même protocole d'évaluation a été réalisée en duplicata. On rapporte l'absorbance moyenne pour chacune des solutions d'extrait de concentration inconnue sur l'axe des ordonnées. On trace la droite parallèle à l'axe

des abscisses. L'intersection de cette parallèle avec la courbe d'étalonnage permet de lire directement la concentration inconnue en TPC des extraits.

Pour une meilleure précision, on remplace l'absorbance moyenne de chacun des extraits dans l'équation de la droite d'étalonnage ( $y = 2,49667x + 0,0112$  avec  $y$  l'absorbance et  $x$  la concentration). De cette équation, on en déduit  $x$  (concentration de chacun de nos extraits). Elle est exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait obtenu (mg EAG/g d'EX). Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau III.12.



**Figure III.4 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

**Tableau III.12 :** Teneurs en composés phénoliques contenus dans les plantes étudiées

Plantes	Teneur des composés phénoliques totaux (TPC) en mg EAG/g d'EX
<i>Teucrium polium</i> L.	37,99±0,22
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	41,90± 0,32
<i>Mentha pulegium</i> L.	24,49± 0,19

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 3 essais pour chaque échantillon)

### III.3.2.3. Évaluation des teneurs en flavonoïdes (TFC)

La mesure de l'absorbance d'une série de solutions de concentrations connues de rutine a permis de tracer la droite d'étalonnage (Figure III.5). Les teneurs en composés flavoniques de chaque extrait obtenu à partir des plantes *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L., ont été alors déterminées à partir de cette courbe d'étalonnage obtenue avec la rutine prise comme référence.

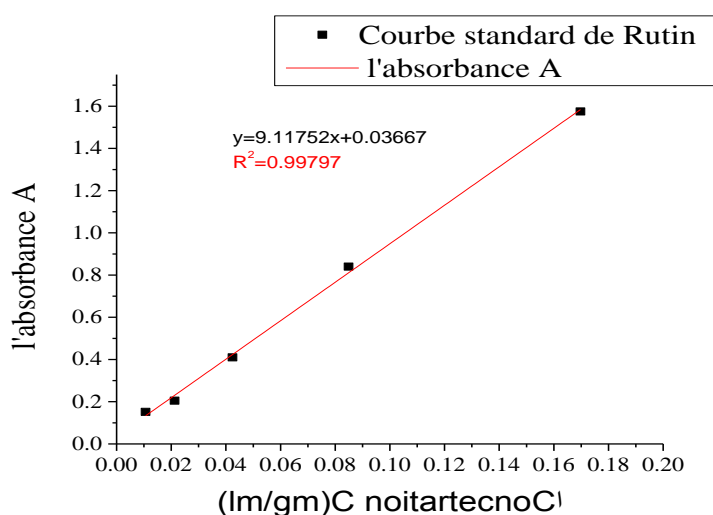
La mesure de l'absorbance pour chacun des extraits soumis au même protocole d'évaluation des flavonoïdes totaux a été réalisée en duplicata. D'une manière similaire à celle des phénols totaux, on rapporte l'absorbance moyenne pour chacune des solutions d'extrait de concentration inconnue sur l'axe des ordonnées. On trace la droite parallèle à l'axe des abscisses. L'intersection de cette parallèle avec la courbe d'étalonnage, obtenue avec la rutine, permet de lire directement la concentration inconnue en TFC de chacun des extraits.

Pour une meilleure précision, on remplace l'absorbance moyenne de chacun des extraits dans l'équation de la droite d'étalonnage ( $y = 9,11752x + 0,03667$  d'où  $x = ((y - 0,03667) / 9,11752)$  avec  $y$  l'absorbance et  $x$  la concentration). De cette équation, on en déduit  $x$  (concentration de chacun de nos extraits). Elle est exprimée en milligrammes d'équivalents de rutine par gramme d'extrait obtenu (mg RuE / g EX). Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau III.13.

**Tableau III. 13 :** Rendements en flavonoïdes totaux (TFC) contenus dans les extraits méthanoliques des parties aériennes de plantes *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L.

Teneur des flavonoïdes totaux (mg RuE/g EX)	Plantes		
	<i>Teucrium polium</i> L.	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	<i>Mentha pulegium</i> L.
	23,75 ± 0,41	17,05 ± 1,24	18,77 ± 0,14

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 3 essais pour chaque échantillon).



**Figure III.5 :** Courbe standard de la rutine

Même si la macération à froid reste une méthode d'extraction non-épuisante, les résultats obtenus montrent que les parties aériennes des plantes étudiées présentent de rendements conséquents en composés phénoliques et flavonoïdes.

L'extrait brut des *Teucrium polium* L. enregistre le meilleur rendement (20,45 %), suivi par celui de *Matricaria chamomilla* L. (18,32 %) et *Mentha pulegium* L., (15,17 %).

En ce qui concerne les phénols totaux de la plante *Matricaria chamomilla* a le plus grand rendement (41,90 mg EAG / g d'extrait) suivi par de *Teucrium polium* L. (37,99 mg EAG / g d'extrait) et *Mentha pulegium* (24,49 mg EAG / g d'extrait). Les résultats du dosage des flavonoïdes totaux contenus dans les extraits méthanoliques des plantes *Teucrium polium* L., *Mentha pulegium* L. et *Matricaria chamomilla* L, sont respectivement, de 23,75 ; 18,77 et 17,05 mg RuE / g d'extrait (Tableau III.13).

A l'exception de quelques différences qui subsistent et qui peuvent être attribuées aussi bien aux facteurs extrinsèques qu'aux facteurs intrinsèques, les résultats obtenus pour les extraits méthanoliques des plantes étudiées montrent une grande similitude avec ceux de la littérature (Tableau III.14).

**Tableau III.14** : Comparaison des résultats des TPC et TFC obtenus (à partir de *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L.) avec ceux donnés par la littérature.

Plantes	Nos résultats		Résultats publiés dans la littérature [130-141]			
			M'sila [130]	Tunisie[131]	Maroc[132]	Serbie [133]
<i>Teucrium polium</i> L.						
	TPC	37,99	86,63	34,7	95,53	233,68
	TFC	23,75	24,43	2,67	101,9	47,8
	R (%)	20,45	17,5	Nd	Nd	Nd
<i>Matricaria chamomilla</i> L.			Boumerdès[134]	Egypte[135]	Maroc[136]	Iran[137]
	TPC	41,90	50,75	22,4	19,62	7,94
	TFC	17,05	36,72	1,8	17,2	3,15
	R (%)	18,32	15,2	Nd	16,76	Nd
<i>Mentha pulegium</i> L.			El-Tarf [138]	Tunisie[139]	Croatie [140]	Turquie [141]
	TPC	24,49	17,00	37,4	157,92	97,2
	TFC	18,77	13,72	33,83	18,58	20,88
	R (%)	15,168	Nd	24	10,68	25,85

Avec : Nd : non déterminé

Les travaux de Ksouri et al. (2008) [142] ont rapporté que le contenu en composés phénoliques dans les plantes dépendent d'une part, des conditions environnementales comme la température, l'intensité lumineuse et la salinité et d'autre part, des facteurs biologiques tels que le génotype, l'organe et l'ontogénèse. Par ailleurs, la solubilité des composés phénoliques est régie par le type d'extraction, du solvant utilisé, leur degré de polymérisation et leur interaction [142].

### III.4. Étude des activités biologiques des huiles essentielles et extraits méthanoliques

#### III.4.1. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant des huiles essentielles et des extraits méthanoliques *in vitro*

Dans cette étude, la mise en évidence du pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits méthanoliques des plantes étudiées a été réalisée par quatre techniques chimiques qui sont : la méthode du DPPH•, l'ABTS+, le blanchiment du  $\beta$ -carotène et l'inhibition du radical galvinoxyl (GOR)

##### III.4.1.1. Activité antioxydante déterminée par la méthode du DPPH

La méthode du DPPH• est rapide, et simple tout en étant très sensible [143]. D'après les travaux scientifiques, près de 90 % des études utilisent la méthode du DPPH• [144].

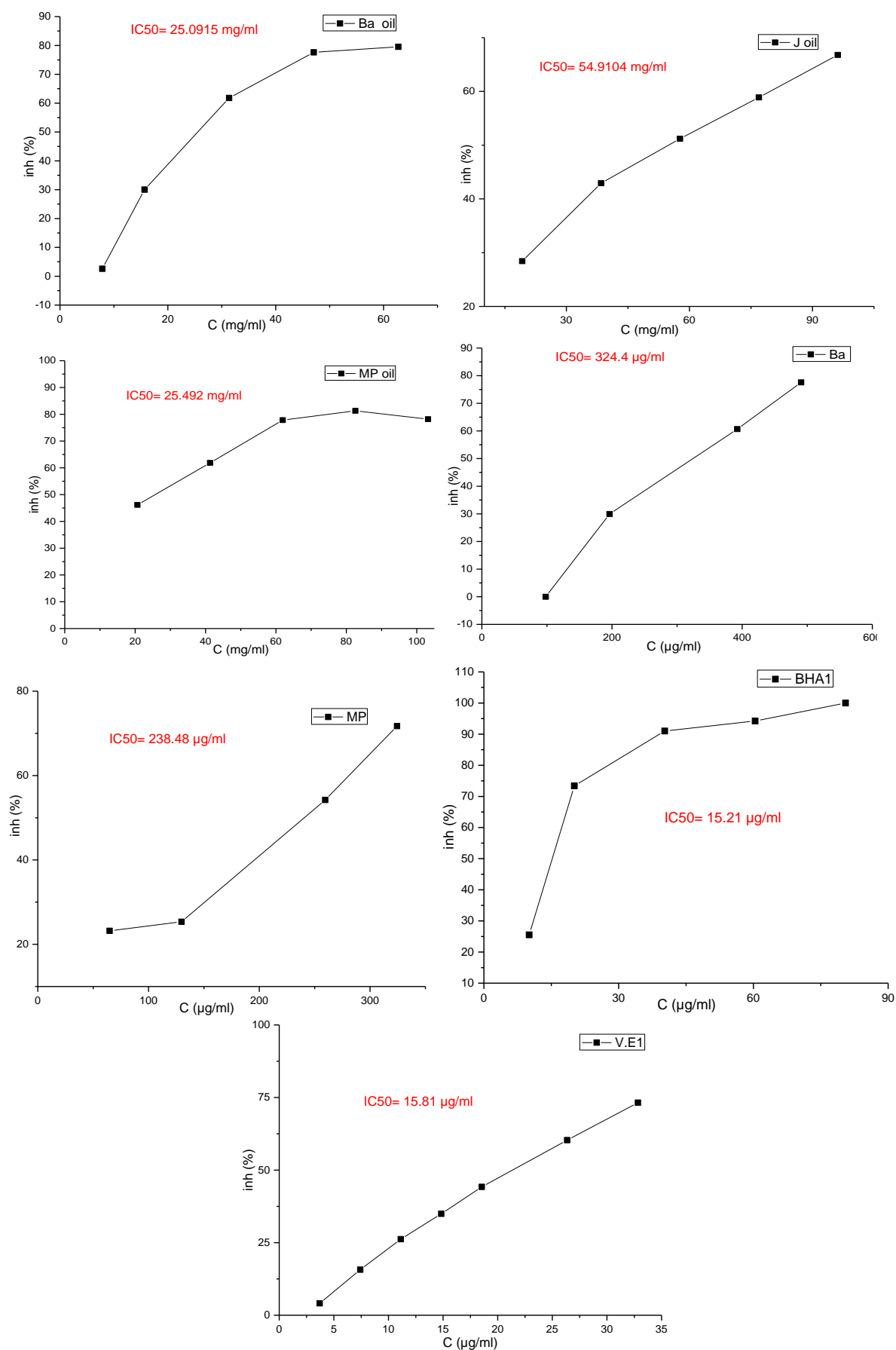
Pour chaque échantillon testé, les graphes de l'absorbance du radical libre DPPH en fonction des concentrations utilisées permettent d'obtenir le-pourcentage d'inhibition pour chacune de ces concentrations (Figure III.6).

Les résultats obtenus pour la concentration d'inhibition de la moitié de la quantité initiale (IC<sub>50</sub>) des radicaux présents dans chacun des extraits étudiés (huiles essentielles et extraits méthanolique) sont rapportés dans le tableau III.15.

**Tableau III.15** : Concentration inhibitrice IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) *in vitro* des extraits (huiles essentielles et extraits méthanoliques) obtenus à partir des plantes étudiées

Plantes et standards	Nature de l'extrait	Symbole	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
<i>Teucrium polium</i> L.	Huile essentielle	J-oil	54910,4 $\pm$ 34,0
	Extrait méthanolique	J	<b>8,68 <math>\pm</math> 0,33</b>
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Huile essentielle	Ba-oil	25091,5 $\pm$ 12,0
	Extrait méthanolique	Ba	324,40 $\pm$ 3,33
<i>Mentha pulegium</i> L.	Huile essentielle	MP-oil	25 492 $\pm$ 272
	Extrait méthanolique	MP	233,35 $\pm$ 5,98
Standards de référence	Butylhydroxytoluène (BHT)	BHT1	12,99 $\pm$ 0,41
	Butylhydroxyanisol (BHA)	BHA	15,21 $\pm$ 0,41
	Vitamine E (ou $\alpha$ -Tocophérol)	V.E 1	15,81 $\pm$ 0,54

\* Valeurs moyennes de trois mesures (n = 3)  $\pm$  SD.



**Figure III.6 :** % d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des extraits (huiles essentielles, extraits méthanoliques et standards)

L'activité anti-oxydante des huiles essentielles et extraits méthanoliques de nos échantillons vis-à-vis du radical libre DPPH a été évaluée en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H). Les résultats obtenus pour cette étude (tableau III.15) indiquent clairement que tous les extraits méthanoliques présentent nettement une plus grande activité anti-oxydante que les huiles essentielles vis-à-vis de ce radical libre DPPH. Les concentrations minimales des extraits méthanoliques obtenus à partir des plantes *Teucrium polium* L., *Mentha pulegium* L. et *Matricaria chamomilla* L. sont respectivement de 8,68, 233,35 et 324,40 µg / mL contre 54910,4, 25091,5 et 25 492,0 (µg / mL) pour leurs huiles essentielles respectives.

En conséquence, l'extrait méthanolique de *Teucrium polium* avec sa concentration de 8,68 µg/mL possède le meilleur pouvoir antioxydant en comparaison avec les huiles essentielles (dont le pouvoir antioxydant reste très modéré), et même avec les standards commerciaux BHT, BHA et vitamine E dont les valeurs respectives restent très proches puisqu'elles sont évaluées à 12,99, 15,21 et 15,81 µg / mL.

Ce résultat est probablement lié d'une part, à la richesse de *Teucrium polium* L. en composés phénoliques et flavonoïdes évalués respectivement à 23,75 mg EAG / g d'extrait et 37,99 mg RuE / g d'extrait et d'autre part, à une éventuelle synergie entre les différents composés. Par ailleurs, les huiles essentielles extraites des plantes étudiées ne sont pas riches en composés phénoliques comme le montrent les différents résultats (Tableau. III 4,5 et 6).

Aussi, on constate que les extraits méthanoliques des plantes *Mentha pulegium* L. et *Matricaria chamomilla* L., même s'ils ont montré une activité anti-radicalaire plus importante que celle des huiles essentielles, cette activité est plus faible en comparaison avec celle des standards

BHT (IC<sub>50</sub> = 12,99 µg / mL), BHA (IC<sub>50</sub> = 15,21 µg / mL) et α-Tocophérol (IC<sub>50</sub> = 15,81 µg / mL).

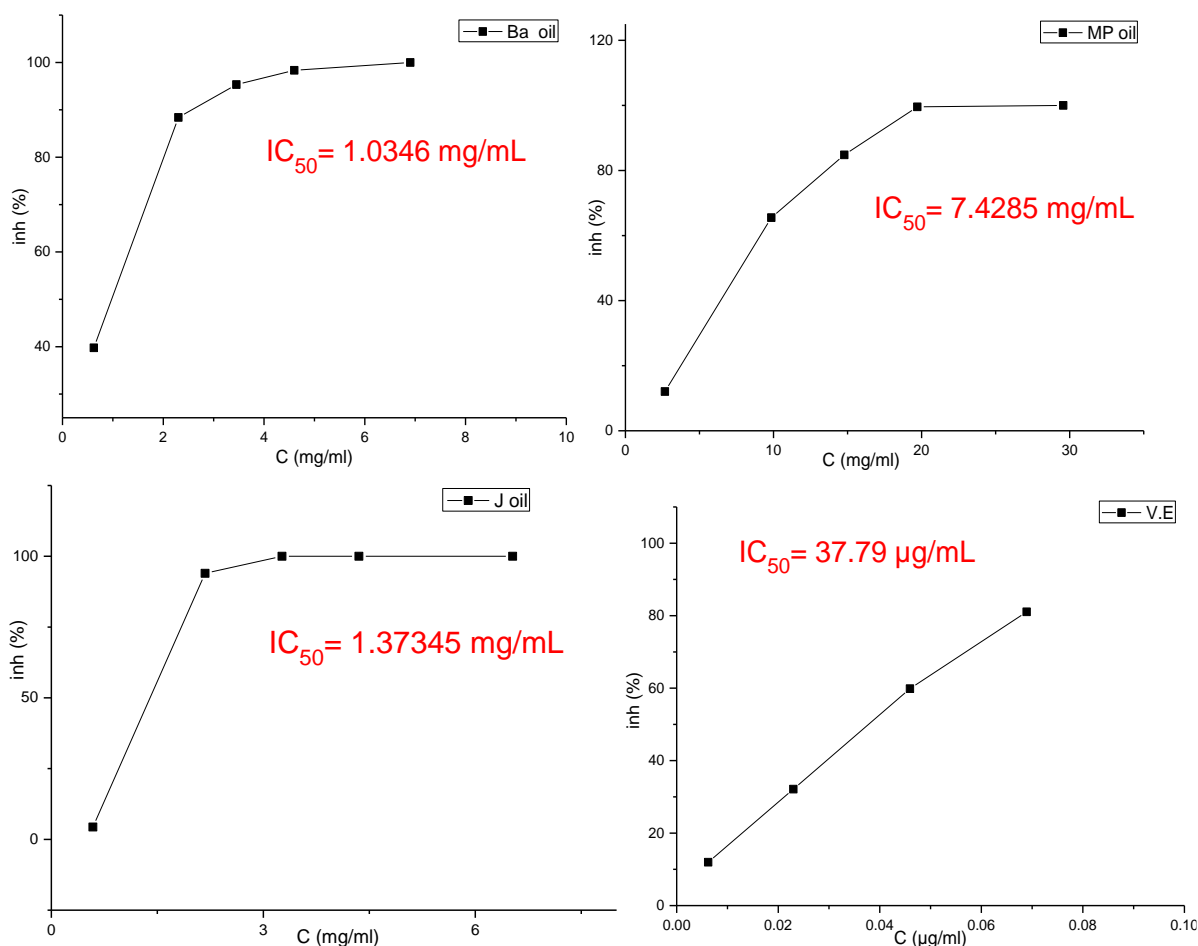
De cette étude, il en ressort que les résultats obtenus, sont en accord avec de nombreuses études *in vitro* sur l'activité anti-oxydante des extraits de plantes qui ont montré une corrélation linéaire significative entre la teneur totale en phénols et l'activité anti-oxydante. Ceci est particulièrement mis en évidence par le test DPPH [145]. En revanche, dans notre cas *Matricaria chamomilla* L. possède la plus grande quantité en flavonoïdes qui est de 41,90 mg RuE / g d'extrait et paradoxalement le plus petit pouvoir antioxydant. Cela peut suggérer que celui-ci dépend d'une part de la teneur des composés polyphénoliques et d'autre part de leur structure et de leur synergie mutuelle [129].

### III.4.1.2. Activité anti-oxydante déterminée par la méthode de l'ABTS+

Les résultats du test de mesure obtenus par méthode de l'ABTS à partir des graphes de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque échantillon testé (Figure III.7) sont répertoriés dans le tableau III.16.

**Tableau III.16** : Résultats de la capacité anti-oxydante des huiles essentielles des plantes étudiées par la méthode de l'ABTS+

Plantes et standard de référence	Symboles	ABTS IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
<i>Teucrium polium</i> L.	J oil	373,45 $\pm$ 17
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Ba oil	1034,6 $\pm$ 22
<i>Mentha pulegium</i> L.	MP oil	7402 $\pm$ 34
Composé de référence	Vit.E ( $\alpha$ -Tocophérol)	37,79 $\pm$ 0.28



**Figure III.7** : Evaluation graphique par la méthode ABTS des activités anti-oxydantes des huiles essentielles contenues dans les trois plantes étudiées et des standards de référence.

Les tests d'activité anti-oxydante obtenus par la méthode de l'ABTS ont été réalisés uniquement sur les huiles essentielles des plantes étudiées.

Les concentrations minimales d'inhibition IC<sub>50</sub> obtenues pour les trois huiles essentielles de *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L. sont respectivement de 373,45, 1035 et 7402 µg / mL. Quant à celle du standard de référence, l'α-tocophérol (vitamine E), cette concentration est de 37,79 µg / mL. Les valeurs obtenues pour les trois HE indiquent que celles-ci ont une activité anti-oxydante très modérée en comparaison avec celle de la vitamine E. Cependant, l'HE de la plante *Teucrium polium* L. a montré une activité anti-oxydante nettement supérieure à celle des deux autres plantes. En effet, elle est respectivement 3 et 20 fois supérieure à celles de *Matricaria chamomilla* L. et de *Mentha pulegium* L. En revanche, cette activité est pratiquement dix fois inférieure à celle du standard de référence, en l'occurrence, l'α-tocophérol.

En conclusion, il en ressort de cette étude que d'une part, *Teucrium polium* L. présente la meilleure activité anti-oxydante en comparaison avec les deux autres plantes et d'autre part, cette activité est très modérée, ce qui est le cas de nombreuses huiles essentielles en particulier celle dont le contenu est faible en composés phénoliques.

#### III.4.1.3. Evaluation de l'activité anti-oxydante par le test de blanchissement du β-carotène

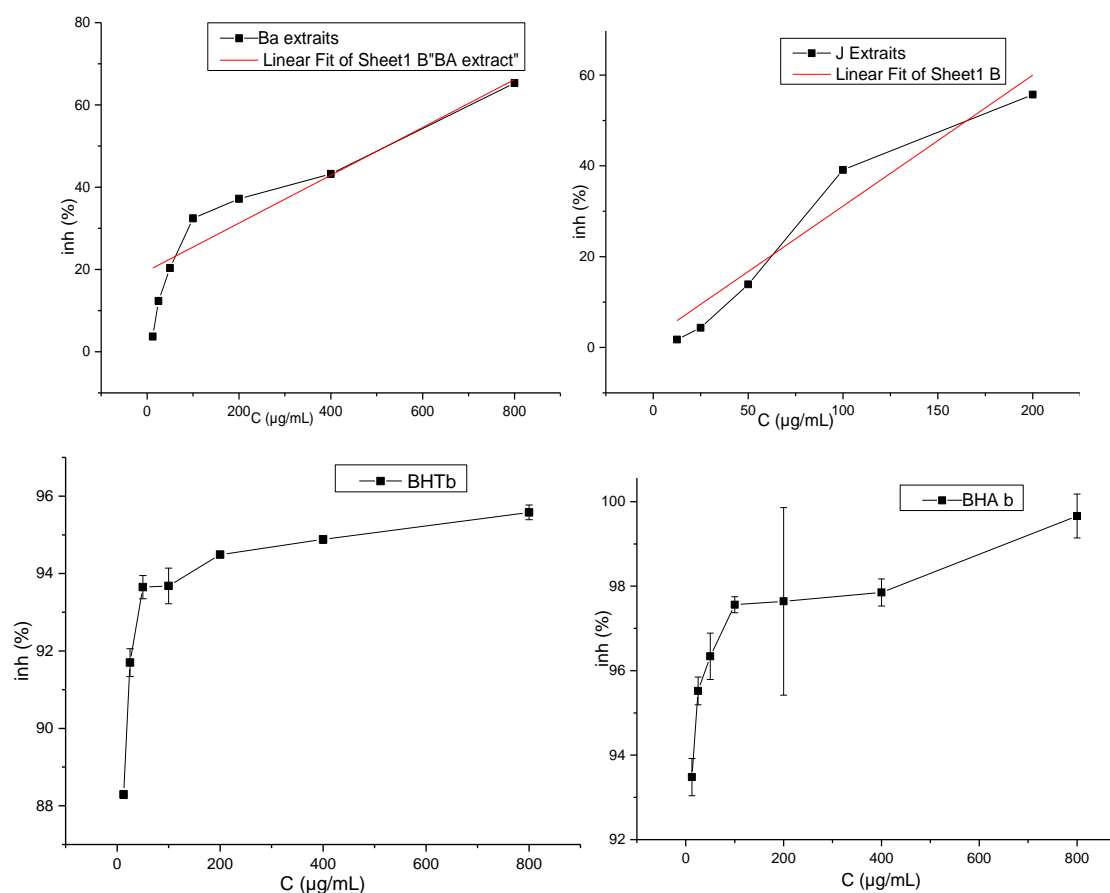
Cette activité consiste à mesurer la décoloration du β-carotène (orange) résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique, en comparaison avec les concentrations inhibitrices (IC<sub>50</sub>) de deux antioxydants standards (BHA et BHT). Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau III.17.

**Tableau III.17 :** % Inhibition du β-carotène / acide linoléique en fonction de la concentration des extraits

Extraits de plantes étudiées et standards de référence	Concentration (µg/mL) des extraits des plantes étudiées							IC <sub>50</sub> (µg/mL)
	12,5	25,0	50	100	200	400	800	
	% Inhibition du β-carotène/acide linoléique							
<i>T. polium</i> (J)	1,74±0,31	4,34±0,20	13,90±0,16	39,11±0,13	55,71±0,15	56,14±0,16	57,59±0,14	165,41±1,57
<i>M.chamomilla</i> (Ba)	3,69±0,23	12,36±0,26	20,34±0,23	32,43±0,14	37,18±0,18	43,22±0,08	65,32±0,09	522,14±0,36
BHT**	88,29±0,10	91,70±0,36	93,65±0,30	93,68±0,46	94,49±0,07	94,88±0,10	95,58±0,19	0,91±0,01
BHA**	93,48±0,44	95,52±0,33	96,34±0,55	97,56±0,19	97,64±2,22	97,85±0,32	99,66±0,52	1,05±0,03

\* Les valeurs de trois essais ont été exprimées en moyenne ± SD (n=3).

\*\* Standards de référence.



**Figure III.8 :** % Inhibition du  $\beta$ -carotène / acide linoléique en fonction de la concentration des extraits bruts des plantes étudiées et des standards de références.

Le test  $\beta$ -carotène / acide linoléique a été utilisé pour évaluer l'effet antioxydant des extraits méthanolique des plantes *Matricaria chamomilla* et *Teucrium polium* (Figure III.9). Les deux extraits ont montré une faible activité en comparaison avec les standards de référence, en l'occurrence, le BHT ( $IC_{50} = 0,91 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) et le BHA ( $IC_{50} = 1,05 \mu\text{g} / \text{mL}$ ). Par ailleurs, la valeur de  $IC_{50}$  de l'extrait *Teucrium polium* L. ( $IC_{50} = 165 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) est nettement inférieure (soit près de 3 fois moins élevée) à celle de l'extrait de *Matricaria chamomilla* L. ( $IC_{50} = 522 \mu\text{g} / \text{mL}$ ). En conséquence, comme l'activité anti-oxydante est inversement proportionnelle à la concentration d'inhibition, *Teucrium polium* L. possède une plus grande capacité anti-oxydante que *Matricaria chamomilla* L., (soit près de 3 fois plus élevée)

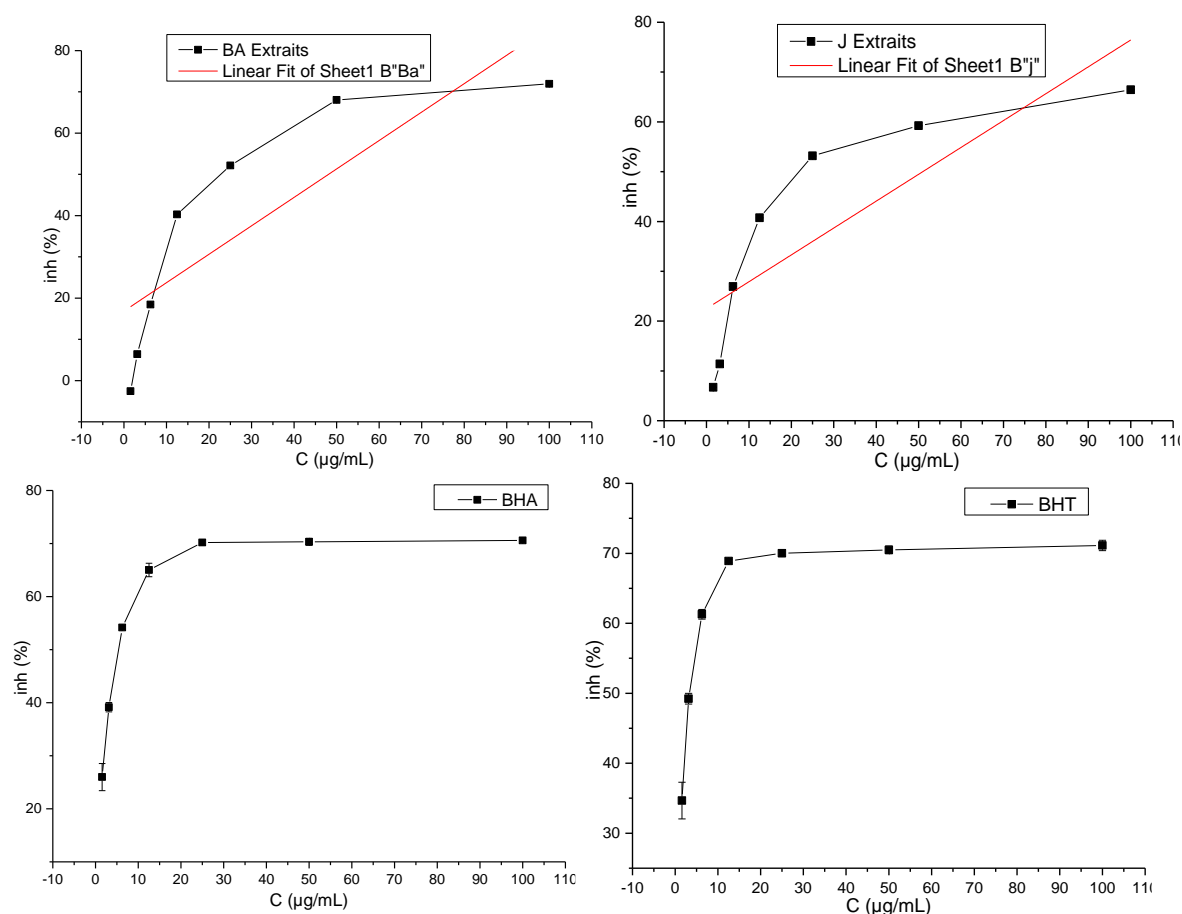
#### III.4.1.4. Activité du piégeage du radical Galvinoxyl (GOR)

Les tests de cette activité basée sur la mesure de la capacité d'un extrait à réduire le radical stable de galvinoxyl (GOR) ont été réalisés uniquement sur les extraits des plantes *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L. en présence des deux antioxydants standards BHA et BHT. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.18.

**Tableau III.18 :** Inhibition du radical Galvinoxyl (GOR) par les extraits bruts de *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L., et les antioxydants de référence (en fonction de la concentration).

Extraits de plantes étudiées et standards de référence	Concentration des extraits ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )							$\text{IC}_{50} \mu\text{g} / \text{mL}$
	1.5625	3.1250	6.2500	12.5000	25	50	100	
	% Inhibition de la $\beta$ -carotène/acide linoléique							
<i>T. polium</i> (J)	6,69 $\pm$ 0,02	11,41 $\pm$ 0,02	26,93 $\pm$ 0,02	40,74 $\pm$ 0,02	53,16 $\pm$ 0,02	59,23 $\pm$ 0,02	66,43 $\pm$ 0,02	21,82 $\pm$ 0,19
<i>M. chamomilla</i> (Ba)	2,57 $\pm$ 0,02	6,41 $\pm$ 0,02	18,44 $\pm$ 0,02	40,30 $\pm$ 0,02	52,16 $\pm$ 0,02	68,05 $\pm$ 0,02	71,93 $\pm$ 0,02	22,72 $\pm$ 0,08
BHT**	34,66 $\pm$ 2,62	49,23 $\pm$ 0,77	61,29 $\pm$ 0,69	68,89 $\pm$ 0,26	70,02 $\pm$ 0,50	70,49 $\pm$ 0,55	71,13 $\pm$ 0,74	3,324 $\pm$ 0,18
BHA**	25,99 $\pm$ 2,56	39,15 $\pm$ 0,88	54,16 $\pm$ 0,27	65,02 $\pm$ 1,26	70,19 $\pm$ 0,51	70,32 $\pm$ 0,65	70,60 $\pm$ 0,10	5,384 $\pm$ 0,06

Avec : \* Les valeurs de trois essais ont été exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3), et \*\* Standards de référence.



**Figure III.9 :** % Inhibition du radical Galvinoxyl (GOR) en fonction de la concentration des extraits bruts des plantes étudiées et des standards de références.

De cette étude, il en découle que les deux extraits des plantes, *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L., présentent une activité anti-oxydante similaire, puisque les valeurs de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) sont très proches et sont évaluées respectivement à 21,82 et 22,72  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Elles sont respectivement 7 fois et 5 fois moins efficaces que les composés de référence, BHT et BHA,

dont les valeurs de  $IC_{50}$  respectives sont de 3,320 à 5,384  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). Néanmoins, ces extraits des plantes étudiées sont dotés d'une bonne capacité anti-oxydante.

\*\* Conclusion : Les tests d'activité anti-oxydante ont montré que les extraits méthanoliques présentent une meilleure capacité à piéger les radicaux libres que les huiles essentielles. Cependant, à l'exception de l'extrait méthanolique de *T. polium* L. ( $IC_{50} = 8,68 \pm 0,33 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) dans le cas du radical libre DPPH, cette capacité reste inférieure à celle des standards de référence (BHT :  $IC_{50} = 2,99 \pm 0,41 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), BHA :  $IC_{50} = 15,21 \pm 0,41 \mu\text{g} / \text{ml}$  et Vit. E :  $IC_{50} = 15,81 \pm 0,54 \mu\text{g} / \text{ml}$ ).

### III.4.2. Pouvoir antimicrobien *in vitro*

Aujourd'hui, la plupart des consommateurs exigent des produits non-traités contenant peu de conservateurs synthétiques avec la qualité sanitaire. La bio-préservation des aliments fait appel à des « composés naturels » en opposition à l'utilisation de conservateurs « chimiques » classiquement utilisés en agro-alimentaire. C'est dans ce sens que nous avons tenté d'évaluer les pouvoir *in vitro* antibactérien et antifongique des huiles essentielles et des extraits méthanoliques obtenus à partir des plantes étudiées et qui ont fait l'objet de ce travail.

L'évaluation des activités antibactérienne et antifongique des HE et les extraits méthanoliques de *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L. a été réalisée par deux méthodes : diamètre de la zone d'inhibition (DZI) et les concentrations minimales inhibitrice (CMI) et ce, par dilution en milieu gélosé). Les souches microbiennes concernent principalement des denrées alimentaires ou des infections humaines.

#### III.4.2.1. Étude de la sensibilité des germes aux huiles essentielles, extraits méthanoliques et antibiotiques

Le screening antibactérien et antifongique des huiles essentielles et des extraits méthanoliques obtenus à partir des plantes de *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L. a été réalisé, *in vitro*, sur 4 souches bactériennes pathogènes à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) et sur une levure (*Candida albicans*). Les résultats de l'évaluation des tests antibactériens des extraits sont illustrés dans le tableau III.19. À noter que le diamètre du disque (6 mm) a été inclus dans le calcul du diamètre de la zone d'inhibition.

**Tableau III.19 :** Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits d'huiles essentielles et méthanoliques obtenus à partir des plantes (*Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L.), et des antibiotiques de référence

Microorganismes		Antibiotiques de référence	Diamètre des zones d'inhibition (DZI, mm)						
Bactéries et champignon testés	Souches de référence		Plantes						
			<i>T. polium</i> L.	<i>M. chamomilla</i> L.	<i>M. pulegium</i> L.				
			Méthodes d'extraction-plante						
		J-HD	J	Ba-HD	Ba	MP-HD	MP-SD	MP	
Bactérie à Gram <sup>+</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Fosfomycine	11,66± 1,32	20±1,5	24,66± 1,32	22±0	37,33± 1,15	24,33± 0,58	14,33± 0,29
		44±0,5							
		Carbenicilline							
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Erythromycine	16,66± 1,32	14,33± 0,66	21,5± 0,5	12±0,5	25,5± 1,32	26,33± 1,53	15,66± 0,58
		32,5±0,3							
		Cephalexine							
Bactérie à Gram <sup>-</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Fosfomycine	9±0	14±1	12±0,5	12,75± 0,75	16,67± 0,58	13,67± 0,57	0,17±0, 29
		31±0,21							
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Fosfomycine	9±0	14±1	23,5± 0,5	11,66± 0,33	31,67± 1,53	25,67± 0,58	14,67± 0,58
		33,2±0,31							
Levure	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	9±0	20,66± 0,33	12,5± 0,5	17,5±0,5	11±0,87	9±0	16 ±0,87

Avec :

J-HD : Huile essentielle extraite de *T. polium* L., par hydro-distillation.

J : Extrait méthanolique obtenu par macération à froid de la plante *T. polium* L.

Ba-HD : Huile essentielle extraite de *M. chamomilla* L., par hydro-distillation.

Ba : Extrait méthanolique obtenu par macération à froid de la plante *M. chamomilla* L.

MP-HD : Huile essentielle extraite de *M. pulegium* L., par hydro-distillation.

MP-SD: Huile essentielle extraite de *M. pulegium* L., par entraînement à la vapeur.

MP : Extrait méthanolique obtenu par macération à froid de la plante *M. pulegium* L.

L'activité antibactérienne des HE et des extraits méthanoliques a été évaluée par la méthode de diffusion sur des milieux de culture solides en gélose nutritive de Mueller-Hinton, et en gélose Sabouraud respectivement pour les bactéries et la levure testée.

Le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles et des extraits méthanoliques est évalué par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (en mm) formée autour de chaque disque après une nuit d'incubation dans des conditions adéquates pour le développement du micro-organisme testé.

Chaque test est réalisé trois fois et ce, pour chacun des extraits et antibiotiques. La validité des résultats est fondée sur la moyenne des valeurs obtenues.

L'interprétation des résultats a été faite selon l'échelle de performance proposée par Ponce et al., 2003 [146]. La sensibilité de chaque souche aux différents extraits (HE et extraits méthanoliques des plantes étudiées) et antibiotiques a été faite par diamètre des zones d'inhibition comme suit :

- Diamètre de la zone d'inhibition < 10 mm : souche résistante.
- $10\text{mm} \leq$  diamètre de la zone d'inhibition  $\leq 15$  mm : souche peu sensible.
- $16\text{mm} \leq$  diamètre de la zone d'inhibition  $\leq 22$  mm : souche sensible.
- Diamètre de la zone d'inhibition  $\geq 22$  mm : souche très sensible.

D'une manière générale, les résultats du tableau III.20 montrent une assez grande sensibilité des quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*), ainsi que de la souche fongique (*Candida albicans*) vis-à-vis des différents extraits à l'exception de celui de l'HE de *T. polium* L. extraite par hydro-distillation pour laquelle *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* se sont avérées résistantes, ainsi que de celui de l'HE de *M. pulegium* L. extraite par entraînement à la vapeur vis-à-vis de *Candida albicans*.

En effet, d'après les valeurs obtenues à partir des mesures des diamètres de la zone d'inhibition (DZI), on remarque que l'huile essentielle extraite par hydro-distillation de la plante *M. pulegium* L. (MP-HD) est très active sur le germe *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, avec une valeur moyenne de DZI de 37,33 mm. Pour les antibiotiques de référence, à savoir Fosfomycin et Carbenicillin, cette activité s'est manifestée respectivement par des DZI de 44 et 37,5 mm. Toujours pour cette même souche bactérienne, l'activité inhibitrice de l'HE de *Matricaria chamomilla* L. extraite par hydro-distillation, s'est avérée également efficace puisque la valeur moyenne de DZI est de 25,66 mm.

Les résultats répertoriés dans le tableau III.20 indiquent que la souche *Bacillus subtilis* ATCC 6633, s'est montrée la plus sensible vis-à-vis des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. obtenues par hydro-distillation (HD) et entraînement à la vapeur (SD), et dont les DZI sont respectivement de 25,5 et 26,33 mm. Quant aux antibiotiques Erythromycin et Cephalexin pris comme référence, les valeurs moyennes du DZI sont de 32,5 et 31 mm respectivement. En ce qui concerne *Escherichia coli*, l'huile essentielle extraite par hydro-distillation à partir de la plante *M. pulegium* L. (MP-HD) a révélé une grande efficacité vis-à-vis de cette bactérie qui

s'est manifestée par un DZI moyen de 31,66 mm. Cette valeur reste très proche de celle obtenue avec l'antibiotique de référence Fosfomycin dont le DZI moyen est de 33,00 mm.

Pour *Pseudomonas aeruginosa*, on constate que tous les extraits ont manifesté une activité moyennement efficace évaluée avec des DZI qui s'échelonnent entre 9 et 16,67 mm. Ces valeurs restent en-dessous de celle obtenue avec l'antibiotique de référence Fosfomycin dont la valeur moyenne du DZI est de 31 mm.

Toutefois, les HE extraites à partir de *M. chamomilla* L. et *M. pulegium* L. ont manifesté une meilleure activité en comparaison avec celle obtenue avec l'huile de *T. polium* L.

Enfin, pour la levure *Candida albicans*, les extraits méthanoliques ont révélé une assez grande activité antifongique évaluée avec des DZI qui varient entre 16 mm à 20,33 mm, contrairement aux HE dont les valeurs de DZI restent en-dessous puisqu'elles varient entre 9 mm à 13 mm. En conséquence, dans le cas de ce champignon pathogène, elles sont moins efficaces que les extraits méthanoliques.

#### **III.4.2.2. Evaluation des concentrations minimales inhibitrice (CMI) et CMB des extraits**

La détermination des CMI et CMB a été réalisée avec les HE obtenues à partir des plantes *M. pulegium* L., *M. chamomilla* L., *T. polium* L., ainsi que les extraits méthanoliques de ces deux dernières plantes. Les tests ont été réalisés avec divers micro-organismes, principalement les bactéries (à gram+ et gram-) qui sont au nombre de sept (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et enfin *Pseudomonas aeruginosa*), et quatre champignons (*Mucor ramanianus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* et *Fusarium culmorum*). Les résultats obtenus pour les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Bactéricides (CMB) des huiles essentielles (*Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L.) ainsi que des extraits méthanoliques (*Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L.) sont rapportés dans le tableau III.20. Il en est de même pour les micro-organismes pris comme référence, à savoir, l'antibiotique *Levofloxacin* et l'antifongique *nystatine* avec lesquels la comparaison a été effectuée.

**Tableau III.20** : Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Bactéricides (CMB) des huiles essentielles (*Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L.) et des extraits méthanoliques (de *Teucrium polium* L., et *Matricaria chamomilla* L.)

Spécification			Valeurs des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI en µl / ml) et Bactéricides (CMB en µl / ml)								
			Antibiotique/ antifongique de référence	<i>T. polium</i> L.		<i>M. chamomilla</i> L.		<i>M. pulegium</i> L.			
	Micro-organismes testés	MIC/MBC (µl/ml)		J-HD	J-EX	Ba-HD	Ba-EX	MP-HD	MP-SD	MP-EX	
<b>Antibiotique de référence : Levofloxacin</b>											
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	MIC	0.062	2,5	3.06	1	0.5	1	2,5	-	
		MBC	-	5	-	2	-	2	5	-	
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	MIC	0,125	20	12.25	-	6.125	2	2	-	
		MBC	-	20	-	-	-	2	2	-	
	<i>Listeria monocytogenes</i> CIP82110	MIC	0.125	-	6.125	-	6.125	-	-	-	
		MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	
		MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	MIC	0.062	20	< 0.76	-	1.53	5	2	-	
		MBC	0.062	20	< 0.76	-	2	5	2	-	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP 8291	MIC	1	-	6.125	-	< 0.76	-	-	-	
		MBC	1	-	6.125	-	< 0.76	-	-	-	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	MIC	1	-	< 0.76	-	< 0.76	-	-	-	
		MBC	1	-	< 0.76	-	< 0.76	-	-	-	
	<b>Antifongique de référence : Nystatine</b>										
	Champignons	<i>Mucor ramanianus</i>	MIC	0.94	-	3.06	-	6.125	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>		MIC	0.94	-	1.53	-	6.125	-	-	-	
<i>Penicillium expansum</i>		MIC	0.23	-	< 0.76	-	1.53	-	-	-	
<i>Fusarium culmorum</i>		MIC	0.007	-	< 0.76	-	< 0.76	-	-	-	

Avec : - : non déterminé

Les résultats obtenus sont pertinents et laissent entrevoir de grandes possibilités et perspectives pour une éventuelle utilisation de l'HE de *M. pulegium* comme alternative aux antimicrobiens de synthèse entraînant de nombreux effets indésirables.

### III.4.3. Activité enzymatique *in vitro*

L'activité enzymatique a été effectuée sur les deux extraits méthanoliques des plantes *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L. Cette activité a été menée *in vitro* en inhibant trois enzymes, dont deux sont anti-Alzheimer et une anti-diabétique.

#### III.4.3.1. Evaluation de l'activité anti-Alzheimer (anti-cholinestérase) *in vitro*

Les deux extraits méthanoliques ont été testés *in vitro* pour leurs activités anti-Alzheimer. Les essais ont été menés suivant la méthode d'inhibition de la butyrylcholinestérase (BChE) et l'acétylcholinestérase (AChE) et ce, selon la méthode d'Ellman *et al.*, [92]. Cette inhibition est déterminée par spectrophotométrie.

Les résultats obtenus pour l'activité-inhibitrice (IC<sub>50</sub>) des extraits, en comparaison avec le standard galantamine, sont présentés dans les tableaux III.21 et III.22.

**Tableau III.21 :** Inhibition de la butyrylcholinestérase par les extraits de *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L.

Extraits et standard	Concentrations en µg / ml des extraits méthanoliques et de la galantamine pour l'inhibition de la butyrylcholinestérase							
	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	IC <sub>50</sub>
<i>T. polium</i>	13,54±1,9	29,14±4,42	43,83±0,07	45,85±3,23	73,93±3,91	80,91±0,84	82,93±1,65	<b>28,69±2,29</b>
<i>M. chamomilla</i>	45,1±1,39	29,69±2,60	45,11±2,23	46,58±1,46	70,81±2,20	84,21±1,77	78,89±3,58	<b>28,94±2,50</b>
Galantamine	3,26± 0,6	6,93± 0,62	24,03± 2,94	45,13± 2,60	63,87± 2,85	73,57± 0,77	78,95± 0,58	34,75±1,99

Le tableau III.21-indique que les deux extraits méthanoliques obtenus à partir des plantes, *T. polium* L. et *M. chamomilla* L., ont des activités d'inhibition de la butyrylcholinestérase d'une part, similaires et qui sont respectivement de 28,69 et 28,94 µg / ml et d'autre part, plus efficaces que celle de la galantamine prise comme référence et dont la valeur est de 34,75 µg / ml).

**Tableau III.22 :** Inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L.

Extraits et standard de référence	Concentrations en µg / ml des extraits méthanoliques et de la galantamine pour l'inhibition de l'acétylcholinestérase							
	3,125	6,25 0	12,5	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC50 µg / mL
<i>T. polium</i> L.	16,21 ± 2,17	74,65 ± 0,60	85,84 ± 1,82	85,08 ± 2,07	90,91 ± 1,19	92,73 ± 2,08	94,84 ± 1,03	<b>4,93 ± 0,1</b>
<i>M. chamomilla</i> L.	74,46 ± 0,57	78,86 ± 0,44	94,07 ± 1,19	100,7 ± 0,60	109,6 ± 6,55	122,8 ± 1,19	133,8 ± 2,55	<b>3,11 ± 1,22</b>
Galantamine	35,9 ± 2,3	43,77 ± 0,01	68,5 ± 0,31	80,7 ± 0,41	85,8 ± 1,63	91,80 ± 0,2	94,77 ± 0,34	6,27 ± 1,15

La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative la plus répandue au 21<sup>ème</sup> siècle [147] ; c'est le type de démence le plus courant chez les personnes âgées et pour les un fardeau important aux patients, les soignants et le système de santé [148,149]. La maladie d'Alzheimer n'est pas une maladie psychiatrique ou mentale, mais elle provoque des changements dans les sens cognitifs, les comportements et les effets de la personne atteinte [150].

Selon les Spécialistes en Neurologie [151], c'est le résultat de modifications structurelles du cerveau qui sont observées lors de l'examen post-mortem par microscope. Malheureusement, Il n'y a pas de traitement direct de la maladie d'Alzheimer, et les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ont un effet très limité. Aussi, l'efficacité des médicaments physiopathologiques n'a pas été démontrée, du moins selon les normes cliniques. Parfois, les agents psychotropes comme les thymo-régulateurs, les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, ...etc.) peuvent être utilisés, mais avec parcimonie en cas de troubles comportementaux.

Pour tout cela, les chercheurs actuels se concentrent visant à aboutir à un traitement de la maladie d'Alzheimer. D'après la littératures, il existe des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer qui ont été développés dans le but de la recherche thérapeutique d'un remède [151].

Selon Povova et al., [152], il existe plusieurs facteurs étiologiques qui jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer tels que le peptide amyloïde-b (Ab) et/ou agrégation des protéines Tau, excès d'ions métalliques ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ), stress oxydatif et réduction de l'acétylcholine (ACh).

L'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), l'enzyme principale dans la dégradation de l'acétylcholine (ACh), où (ACh) est considérée comme l'une des approches pour le traitement de la maladie d'Alzheimer légère à modérée [153]. Selon Loizzo et al. [154], aujourd'hui, les inhibiteurs de l'AChE (AChEI) se sont révélés être la cible thérapeutique la plus viable pour l'amélioration symptomatique de la MA, car les AChEI améliorent la transmission neuronale. En outre, la thérapie anti-oxydante s'est également avérée efficace pour améliorer la fonction cognitive et les déficits comportementaux dans les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer [155,156] .

Plusieurs revues éditées [153–156] indiquent, qu'après avoir isolé des composés chimiques à partir de produits naturels et de plantes médicinales traditionnelles chinoises, ces dernières peuvent agir comme un agent anti-neurodégénératif prometteur en inhibant l'activité des

enzymes pathogènes les plus importantes, et en améliorant le stress oxydatif intracellulaire, en atténuant la neuro-inflammation et en protégeant les neurones contre la mort cellulaire apoptotique.

Sur la base de ces observations mentionnées ci-dessus, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux médicaments demeure nécessaire, et dans le présent travail, nous avons étudié les activités inhibitrices anticholinestérase de deux extraits de plants *Teucrium polium* et *Matricaria chamomilla*.

Les résultats contenus dans le tableau III.22 montrent que les extraits des deux plantes révèlent une activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) approximativement dans le même ordre de grandeur puisqu'elles sont assez proches. Cependant, contrairement au cas de l'inhibition de la butyrylcholinestérase, c'est la plante *M. chamomilla* L. dont la valeur de IC<sub>50</sub> est égale à  $3,11 \pm 1,22 \mu\text{g} / \text{ml}$  qui est plus efficace que la plante *T. polium* L. Celle-ci présente une valeur de IC<sub>50</sub> égale à  $4,93 \pm 0,1 \mu\text{g} / \text{ml}$ . Comme dans le cas de l'inhibition de la butyrylcholinestérase, les deux plantes ont une meilleure activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase que la galantamine dont la performance (de l'inhibition) représentée par IC<sub>50</sub> est égale à  $6,27 \pm 1,15 \mu\text{g} / \text{ml}$ . Les efficacités respectives de *M. chamomilla* L. et *T. polium* L. sont approximativement 2 fois et 1,3 fois supérieures à celle de la galantamine.

En conclusion, on peut dire que d'une part l'activité inhibitrice des extraits de plantes de *M. chamomilla* L. et *T. polium* L., vis-à-vis de la butyrylcholinestérase est vraisemblablement due à la présence de polyphénols qui possèdent des propriétés anticholinestérasiques [157], que d'autre part, et dans les deux cas d'inhibition, que ce soit aussi bien avec la butyrylcholinestérase (BChE) qu'avec l'acétylcholinestérase (AChE), les deux extraits méthanoliques des plantes, *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L., sont doués d'une plus grande efficacité que le standard pris comme référence, à savoir, la galantamine.

Par la comparaison de notre résultat avec la littérature, les auteurs Zlatić et Stanković [158] ont mentionné que les espèces de plante *Teucrium* ont montré une forte activité inhibitrice contre l'acétylcholinestérase. Une étude, faite par Orhan and Aslan de la Turquie [159] sur l'extrait de l'éthanol de *Teucrium polium*, a donné une activité inhibitrice d'AChE de IC<sub>50</sub> =  $550 \mu\text{g} / \text{ml}$ , ce qui est une activité faible par rapport à nos résultats de IC<sub>50</sub> =  $4,93 \mu\text{g} / \text{ml}$ .

Ionita et al. [160] sont des chercheurs de l'Université de Roumanie qui ont mené une étude sur des souris avec de l'extrait de *Matricaria chamomilla* ; ils ont été démontré que l'extrait de

*Matricaria chamomilla* améliore la mémoire, et ils en ont conclu que l'extrait de *Matricaria chamomilla* pourrait être un médicament thérapeutique naturel prometteur pour prévenir la perte de mémoire et les troubles cognitifs associés aux vieillissements et maladies neurodégénératives.

### III.4.3.2. Evaluation de l'activité antidiabétique *in vitro*

L'activité antidiabétique *in vitro* réalisée pour les deux extraits méthanoliques des plantes, *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L., a été évaluée par les concentrations inhibitrices de 50 % (IC<sub>50</sub>) de l'activité de l'enzyme  $\alpha$ -amylase. Dans cette étude, le standard acarbose, inhibiteur de celle-ci (l' $\alpha$ -amylase), est pris comme référence ou contrôle positif. Les résultats de l'évaluation de l'activité inhibitrice des extraits de plantes étudiées sur l' $\alpha$ -amylase sont présentés dans le tableau III.23.

**Tableau III.23** : Concentrations de 50 % d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par les extraits de *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L. et l'acarbose.

Extraits et standard de référence	Concentrations inhibitrices ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) de 50 % de l'activité d' $\alpha$ -amylase par les extraits de <i>Teucrium polium</i> L. et <i>Matricaria chamomilla</i> L. et l'acarbose.							
	62,5	125	250	500	1000	2000	4000	IC <sub>50</sub>
<i>T. polium</i> L.	46,41 $\pm$ 0,11	50,97 $\pm$ 0,11	53,12 $\pm$ 0,11	55,22 $\pm$ 0,11	56,88 $\pm$ 0,11	57,68 $\pm$ 0,11	67,47 $\pm$ 0,11	111,68 $\pm$ 0,01
<i>M. chamomilla</i> L.	44,75 $\pm$ 0,11	46,11 $\pm$ 0,11	47,71 $\pm$ 0,11	53,25 $\pm$ 0,11	55,46 $\pm$ 0,11	64,70 $\pm$ 0,11	77,32 $\pm$ 0,11	440,58 $\pm$ 0,06
Standard acarbose	7,76 $\pm$ 0,17	8,08 $\pm$ 0,30	9,46 $\pm$ 0,11	10,70 $\pm$ 0,96	31,81 $\pm$ 2,89	37,21 $\pm$ 3,54	53,05 $\pm$ 1,59	3650,93 $\pm$ 10,70

Les valeurs sont exprimées en moyenne à partir de 3 essais (n = 3)  $\pm$  SD

Le diabète est connu pour être une hyperglycémie chronique, généralement résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de l'insuline, ou de ces deux anomalies associées [161].

Selon le comité international de *American Diabetes Association* (ADA), il en existe deux types ; le diabète du type 1 « insulino-dépendant » qui est une pathologie causée par la destruction sélective des cellules  $\beta$  pancréatiques par le système immunitaire, et dont les patients doivent recevoir des injections quotidiennes d'insuline pendant toute leur vie [162], et le diabète du type 2 « non-insulino-dépendant » qui est la forme la plus fréquente du diabète. Les maladies de ce type se manifestent lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline, ou que l'organisme n'utilise pas efficacement l'insuline qui est produite. Le diabète du type 2 peut se manifester chez les enfants et les adolescents, mais il apparaît habituellement après l'âge de 30 ans et devient plus fréquent aux âges plus avancés [163].

Pour le traitement du diabète, qu'il soit du type 1 ou du type 2, cela dépend généralement des médicaments par voie orale, injectable (insuline) ou des exercices physiques (sport), ces afin de stimuler la sécrétion d'insuline, de ralentir la digestion des sucres "glucides" ou d'inhiber l'absorption intestinale du glucose alimentaire.

Comme il est connu et également prouvé par de nombreux chercheurs, les plantes médicinales qui sont des sources de métabolites secondaires tels que les polyphénols et les flavonoïdes, jouissent d'intéressantes et diverses propriétés biologiques, et d'une capacité à s'appliquer dans divers domaines, notamment dans le domaine de la médecine traditionnelle [164,165]. Par ailleurs, plusieurs études sur les systèmes cellulaires suggèrent que les métabolites secondaires (polyphénols) peuvent exercer un grand nombre d'activités biologiques, notamment anti-oxydante, anti-diabétique ...etc [166].

Afin de déterminer si les plantes sélectionnées dans cette étude ont un potentiel antidiabétique, l'enzyme amylase a été utilisée *in vitro*, ce que beaucoup suggèrent comme traitement potentiel de cette maladie.

Les résultats du tableau III.23 montrent d'une part, que les extraits des deux plantes inhibent fortement l'activité de l' $\alpha$ -amylase, en particulier celui de *T. polium* L. dont la concentration minimale qui inhibe 50 % l' $\alpha$ -amylase ( $IC_{50}$ ) est de  $111,68 \pm 0,01 \mu\text{g} / \text{ml}$ , contre  $IC_{50} = 440,58 \pm 0,06 \mu\text{g} / \text{ml}$  pour l'extrait de *M. chamomilla* L. Par ailleurs, la comparaison des activités inhibitrices de ces deux plantes indiquent qu'elles sont respectivement trente-trois et huit fois supérieures à celle du standard pris comme référence, à savoir, l'acarabose dont l' $IC_{50}$  est de  $3650,93 \pm 10,70 \mu\text{g} / \text{ml}$ .

Au terme de cette étude, on peut conclure que d'une part, les plantes, *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L., présentent des activités inhibitrices de l' $\alpha$ -amylase conséquentes qui peuvent être mises à profit pour en tirer le meilleur de ces plantes et soulager les personnes diabétiques. Et d'autre part, les résultats obtenus contribuent à justifier le recours aux plantes médicinales pour la recherche de nouvelles molécules douées d'activités anti- diabétiques. Par ailleurs, l'importance de ces activités en comparaison avec l'acarabose est certainement corrélée à la richesse, la teneur et la variabilité des composés polyphénoliques, entre autres, les phénols et les flavonoïdes totaux, et à leurs synergies mutuelles dans chacune de ces deux plantes.

De nombreux types de plantes médicinales ont été examinés afin de trouver des substances efficaces (actives) pour le traitement du diabète [167] ; parmi ces plantes se trouvent *Teucrium polium* et *Matricaria chamomilla*.

Une étude faite par Vahidi et al. [168], de l'Université d'Iran, sur l'extrait de *Teucrium polium* montre que l'extrait de cette espèce de plante a donné une bonne efficacité inhibitrice de l'effet antidiabétique, ce qui affecte vraiment l'augmentation des niveaux d'insuline, car l'étude a prouvé que l'extrait réduit les niveaux de glucose dans le sang et les niveaux de triglycérides à une dose de 4 %.

Mogimi et al. [169], ont mentionné dans leur article (*article a review*) que l'activité antidiabétique de l'extrait de *Teucrium polium* était indiquée en raison de la présence des flavonoïdes, des stérols et des huiles essentielles qui ont des effets sur les hypoglycémiant, en stimulant éventuellement l'utilisation du glucose dans les tissus hépatiques, et en stimulant également la sécrétion de l'insuline par le pancréas. Aussi, ont-ils suggéré que des études toxicologiques et des essais cliniques soient réalisées pour déterminer si la plante *Teucrium polium* a (ou pas) le potentiel d'être un hypoglycémiant efficace et sûr pour les patients diabétiques.

*Matricaria chamomilla* est utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle, et de nombreuses revues indiquent que la plante *M. chamomilla* a été utilisée sous forme d'infusion contre divers maux tels que les douleurs abdominales et le traitement symptomatique des troubles digestifs [47,170]. En plus, la plante de *M. chamomilla* a également été utilisée en thérapie antidiabétique.

Cemek et al. [171], on fait une étude sur les activités anti-hyperglycémiques de la partie aérienne de l'extrait éthanolique de *Matricaria chamomilla* L. et ce sur, des souris diabétiques induits par la streptozotocine. Après 14 jours, leurs expériences ont montré que l'extrait éthanolique de *M. chamomilla* présentait un effet anti-hyperglycémique significatif, qu'il protégeait les cellules  $\beta$  chez les souris diabétiques, et qu'il réduisait également le stress oxydatif associé à l'hyperglycémie.

Une autre étude de Kato et al. [172] a été réalisée sur l'effet de l'extrait de camomille sur l'hyperglycémie, où un traitement avec l'extrait pendant 21 jours a montré une réduction significative de la glycémie dans le sang. Il a également été noté dans leur étude que la consommation quotidienne du thé à la camomille avec les repas peut aider à prévenir la progression de l'hyperglycémie et des complications du diabète.

#### **III.4.4. Activité anti-inflammatoire *in vitro***

L'étude *in vitro* des propriétés anti-inflammatoires des extraits méthanoliques des deux plantes, *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L., a été menée selon la méthode décrite qui elle

a été réalisée par colorimétrie portant sur la dénaturation de la BSA (Bovine sérum albumine). L'inhibition de cette dénaturation est déterminée avec des concentrations allant de 250 à 2000  $\mu\text{g} / \text{ml}$  et ce, pour les extraits des plantes étudiées et du médicament Voltarène (LP à 75 mg) qui représente le standard de contrôle. Les résultats de cette étude sont illustrés dans le tableau III.24.

**Tableau III.24.** Inhibition en % de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par différentes concentrations de l'extrait méthanolique par la méthode de dénaturation de la BSA

Extraits de plantes et standard de référence	Concentrations en $\mu\text{g} / \text{ml}$			
	250	500	1000	2000
	% d'inhibition de la dénaturation			
<i>Teucrium polium L.</i>	80,35 $\pm$ 3,18	91,03 $\pm$ 0,28	95,76 $\pm$ 0,18	97,53 $\pm$ 0,47
<i>M. chamomilla L.</i>	82,03 $\pm$ 1,87	92,01 $\pm$ 0,29	96,48 $\pm$ 0,22	98,38 $\pm$ 0,08
Voltarène (LP à 75 mg)	37 $\pm$ 0,18	61 $\pm$ 0,15	92 $\pm$ 0,15	100 $\pm$ 0,18

Les valeurs sont exprimées en moyenne à partir de 3 essais ( $n = 3$ )  $\pm$  SD.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire, évaluée *in vitro*, ont montré que les extraits méthanoliques de *Teucrium polium L.* et *Matricaria chamomilla L.* possèdent un fort potentiel anti-inflammatoire. Cet effet d'inhibition maximale se traduit respectivement par 97,53 et 98,38 % pour ces deux extraits, alors qu'il est de 100 % pour le standard de référence (Voltarène) et ce, pour une même concentration de 2000  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (Tableau III.24). Notons que toutes ces valeurs restent globalement similaires. Toutefois, et à l'exception de cette concentration (2000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), les deux extraits (pour les autres concentrations) ont montré une meilleure capacité d'inhibition de la dénaturation de la BSA en comparaison avec Voltarène. En effet, le pourcentage d'inhibition des deux extraits confondus varie approximativement de 80 à 96 %, alors que celui du standard de référence évolue de 37 à 92 %. Il semble que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait ait pu être dû à la présence de flavonoïdes et de composés phénoliques dans la plante [173,174]. Sur la base des résultats obtenus, on peut conclure que les deux extraits des plantes, *Teucrium polium L.* et *Matricaria chamomilla L.*, possèdent d'une part, un fort potentiel anti-inflammatoire et d'autre part, (pour une même concentration de 2000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), ce potentiel est similaire à celui obtenu avec Voltarène. Ces résultats semblent attribuer l'effet anti-inflammatoire à la présence de constituants polyphénoliques (composés phénoliques et flavonoïdes contenus dans les plantes) dans les extraits méthanoliques qui en sont riches,[173,174]. En conséquence, l'utilisation de ces plantes comme remède anti-

inflammatoire en milieu naturel est donc justifiée, d'autant plus que la prise de médicaments anti-inflammatoires présente souvent des risques gastriques.

Ces résultats suggèrent par ailleurs que l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Teucrium polium* L. et *Matricaria chamomilla* L. est en corrélation en grande partie avec leurs effets sur l'infiltration des cellules inflammatoires, ainsi qu'avec leurs médiateurs libérés dans le site inflammatoire.

#### III.4.5. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits aqueux de *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L. a été réalisée suivant la méthode d'induction de l'œdème plantaire par injection de la carraghénine dans la patte postérieure gauche des souris. Les résultats de cette activité sont illustrés dans le tableau III.25. Celui-ci représente les variations du pourcentage de réduction de l'œdème (patte postérieure gauche des souris) des différents essais (contrôle positif et des extraits méthanoliques des plantes étudiées) par rapport au contrôle négatif (eau physiologique).

**Tableau III.25 :** Pouvoir anti-inflammatoire aigüe *in vivo* des extraits aqueux de *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L. et *Mentha pulegium* L. obtenus par des tests d'induction de l'inflammation dans les pattes de souris.

**Tableau III.25 :** Effet de l'inhibition de l'œdème par les extraits aqueux de *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., *Mentha pulegium* L. et Diclofénac de sodium (anti-inflammatoire non-stéroïdien)

Extraits aqueux, eau physiologique et Diclofénac	Poids des pattes postérieures (g)		% de l'œdème	% Inhibition de l'œdème
	Patte gauche	Patte droite		
Contrôle négatif (eau physiologique, 0,9 % NaCl)	0,109 ± 0,006	0,076 ± 0,004	43,42 %	0 %
<i>T. polium</i> L.	0,178 ± 0,009	0,140 ± 0,001	27,14 %	37,49 %
<i>M. chamomilla</i> L.	0,181 ± 0,003	0,143 ± 0,001	26,57 %	38,81 %
<i>M. pulegium</i> L.	0,190 ± 0,001	0,142 ± 0,001	33,80 %	22,16 %
Contrôle positif (Diclofénac de sodium, 50 mg / kg)	0,171 ± 0,009	0,142 ± 0,001	20,42 %	52,97 %

L'inflammation est un mécanisme de défense de l'organisme contre les agressions d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse, indispensable à son intégrité [175]. Cette réponse immunitaire protectrice peut être parfois néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, et des anomalies de régulation et de production des cellules intervenant dans l'inflammation [176]. Ces processus inflammatoires sont impliqués dans l'apparition d'un grand nombre de pathologies humaines telles que l'arthrite, le diabète, l'asthme, les allergies et le cancer [177].

Selon De Cássia da Silveira et al.(2013) [178], la plupart des substances extraites de plantes médicinales, en particulier celles qui possèdent des propriétés aromatiques telles que la menthe, se sont avérées efficaces pour contrôler les médiateurs chimiques de l'inflammation. Il n'est donc pas étonnant que de nombreuses études leur soient consacrées.

L'administration orale de l'extrait aqueux des plantes étudiées à des souris présentant un œdème de la patte arrière induit par la carraghénine a produit une activité anti-inflammatoire significative ( $p < 0,01$ ) aux doses testées.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des plantes a été réalisée en suivant l'évolution des œdèmes. Lors de cette étude, nous avons vérifié la validité de la méthode d'induction en testant le Diclofénac, un anti-inflammatoire non-stéroïdien, efficace contre l'œdème induit par l'ingestion de la carraghénine (Singh et al., 2011) [179].

L'augmentation des diamètres des pattes lésées jusqu'à la 4ème heure chez les témoins œdémateux indique que toute réduction d'œdème durant les quatre heures serait due aux effets des produits administrés.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les extraits aqueux de *Matricaria chamomilla* L. et *Teucrium polium* L. de la patte induite par la carraghénine, par rapport au Diclofénac sodique (10 mg / kg) pris comme référence. On remarque également une diminution progressive de l'œdème de la patte avec des taux d'inhibition respectifs quasi- similaires de 38,81 % et 37,43 % pour les deux extraits. Quant au Diclofénac sodique, son pourcentage d'inhibition est de 52,97 %. En conséquence, les résultats obtenus laissent entrevoir que les extraits aqueux de *Matricaria chamomilla* L. et *Teucrium polium* L. possèdent un effet anti-inflammatoire très significatif en comparaison avec Diclofénac dont l'action reste tout de même plus importante. Notons également que l'extrait aqueux de *Mentha pulegium* a manifesté une activité anti-inflammatoire non négligeable par rapport aux deux autres extraits aqueux avec un taux d'inhibition de l'œdème de 22,16 %. Cette propriété pharmacologique importante des plantes étudiées peut être due à la présence de composés polyphénoliques biologiquement actifs.

Les résultats obtenus dans cette étude, confèrent aux plantes étudiées un mécanisme d'action anti-inflammatoire semblable à celui des anti-inflammatoires non stéroïdiens qui pourrait éventuellement s'expliquer par la présence de composés bioactifs tels que les composés phénoliques et les saponines [180].

De nombreuses revues scientifiques ont rapporté que les propriétés anti-inflammatoires d'extraits de plantes sont généralement attribuées à la présence de composés phénoliques dans ces extraits, et que leurs métabolites inhiberaient les activités enzymatiques, et réduiraient la production des médiateurs de l'inflammation. Plusieurs études ont également rapporté que les

polyphénols sont de puissants antioxydants qui éliminent directement les espèces réactives de l'oxygène et des radicaux libres tels que l'oxyde nitrique (présent dans la circulation sanguine), impliqués dans l'inflammation [181–183]. Par voie de conséquence, les polyphénols peuvent éventuellement être responsables des activités anti-inflammatoires, d'où leur utilisation comme des agents chimio-préventifs potentiels.

---

*Conclusion générale  
et perspectives*

---

## Conclusion générale

Grâce aux données obtenues par les travaux expérimentaux à partir des plantes médicinales algériennes, que ce soit sur les minéraux, composés organiques et / ou les activités biologiques, il est devenu possible de déterminer la consommation et l'utilisation quotidienne de ces plantes par les groupes sociaux et professionnels au niveau national, soit en cuisine, en médecine traditionnelle, ou dans les préparations pharmaceutiques.

Le contexte de ces travaux rapporte l'analyse phytochimique, la détermination de la concentration des éléments minéraux, les applications biologiques et enfin l'effet des méthodes d'extraction sur les huiles essentielles des parties aériennes des plants de *Teucrium polium* L., *Matricaria chamomilla* L., et *Mentha pulegium* L. Ces derniers ont été extraits par trois méthodes, l'hydrodistillation, la distillation à la vapeur et la distillation par microondes.

Récemment, la méthode d'INAA utilisée comme méthode d'analyse de traces et d'ultra-traces est surtout pour calibrer et vérifier les résultats obtenus par d'autres méthodes comme ICP, XRF, qui se caractérise par leurs accessibilités et leurs rapidités.

Dans notre travail nous avons réalisé les analyses des éléments minéraux par trois techniques : INAA et ICP-OES, les résultats étés assez comparables. Les éléments minéraux sont très importants, en particulier les micro- et macronutriments qui sont essentiels dans divers processus métaboliques humains et contribuent de manière significative à la santé humaine. L'analyse de ces minéraux dans les plantes étudiées à travers ces techniques a montré que *M. pulegium* est riche en minéraux nécessaires à l'homme, tels que le calcium (31875 mg / kg), le potassium (14216 mg / kg), le fer (1604 mg / kg), le sodium (10790 mg / kg), le magnésium (71 mg / kg), le manganèse

(71,2 mg / kg), le zinc (44,5 mg / kg), etc... De plus, les teneurs en éléments potentiellement toxiques étaient bien inférieures aux valeurs toxicologiques de référence par rapport aux limites de tolérance fixées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), conférant à ces plantes des propriétés pharmaceutiques et médicinales particulières.

Récemment, l'étude des oligo-éléments tels que le sélénium (Se) est devenu l'une des plus grandes préoccupations des chercheurs et spécialistes dans le domaine de la santé humaine à l'échelle nationale et internationale. A cet effet, et à partir des expériences réalisées afin de mettre en œuvre la méthode de séparation radiochimique (RNAA) de l'élément du Se dans la matrice biologique (plante médicinale), et grâce aux résultats obtenus, nous pouvons conclure deux choses ; tout d'abord nous avons pu résoudre la problématique liée aux limitations de l'analyse par activation neutronique instrumentale (INAA), par la suite, la précision des concentrations obtenus ouvrira de nouveaux horizons pour l'amélioration des procédures de séparation radiochimique, et également de l'élargissement de la détermination d'autres oligo-éléments essentiels ou toxique qu'on peut analyser par la technique INAA tel que l'iode et le mercure, ...

En outre, et sur la base des résultats obtenus sur les tests des activités antioxydantes, il a été démontré que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *M. pulegium* est supérieure à celle de l'huile essentielle. Cependant, il est un peu faible par rapport aux témoins positifs (BHT) et V.E. Les tests de sensibilité antimicrobienne *in vitro* ont montré que les activités des huiles essentielles extraites par les méthodes, (HD) et (SD) était très élevée contre les bactéries par rapport aux composés de référence (*Fosfomycine, Carbénicilline, Eryth-romycine, Céphalexine*) l'extrait méthanolique à montré des effets moindres. Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* ont montré que l'extrait méthanolique de *M. pulegium* a une activité anti-inflammatoire considérable et significative par rapport au produit de référence *Diclofenac Sodium*, ces effets sont dus aux concentrations plus ou moins élevées des flavonoïdes et des phénols. Ces résultats obtenus indiquent que les extraits méthanoliques et l'huile essentielle de *M. pulegium* peuvent être utiles

en tant qu'agents actifs biologiques dans des formulations alimentaires et pharmaceutiques et ce, en raison de leur richesse en minéraux essentiels.

Par la suite et d'après les résultats obtenus sur l'activité anti-Alzheimer *in vitro*, il a été observé que les extraits méthanoliques des plantes *Teucrium polium* et *Matricaria chamomilla* présentaient une activité d'inhibition importante par rapport au standard la Galantamine. D'autre part, les résultats obtenus sur l'activité antidiabétique *in vitro*, des deux extraits méthanoliques des plantes *T. polium* ( $IC_{50} : 111,68 \pm 0,01 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), et *M. chamomilla* ( $IC_{50} : 440,58 \pm 0,06 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), présentaient une activité d'inhibition supérieure à celle du standard l'Acarabose ( $IC_{50} : 3650,93 \pm 10,70 \mu\text{g} / \text{ml}$ ).

Nous pouvons conclure que notre travail de recherche ouvrira de nouveaux horizons pour l'amélioration et l'application de ces techniques d'analyses pour la détermination des éléments minéraux et aussi pour la détermination des propriétés chimiques et pharmaceutiques, des composés chimiques des plantes médicinales, afin de satisfaire les besoins scientifiques de la recherche.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de ces espèces végétales (plantes médicinales) qui sont largement utilisées par la population algérienne. Enfin, on peut dire que la méthode INAA est une méthode très pratique pour la détermination des oligo-éléments à faible concentration.

Et comme perspectives il serait intéressant : d'identifier et quantifier les différents composés phénoliques présents dans les extraits testés. Une évaluation biologique approfondie de ces plantes, afin d'isoler les substances responsables sur les différentes l'effet biologiques, et aussi réalisation d'autres activités biologiques telles que les activités antivirales et l'activité antitumorale, et d'analyser d'autres plantes médicinales algériennes pour élaborer une banque de données

---

# *Références*

---

## Références

1. Gay, F. Plantes médicinales du monde. Croyances et Réalités. *Études Normandes* **2002**, 51.
2. Begaa, S.; Messaoudi, M.; Ouanezar, A.; Hamidatou, L.; Malki, A. Chemical elements of Algerian *Mentha spicata* L. used in the treatment of digestive system disorders by employing instrumental neutron activation analysis technique. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2018**, 317, 1107–1112, doi:10.1007/s10967-018-5976-0.
3. Kathiresh, M.; Devi, Ps. Bioactive compounds in *Sesbania sesban* flower and its antioxidant and Antimicrobial activity. *Journal of Pharmacy Research* **2012**, 5.
4. Khan, Z.I.; Ashraf, M.; Hussain, A. Evaluation of macro mineral contents of forages: Influence of pasture and seasonal variation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **2007**, 20, doi:10.5713/ajas.2007.908.
5. Radi, F.Z.; El Hamzaoui, N.; Regragui, M.; Kholtei, A.; Oulhaj, H.; Zair, T. The Antibacterial Effect of Essential Oils of *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq, *Lavandula multifida* L., and *Mentha pulegium* L., Tested Against some Multiresistant Strains that Are Involved in Nosocomial Infections. *Phytothérapie* **2020**, 18, doi:10.3166/phyto-2019-0171.
6. Lawrence, B.M. *Mint: The genus mentha*; CRC Press.; 2006;
7. Soetan, K.O.; Olaiya, C.O.; Oyewole, O.E. The importance of mineral elements for humans , domestic animals and plants : A review. *African Journal of Food Science* **2010**, 4.
8. Nabrzyski, M. Functional role of some minerals in foods. In *Mineral Components in Foods*; CRC press New York, NY, 2006; p. 39.
9. Chitturi, R.; Baddam, V.R.; Prasad, L.; Prashanth, L.; Kattapagari, K. A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences* **2015**, 4, doi:10.4103/2277-8632.158577.
10. Speich, M.; Pineau, A.; Ballereau, F. Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. *Clinica Chimica Acta* 2001, 312.
11. Gharibzahedi, S.M.T.; Jafari, S.M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends in Food Science and Technology* **2017**, 62, doi:10.1016/j.tifs.2017.02.017.
12. Benarfa, A.; Begaa, S.; Messaoudi, M.; Hamlat, N.; Sawicka, B. Elemental composition analysis of *Pistacia lentiscus* L., leaves collected from Mitidja plain in Algeria using instrumental neutron activation analysis (INAA) technique. *Radiochimica Acta* **2020**, 108, 821–828, doi:10.1515/ract-2020-0011.
13. Nait, M.A. Cheminement du Sélénium dans l'est Algérien, Université Constantine 1, Algerie., 2014.
14. Chappuis, P. *Les oligoéléments en médecine et biologie*; Paris (France) Lavoisier, 1991;
15. Begaa, S.; Messaoudi, M. Toxicological Aspect of Some Selected Medicinal Plant Samples Collected from Djelfa, Algeria Region. *Biological Trace Element Research* **2019**, 187, 301–306, doi:10.1007/s12011-018-1365-3.

16. Messaoudi, M.; Begaa, S. Dietary Intake and Content of Some Micronutrients and Toxic Elements in Two Algerian Spices (*Coriandrum sativum* L. and *Cuminum cyminum* L.). *Biological Trace Element Research* **2019**, *188*, 508–513, doi:10.1007/s12011-018-1417-8.
17. Nys, Y. Oligo-éléments, croissance et santé du poulet de chair. *Productions Animales* **2001**, *14*, doi:10.20870/productions-animales.2001.14.3.3737.
18. Zazzo, J.F. Oligo-éléments, vitamines et immunité. *Nutrition clinique et métabolisme* **1993**, *7*, doi:10.1016/S0985-0562(05)80040-8.
19. Fernández-Lázaro, D.; Fernandez-Lazaro, C.I.; Mielgo-Ayuso, J.; Navascués, L.J.; Martínez, A.C.; Seco-Calvo, J. The role of selenium mineral trace element in exercise: Antioxidant defense system, muscle performance, hormone response, and athletic performance. A systematic review. *Nutrients* **2020**, *12*, doi:10.3390/nu12061790.
20. Picaud, C. Oligo-éléments: excès, carences et conseil officinal, Université de Limoges Faculté de Pharmacie, 2017.
21. Messaoudi, M.; Begaa, S. Application of INAA technique for analysis of essential trace and toxic elements in medicinal seeds of *Carum carvi* L. & *Foeniculum vul-gare* Mill. used in Algeria. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2018**, *9*, 39–45, doi:10.1016/j.jarmap.2018.01.001.
22. Dubey, P.; Thakur, V.; Chattopadhyay, M. Role of minerals and trace elements in diabetes and insulin resistance. *Nutrients* **2020**, *12*, doi:10.3390/nu12061864.
23. Brown, R.J.C.; Milton, M.J.T. Analytical techniques for trace element analysis: An overview. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2005**, *24*, doi:10.1016/j.trac.2004.11.010.
24. Win, D.T. Neutron activation analysis (NAA). *AU J Technol* **2004**, *8*, 8–14.
25. Vértes, A.; Nagy, S.; Klencsár, Z.; Lovas, R.G.; Rösch, F. Chemical Applications of Nuclear Reactions and Radiation. In *Handbook of Nuclear Chemistry*; Springer Science & Business Media, 2010; p. 222 ISBN 144190719X.
26. Messaoudi, M. Développement de la méthode de séparation radiochimique du sélénium basée sur l'activation neutronique RNAA et son application sur les grains de café et les feuilles de menthe, *thèse de Magister*. Ecole normale supérieure de Kouba, Alger, 2016.
27. Galinha, C.; Freitas, M.C.; Pacheco, A.M.G.; Kameník, J.; Kučera, J.; Anawar, H.M.; Coutinho, J.; Maçãs, B.; Almeida, A.S. Selenium determination in cereal plants and cultivation soils by radiochemical neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2012**, *294*, doi:10.1007/s10967-011-1510-3.
28. Dybczyński, R.S.; Danko, B.; Polkowska-Motrenko, H.; Samczyński, Z. RNAA in metrology: A highly accurate (definitive) method. *Talanta* **2007**, *71*, doi:10.1016/j.talanta.2006.04.021.
29. Alamin, M.B.; Bejey, A.M.; Kučera, J.; Mizera, J. Determination of mercury and selenium in consumed food items in Libya using instrumental and radiochemical NAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2006**, *270*, doi:10.1007/s10967-006-0321-4.
30. Bejey, A.M.; Alamin, M.B.; Mizera, J.; Kučera, J. Determination of iodine in foodstuffs consumed in Libya using instrumental and radiochemical neutron activation analysis. *Czechoslovak Journal of Physics* **2006**, *56*, doi:10.1007/s10582-006-0501-z.
31. Heydorn, K. Radiochemical neutron activation analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*:

- Applications, Theory and Instrumentation* **2006**.
32. Parry, S.J. The role of neutron activation with radiochemistry in geoanalysis. *Journal of Geochemical Exploration* **1992**, *44*, doi:10.1016/0375-6742(92)90054-C.
  33. Izgi, B.; Gucer, S.; Jaćimović, R. Determination of selenium in garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*) by electro thermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* **2006**, *99*, doi:10.1016/j.foodchem.2005.08.033.
  34. Adotey, D.K.; Stibilj, V.; Serfor-Armah, Y.; Nyarko, B.J.B.; Jaćimović, R. Dietary supply of selenium for adolescents in three residential care orphanages in Southern Ghana. *Science of the Total Environment* **2011**, *410–411*, doi:10.1016/j.scitotenv.2011.09.039.
  35. Jablonska, E.; Gromadzinska, J.; Klos, A.; Bertrandt, J.; Skibniewska, K.; Darago, A.; Wasowicz, W. Selenium, zinc and copper in the Polish diet. *Journal of Food Composition and Analysis* **2013**, *31*, doi:10.1016/j.jfca.2013.05.016.
  36. Viñas, P.; López-García, I.; Merino-Meroño, B.; Campillo, N.; Hernández-Córdoba, M. Determination of selenium species in infant formulas and dietetic supplements using liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *535*, doi:10.1016/j.aca.2004.11.068.
  37. Morris, J.S.; Spate, V.L.; Ngwenyama, R.A.; Waters, D.J. Determination of selenium status using the nail biologic monitor in a canine model. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2012**, *291*, doi:10.1007/s10967-011-1244-2.
  38. Chajduk, E.; Polkowska-Motrenko, H.; Dybczyński, R.S. A definitive RNAA method for determination of selenium in biological samples: Uncertainty evaluation and assessment of degree of accuracy. *Accreditation and Quality Assurance* **2008**, *13*, doi:10.1007/s00769-008-0377-7.
  39. Stosnach, H. Analytical determination of selenium in medical samples, staple food and dietary supplements by means of total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* **2010**, *65*, doi:10.1016/j.sab.2010.07.001.
  40. Gao, J.; Liu, Y.; Huang, Y.; Lin, Z.Q.; Bañuelos, G.S.; Lam, M.H.W.; Yin, X. Daily selenium intake in a moderate selenium deficiency area of Suzhou, China. *Food Chemistry* **2011**, *126*, doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.137.
  41. Leyva, D.; Estévez, J.; Montero, A.; Pupo, I. Separation and determination of selenium in water samples by the combination of APDC coprecipitation: X-ray fluorescence spectrometry. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2012**, *291*, doi:10.1007/s10967-011-1375-5.
  42. Frayret, J.; Mermet, J.; Paucot, H. ICP-OES: couplage plasma induit par haute fréquence–spectrométrie optique. **2012**.
  43. Barbier, S. Étude des techniques de spectrométrie de plasma pour l'analyse de matériaux à spectres optiques complexes : application aux terres rares et aux matériaux plastiques. *Thèse, L'université Claude Bernard, Lyon 1* **2014**, 193.
  44. Gazengel, J.-M.; Orecchioni, A.-M. *Le préparateur en pharmacie; Guide théorique et pratique; Médicales.*; Tec & Doc, 1999; Vol. 111;.
  45. Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* **2006**, *27*.

46. Angelini, P.; Tirillini, B.; Akhtar, M.S.; Dimitriu, L.; Bricchi, E.; Bertuzzi, G.; Venanzoni, R. Essential oil with anticancer activity: An overview. In *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements*; 2018; Vol. 2, pp. 207–231.
47. Singh, O.; Khanam, Z.; Misra, N.; Srivastava, M.K. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews* **2011**, *5*, 82–95, doi:10.4103/0973-7847.79103.
48. Sonam, C.; Sharma, K.; Guleria, S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines* **2017**, *4*.
49. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* **2012**, *75*.
50. Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Bailleul, F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* **2004**, *2*, 3–6.
51. Malecky, M. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins 2008.
52. Malecky, M. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins, Paris, AgroParisTech ., 2008.
53. Klaas, C.A.; Wagner, G.; Laufer, S.; Sosa, S.; Della Loggia, R.; Bomme, U.; Pahl, H.L.; Merfort, I. Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from Arnica flowers. *Planta Medica* **2002**, *68*, doi:10.1055/s-2002-32067.
54. Walton, N.J.; Brown, D.E. *Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products*; World Scientific, 1999; ISBN 9810227736.
55. Quézel, P.; Santa, S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. **1962**.
56. Raphael, E.C. Traditional medicine in Nigeria: Current status and the future. *Research Journal of Pharmacology* **2011**, *5*.
57. Organization, W.H. *WHO Global report on traditional and complementary medicine 2019*; 2019;
58. Bahramikia, S.; Yazdanparast, R. Phytochemistry and medicinal properties of *teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytotherapy Research* **2012**, *26*, 1581–1593, doi:10.1002/ptr.4617.
59. Kerbouche, L.; Hazzit, M.; Ferhat, M.A.; Baaliouamer, A.; Miguel, M.G. Biological Activities of Essential Oils and Ethanol Extracts of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. and *Origanum floribundum* Munby. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* **2015**, *18*, 1197–1208, doi:10.1080/0972060X.2014.935065.
60. Chabane, S.; Boudjelal, A.; Napoli, E.; Benkhaled, A.; Ruberto, G. Phytochemical composition, antioxidant and wound healing activities of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. essential oil. *Journal of Essential Oil Research* **2021**, *33*, doi:10.1080/10412905.2020.1842260.
61. Marković, M.; Pljevljakušić, D.; Kojičić, K.; Cupara, S. Ethnopharmacological application of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) in the pirot county of southeastern serbia. *Arhiv za Farmaciju* **2020**, *70*, doi:10.5937/arhfarm2004238M.
62. Mao, J.J.; Xie, S.X.; Keefe, J.R.; Soeller, I.; Li, Q.S.; Amsterdam, J.D. Long-term chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) treatment for generalized anxiety disorder: A randomized clinical trial. *Phytomedicine* **2016**, *23*, doi:10.1016/j.phymed.2016.10.012.
63. Žlabur, J.Š.; Žutić, I.; Radman, S.; Pleša, M.; Brnčić, M.; Barba, F.J.; Rocchetti, G.; Lucini, L.;

- Lorenzo, J.M.; Domínguez, R.; et al. Effect of Different Green Extraction Methods and Solvents on Bioactive Components of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Flowers. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25040810.
64. Padalia, R.C.; Verma, R.S.; Chauhan, A.; Sundaresan, V.; Chanotiya, C.S. Essential oil composition of sixteen elite cultivars of *Mentha* from western Himalayan region, India. *Maejo International Journal of Science and Technology* **2013**, *7*, doi:10.14456/mijst.2013.7.
65. Salehi, B.; Stojanović-Radić, Z.; Matejić, J.; Sharopov, F.; Antolak, H.; Kręgiel, D.; Sen, S.; Sharifi-Rad, M.; Acharya, K.; Sharifi-Rad, R.; et al. Plants of genus *Mentha*: From farm to food factory. *Plants* **2018**, *7*.
66. Beloued, A. Plantes médicinales d'Algérie. *entreprise nationale du livre, Alger*, **1998**.
67. Rodrigues, L.; Póvoa, O.; Teixeira, G.; Figueiredo, A.C.; Moldão, M.; Monteiro, A. Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal. *Industrial Crops and Products* **2013**, *43*, 692–700, doi:10.1016/j.indcrop.2012.07.061.
68. Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Batista, I.; Serrano, C.; Matos, O.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.F.; Saraiva, J.A.; Nunes, M.L. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products* **2012**, *36*, 81–87, doi:10.1016/j.indcrop.2011.08.011.
69. Kanakis, C.D.; Petrakis, E.A.; Kimbaris, A.C.; Pappas, C.; Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.G. Classification of Greek *mentha pulegium* L. (Pennyroyal) samples, according to geographical location by fourier transform infrared spectroscopy. *Phytochemical Analysis* **2012**, *23*, doi:10.1002/pca.1322.
70. Hmiri, S.; Amrani, N.; Rahouti, M. Détermination in vitro de l'activité antifongique des vapeurs d'eugénol et d'huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Tanacetum annuum* L. vis-à-vis de trois champignons responsables de la pourriture des pommes en post-récolte. *Acta Botanica Gallica* **2011**, *158*, doi:10.1080/12538078.2011.10516298.
71. Beghidja, N.; Bouslimani, N.; Benayache, F.; Benayache, S.; Chalchat, J.C. Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the East of Algeria. *Chemistry of Natural Compounds* **2007**, *43*, doi:10.1007/s10600-007-0170-6.
72. Aid, K.; Alami, I.; Benali, D.; Zemzami, M.; Mokhtari, A.; Soulaymani, A. Multiplication massive in vitro de *Mentha pulegium*. *Biologie & Santé* **2003**, *3*, 244–251.
73. Agnihotri, V.K.; Agarwal, S.G.; Dhar, P.L.; Thappa, R.K.; Baleshwar; Kapahi, B.K.; Saxena, R.K.; Qazi, G.N. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour and Fragrance Journal* **2005**, *20*, doi:10.1002/ffj.1497.
74. Díaz-Maroto, M.C.; Castillo, N.; Castro-Vázquez, L.; González-Viñas, M.Á.; Pérez-Coello, M.S. Volatile composition and olfactory profile of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants. *Flavour and Fragrance Journal* **2007**, *22*, doi:10.1002/ffj.1766.
75. Mahboubi, M.; Haghi, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, *119*, 325–327, doi:10.1016/j.jep.2008.07.023.
76. Fatiha, B.; Didier, H.; Naima, G.; Khodir, M.; Martin, K.; Léocadie, K.; Caroline, S.; Mohamed, C.; Pierre, D. Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity

- of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products* **2015**, *74*, doi:10.1016/j.indcrop.2015.04.038.
77. Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*; Allured publishing corporation Carol Stream, IL, 2007; Vol. 456;.
78. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* **1965**, *16*, 144–158.
79. Müller, L.; Gnoyke, S.; Popken, A.M.; Böhm, V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology* **2010**, *43*, 992–999.
80. Topçu, G.; Ay, M.; Bilici, A.; Sarıkürkcü, C.; Öztürk, M.; Ulubelen, A. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* **2007**, *103*, 816–822.
81. Braca, A.; Sortino, C.; Politi, M.; Morelli, I.; Mendez, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of ethnopharmacology* **2002**, *79*, 379–381.
82. Koleva, I.I.; Van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H.; De Groot, A.; Evstatieva, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* **2002**, *13*, doi:10.1002/pca.611.
83. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *26*, doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
84. Miller, N.J.; Sampson, J.; Candeias, L.P.; Bramley, P.M.; Rice-Evans, C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* **1996**, *384*, doi:10.1016/0014-5793(96)00323-7.
85. Shi, H.; Noguchi, N.; Niki, E. Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods in enzymology* **2001**, *335*, 157–166.
86. Gürsoy, N.; Tepe, B.; Aşkin Akpulat, H. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oils of *Salvia palaestina* (Benth) and *S. ceratophylla* (L.). *Records of Natural Products* **2012**, *6*.
87. Marco, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1968**, *45*, doi:10.1007/BF02668958.
88. Zougali, B. Etude physico-chimiques des plantes médicinales Algériennes 2012, 80.
89. Allegrini J., Bouchberg M.S., M.H. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. *Société de Pharmacie de Montpellier* **1973**, *33*, 73–86.
90. Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. Handbook of essential oils. *Science, Technology and Applications. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL* **2010**.
91. Zengin, G.; Sarikurkcü, C.; Aktumsek, A.; Ceylan, R.; Ceylan, O. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products* **2014**, *53*, doi:10.1016/j.indcrop.2013.12.043.
92. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, *7*, doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9.

93. Colot, M. *Notions techniques de pharmacologie générale*; Masson.; Masson, 1972;
94. Council, N.R. Recommended dietary allowances. **1989**.
95. Jamshidi-Kia, F.; Lorigooini, Z.; Amini-Khoei, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology* **2018**, *7*.
96. Gambelli, L.; Belloni, P.; Ingraio, G.; Pizzoferrato, L.; Santaroni, G.P. Minerals and trace elements in some Italian dairy products. *Journal of Food Composition and Analysis* **1999**, *12*, 27–35.
97. González-Montaña, J.-R.; Escalera-Valente, F.; Alonso, A.J.; Lomillos, J.M.; Robles, R.; Alonso, M.E. Relationship between vitamin B12 and cobalt metabolism in domestic ruminant: an update. *Animals* **2020**, *10*, 1855.
98. Talukder, G.; Sharma, A. Cobalt. In *Handbook of plant nutrition*; CRC Press, 2016; pp. 515–530 ISBN 0429134452.
99. Messaoudi, M.; Begaa, S.; Hamidatou, L.; Salhi, M. Determination of selenium in roasted beans coffee samples consumed in Algeria by radiochemical neutron activation analysis method. *Radiochimica Acta* **2018**, *106*, 141–146, doi:10.1515/ract-2017-2782.
100. Messaoudi, M.; Begaa, S. Radiochemical neutron activation analysis for the determination of selenium in *Mentha spicata* L. samples collected from Djelfa, Algeria region. *Radiochimica Acta* **2020**, *108*, doi:10.1515/ract-2019-3105.
101. Aprotosoiaie, A.C.; Şpac, A.; Hăncianu, M.; Miron, A.; Tănăsescu, V.F.; Dorneanu, V.; Stănescu, U. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Farmacia* **2010**, *58*.
102. Marzouki, H.; Khaldi, A.; Falconieri, D.; Piras, A.; Marongiu, B.; Molicotti, P.; Zanetti, S. Essential oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia obtained by supercritical carbon dioxide extraction. *Natural Product Communications* **2010**, *5*, doi:10.1177/1934578x1000501226.
103. Pandita, D.; Pandita, A.; Wani, S.H.; Abdelmohsen, S.A.M.; Alyousef, H.A.; Abdelbacki, A.M.M.; Al-Yafrasi, M.A.; Al-Mana, F.A.; Elansary, H.O. Crosstalk of multi-omics platforms with plants of therapeutic importance. *Cells* **2021**, *10*, 1296.
104. Palici, I.-F. Valorisation des Activités biologiques de certaines espèces végétales sahariennes Nord-africaines 2016.
105. Cheraif, K.; Bakchiche, B.; Gherib, A.; Bardaweel, S.K.; Çol Ayvaz, M.; Flamini, G.; Ascrizzi, R.; Ghareeb, M.A. Chemical composition, antioxidant, anti-tyrosinase, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of essential oils of six Algerian plants. *Molecules* **2020**, *25*, 1710.
106. Boukhebt, H.; Chaker, A.; Belhadj, H.; ... F.S.-D.P.; 2011, undefined Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *researchgate.net*.
107. Ait-Ouazzou, A.; Lorán, S.; Arakrak, A.; ... A.L.-F.R.; 2012, U. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International* 319–313 ,**45** ,**2011** , doi:10.1016/j.foodres.2011.09.004.

108. Boumezzourh, A.; Ouknin, M.; ... E.C.-I.J.C.S.; 2020, undefined Inhibition of tinplate corrosion in 0.5 M H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> medium by *Mentha pulegium* essential oil. *researchgate.net*–152 ,9 ,2020 170, doi:10.17675/2305-6894-2020-9-1-9.
109. El-Ghorab, A.H. The chemical composition of the *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **2006**, 9, 183–195.
110. Coelho, J.; Cristino, A.; Matos, P.; Molecules, A.R.-; 2012, undefined Extraction of volatile oil from aromatic plants with supercritical carbon dioxide: experiments and modeling. *mdpi.com*.
111. Piras, A.; Porcedda, S.; Falconieri, D.; Maxia, A.; Gonçalves, M.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. Antifungal activity of essential oil from *Mentha spicata* L. and *Mentha pulegium* L. growing wild in Sardinia island (Italy). *Natural product research* **2021**, 35, 993–999.
112. Bektašević, M.; Politeo, O.; Carev, I. Comparative Study of Chemical Composition, Cholinesterase Inhibition and Antioxidant Potential of *Mentha pulegium* L. Essential Oil. *Chemistry & Biodiversity* **2021**, 18, e2000935.
113. Montenegro, I.; Said, B.; Godoy, P.; Besoain, X.; Agronomy, C.P.-; 2020, undefined Antifungal activity of essential oil and main components from *Mentha pulegium* growing wild on the Chilean central coast. *mdpi.com*.
114. Aburjai, T.; Hudaib, M.; Cavrini, V. Composition of the essential oil from Jordanian germander (*Teucrium polium* L.). *Journal of essential oil research* **2006**, 18, 97–99.
115. Bezić, N.; Vuko, E.; Dunkić, V.; Ruščić, M.; Blažević, I.; Burčul, F. Antiphytoviral activity of sesquiterpene-rich essential oils from four Croatian *Teucrium* species. *Molecules* **2011**, 16, 8119–8129.
116. Boulila, A.; Béjaoui, A.; Messaoud, C.; Boussaid, M. Variation of volatiles in Tunisian populations of *Teucrium polium* L.(Lamiaceae). *Chemistry & biodiversity* **2008**, 5, 1389–1400.
117. Sofowora, A. Research on medicinal plants and traditional medicine in Africa. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* **1996**, 2, 365–372.
118. Bendjabeur, S.; Benchabane, O.; Bensouici, C.; Hazzit, M.; Baaliouamer, A.; Bitam, A. Antioxidant and anticholinesterase activity of essential oils and ethanol extracts of *Thymus algeriensis* and *Teucrium polium* from Algeria. *Journal of Food Measurement and Characterization* **2018**, 12, 2278–2288.
119. Farahbakhsh, J.; Najafian, S.; Hosseinfarahi, M.; Gholipour, S. Essential Oil Composition and Phytochemical Properties from Leaves of Felty Germander (*Teucrium polium* L.) and Spearmint (*Mentha spicata* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **2021**, 24, 147–159.
120. Benali, T.; Habbadi, K.; Bouyahya, A.; Khabbach, A.; Marmouzi, I.; Aanniz, T.; Chtibi, H.; Mrabti, H.N.; Achbani, E.H.; Hammani, K. Phytochemical Analysis and Study of Antioxidant, Anticandidal, and Antibacterial Activities of *Teucrium polium* subsp. *polium* and *Micromeria graeca* (Lamiaceae) Essential Oils from Northern Morocco. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2021**, 2021.
121. Stanojevic, L.P.; Marjanovic-Balaban, Z.R.; Kalaba, V.D.; Stanojevic, J.S.; Cvetkovic, D.J. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chamomile flowers essential oil (*Matricaria chamomilla* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **2016**, 19, 2017–2028.
122. Ayoughi, F.; Marzegar, M.; Sahari, M.A.; Naghdibadi, H. Chemical compositions of essential

- oils of *Artemisia dracunculus* L. and endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their antioxidative effects. *Journal of Agricultural Science and Technology* **2011**, *13*, 79–88.
123. Satyal, P.; Shrestha, S.; Setzer, W.N. Composition and bioactivities of an (E)- $\beta$ -farnesene chemotype of chamomile (*Matricaria chamomilla*) essential oil from Nepal. *Natural product communications* **2015**, *10*, 1934578X1501000835.
124. EL-Hefny, M.; Abo Elgat, W.A.A.; Al-Huqail, A.A.; Ali, H.M. Essential and recovery oils from *Matricaria chamomilla* flowers as environmentally friendly fungicides against four fungi isolated from cultural heritage objects. *Processes* **2019**, *7*, 809.
125. Mekonnen, A.; Yitayew, B.; Tesema, A.; Taddese, S. In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *International journal of microbiology* **2016**, 2016.
126. Berka-Zougali, B.; Ferhat, M.-A.; Hassani, A.; Chemat, F.; Allaf, K.S. Comparative study of essential oils extracted from Algerian *Myrtus communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. *International journal of molecular sciences* **2012**, *13*, 4673–4695.
127. Shrigod, N.M.; Swami Hulle, N.R.; Prasad, R. V. Supercritical fluid extraction of essential oil from mint leaves (*mentha spicata*): Process optimization and its quality evaluation. *Journal of Food Process Engineering* **2017**, *40*, doi:10.1111/jfpe.12488.
128. Ferhat, M.A.; Meklati, B.Y.; Smadja, J.; Chemat, F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112*, 121–126.
129. Zargoosh, Z.; Ghavam, M.; Bacchetta, G.; Tavili, A. Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1–15.
130. Chabane, S.; Boudjelal, A.; Keller, M.; Doubakh, S.; Potterat, O. *Teucrium polium*-wound healing potential, toxicity and polyphenolic profile. *South African Journal of Botany* **2021**, *137*, 228–235.
131. Chedia, A.; Ghazghazi, H.; Brahim, H.; Abderrazak, M. Secondary metabolite, antioxidant and antibacterial activities of *Teucrium polium* L. methanolic extract. *International Journal of Plant Production* **2013**, *4*, 1790–1797.
132. El Atki, Y.; Aouam, I.; Taroq, A.; Lyoussi, B.; Taleb, M.; Abdellaoui, A. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of extracts from *Teucrium polium* growing wild in Morocco. *Materials Today: Proceedings* **2019**, *13*, 777–783.
133. Stankovic, M.S.; Niciforovic, N.; Mihailovic, V.; Topuzovic, M.; Solujic, S. Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **2012**, *81*.
134. Haghi, G.; Hatami, A.; Safaei, A.; Mehran, M. Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV. *Research in pharmaceutical sciences* **2014**, *9*, 31.
135. Osman, M.Y.; Taie, H.A.A.; Helmy, W.A.; Amer, H. Screening for antioxidant, antifungal, and antitumor activities of aqueous extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla*). *Egyptian Pharmaceutical Journal* **2016**, *15*, 55.
136. Hajjaj, G. Screening phytochimique, etude toxicologique et valorisation pharmacologique de *matricaria chamomilla* l. et de *l'ormenis mixta* l.(asteraceae). **2017**.

137. Hassanpour, H.; Niknam, V.; Ahmadi-Sakha, S.; Haddadi, B. Antioxidant Activity and Flavonoid Content of Matricaria Chamomilla Extracts from Different Populations of Iran. *Journal of Botanical Research* **2020**, *2*.
138. Benabdallah, A.; Rahmoune, C.; Boumendjel, M.; Aissi, O.; Messaoud, C. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild Mentha species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* **2016**, *6*, 760–766.
139. Hajlaoui, H.; Trabelsi, N.; Noumi, E.; Snoussi, M.; Fallah, H.; Ksouri, R.; Bakhrouf, A. Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (Mentha longifolia and Mentha pulegium) used in the Tunisian folkloric medicine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2009**, *25*, 2227–2238.
140. Politeo, O.; Bektašević, M.; Carev, I.; Jurin, M.; Roje, M. Phytochemical composition, antioxidant potential and cholinesterase inhibition potential of extracts from Mentha pulegium L. *Chemistry & biodiversity* **2018**, *15*, e1800374.
141. Sarikurkcu, C.; Eryigit, F.; Cengiz, M.; Tepe, B.; Cakir, A.; Mete, E. Screening of the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of Mentha pulegium L. from Turkey. *Spectroscopy Letters* **2012**, *45*, 352–358.
142. Ksouri, R.; Megdiche, W.; Falleh, H.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Smaoui, A.; Abdelly, C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biologies* **2008**, *331*, 865–873.
143. Moon, J.K.; Shibamoto, T. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*.
144. Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry* **2004**, *85*, doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.024.
145. Bouaziz, A.; Djidel, S.; Bentaher, A.; Khennouf, S. Polyphenolic content, Antioxidant and Anti-inflammatory activities of Melon (Cucumis melo L. var. inodorus) Seeds. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* **2020**, *10*, 22–26.
146. Ponce, A.G.; Fritz, R.; Del Valle, C.; Roura, S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology* **2003**, *36*, 679–684.
147. VanGilder, R.L.; Rosen, C.L.; Barr, T.L.; Huber, J.D. Targeting the neurovascular unit for treatment of neurological disorders. *Pharmacology & therapeutics* **2011**, *130*, 239–247.
148. Cadola, L.; Marquis, R.; Champod, C. Le processus d'écriture et la maladie d'Alzheimer: Un état de l'art. *Canadian Society of Forensic Science Journal* **2019**, *52*, 53–77.
149. Marchesi, V.T. Alzheimer's disease 2012: the great amyloid gamble. *The American journal of pathology* **2012**, *180*, 1762–1767.
150. FOLLIOT, C. La maladie d'Alzheimer au fil des siècles. *Revue de Biologie Médicale/N* **2021**, *363*.
151. Semah, F.; Deberdt, W.; Ceccaldi, M. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer: apport de l'imagerie au florbétapir et autres radiopharmaceutiques de la plaque amyloïde. *Médecine Nucléaire* **2016**, *40*, 364–381.

152. Povova, J.; Ambroz, P.; Bar, M.; Pavukova, V.; Sery, O.; Tomaskova, H.; Janout, V. Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **2012**, *156*, 108–114.
153. Mehta, M.; Adem, A.; Sabbagh, M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's disease* **2012**, *2012*.
154. Loizzo, M.R.; Tundis, R.; Menichini, F.; Menichini, F. Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. *Current medicinal chemistry* **2008**, *15*, 1209–1228.
155. Fernández-Moriano, C.; González-Burgos, E.; Gómez-Serranillos, M.P. *Lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in alzheimer's and Parkinson's diseases: role of natural products as cytoprotective agents*; Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2017;
156. Fan, D.; Liu, L.; Wu, Z.; Cao, M. Combating neurodegenerative diseases with the plant alkaloid berberine: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Current neuropharmacology* **2019**, *17*, 563–579.
157. Tundis, R.; Menichini, F.; Conforti, F.; Loizzo, M.R.; Bonesi, M.; Statti, G.; Menichini, F. A potential role of alkaloid extracts from *Salsola* species (Chenopodiaceae) in the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2009**, *24*, doi:10.1080/14756360802399662.
158. Zlatić, N.; Stanković, M. Anticholinesterase, Antidiabetic and Anti-inflammatory Activity of Secondary Metabolites of *Teucrium* Species. In *Teucrium Species: Biology and Applications*; Springer, 2020; pp. 391–411.
159. Orhan, I.; Aslan, M. Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and in vitro anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *Journal of Ethnopharmacology* **2009**, *122*, 327–332.
160. Ionita, R.; Postu, P.A.; Mihasan, M.; Gorgan, D.L.; Hancianu, M.; Cioanca, O.; Hritcu, L. Ameliorative effects of *Matricaria chamomilla* L. hydroalcoholic extract on scopolamine-induced memory impairment in rats: A behavioral and molecular study. *Phytomedicine* **2018**, *47*, 113–120.
161. Drouind.P, Blicke .J.F, Charbonnel .B, Eschwege .E, Guillausse .P.J, Plouin .PF, Daninos .J.M, Balarac .N, S.J.. Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères. *Diabetes & Metabolism (Paris)* **1999**, *25*, 72–83.
162. Thorel, F.; Herrera, P.L. Génération de cellules  $\beta$ -pancréatiques par conversion spontanée de cellules  $\alpha$  chez des souris diabétiques. *médecine/sciences* **2010**, *26*, 906–909.
163. Millar, W.J.; Young, T.K. Évolution du diabète: prévalence, incidence et facteurs de risque. *Rapports sur la santé* **2003**, *14*, 3–82.
164. Kasmi, S.; Hamdi, A.; Atmani-Kilani, D.; Debbache-Benaida, N.; Jaramillo-Carmona, S.; Rodríguez-Arcos, R.; Jiménez-Araujo, A.; Ayouni, K.; Atmani, D.; Guillén-Bejarano, R. Characterization of phenolic compounds isolated from the *Fraxinus angustifolia* plant and several associated bioactivities. *Journal of Herbal Medicine* **2021**, *29*, 100485.
165. Djeridane, A.; Hamdi, A.; Bensania, W.; Cheifa, K.; Lakhdari, I.; Yousfi, M. The in vitro evaluation of antioxidative activity,  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. *Diabetes & metabolic syndrome: clinical research & reviews* **2015**, *9*, 324–331.

166. Ghedira, K. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* **2005**, *3*, 162–169.
167. Moradi, B.; Abbaszadeh, S.; Shahsavari, S.; Alizadeh, M.; Beyranvand, F. The most useful medicinal herbs to treat diabetes. *Biomedical Research and Therapy* **2018**, *5*, 2538–2551.
168. Vahidi, A.R.; DASHTI, R.M.H.; BAGHERI, S.M. The Effect of Teucrium polium boiled extract in diabetic rats. **2010**.
169. Dehghan, S.; Sayadi, S.; Ghanbarian, A. Therapeutic effects and mechanism of Teucrium polium in diabetes mellitus: a review article. *Research Journal of Pharmacognosy* **2017**, *4*, 73.
170. Srivastava, J.K.; Shankar, E.; Gupta, S. Chamomile: a herbal medicine of the past with a bright future. *Molecular medicine reports* **2010**, *3*, 895–901.
171. Cemek, M.; Kağa, S.; Şimşek, N.; Büyükokuroğlu, M.E.; Konuk, M. Antihyperglycemic and antioxidative potential of Matricaria chamomilla L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of natural medicines* **2008**, *62*, 284–293.
172. Kato, A.; Minoshima, Y.; Yamamoto, J.; Adachi, I.; Watson, A.A.; Nash, R.J. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *Journal of agricultural and food chemistry* **2008**, *56*, 8206–8211.
173. Rahmouni, F.; Hamdaoui, L.; Rebai, T. In vivo anti-inflammatory activity of aqueous extract of Teucrium polium against carrageenan-induced inflammation in experimental models. *Archives of physiology and biochemistry* **2017**, *123*, 313–321.
174. Amraei, M.; Ghorbani, A.; Seifinejad, Y.; Mousavi, S.F.; Mohamadpour, M.; Shirzadpour, E. The effect of hydroalcoholic extract of Teucrium polium L. on the inflammatory markers and lipid profile in hypercholesterolemic rats. *Journal of inflammation research* **2018**, *11*, 265.
175. RAHMANI, S.; BELBOUKHARI, N.; SEKKOUM, K.; CHERITI, A. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles Limoniastrum feei (plumbaginacea). *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"* **2016**, *6*, 80–86.
176. Weill, B.; Batteux, F. *Immunopathologie et réactions inflammatoires*; De Boeck Supérieur, 2003; ISBN 2804141772.
177. Viladomiu, M.; Hontecillas, R.; Bassaganya-Riera, J. Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *European Journal of Pharmacology* **2016**, *785*, 87–95.
178. Andrade, L.N.; De Sousa, D.P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* **2013**, *18*, 1227–1254.
179. Singh, R.S.; Ahmad, M.; Wafai, Z.A.; Seth, V.; Moghe, V.V.; Upadhyaya, P. Anti-inflammatory effects of Dashmula, an Ayurvedic preparation, versus Diclofenac in animal models. *J Chem Pharm Res* **2011**, *3*, 882–888.
180. Santangelo, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Di Benedetto, R.; Filesi, C.; Masella, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali-istituto superiore di sanita* **2007**, *43*, 394.
181. Dellai, A.; Souissi, H.; Borgi, W.; Bouraoui, A.; Chouchane, N. Antiinflammatory and antiulcerogenic activities of Pistacia lentiscus L. leaves extracts. *Industrial Crops and Products* **2013**, *49*, 879–882, doi:10.1016/j.indcrop.2013.07.010.

182. Karthik, I. Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by in-vitro method. **2013**.
183. Shah, A.S.; Alagawadi, K.R. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties of *Thespesia populnea* Soland ex. Correa seed extracts and its fractions in animal models. *Journal of ethnopharmacology* **2011**, *137*, 1504–1509.

---

---

# *Annexe*

---

---

## Annexe I

Tableau (1) : Les données nucléaires utilisées dans ce travail pour la technique d'INAA

<b>Elément</b>	<b>Nucléide</b>	<b>E(keV)</b>	<b>Période (jour)</b>
<b>As</b>	As76	559,1	1,08
<b>As</b>	As76	657,1	1,08
<b>Au</b>	Au198	411,8	2,69
<b>Ba</b>	Ba131	496,3	11,50
<b>Br</b>	Br82	554,3	1,47
<b>Br</b>	Br82	698,4	1,47
<b>Br</b>	Br82	776,5	1,47
<b>Ca</b>	Ca47	1297,1	4,54
<b>Ce</b>	Ce141	145,4	32,50
<b>Co</b>	Co60	1173,2	1 924,06
<b>Co</b>	Co60	1332,5	1 924,06
<b>Cr</b>	Cr51	320,1	27,70
<b>Cs</b>	Cs134	604,7	753,65
<b>Cs</b>	Cs134	795,9	753,65
<b>Fe</b>	Fe59	1099,3	44,50
<b>Fe</b>	Fe59	1291,6	44,50
<b>K</b>	K42	312,7	0,52
<b>K</b>	K42	1524,7	0,52
<b>La</b>	La140	487,02	1,68
<b>La</b>	La140	815,8	1,68
<b>La</b>	La140	1596,2	1,68
<b>Na</b>	Na24	1368,6	0,62
<b>Rb</b>	Rb86	1077	18,63
<b>Sc</b>	Sc46	889,3	83,79
<b>Sc</b>	Sc46	1120,5	83,79
<b>Se</b>	Se75	121,1	119,78
<b>Se</b>	Se75	136	119,78
<b>Se</b>	Se75	264,7	119,78
<b>Se</b>	Se75	279,5	119,78
<b>Se</b>	Se75	400,7	119,78
<b>Sm</b>	Sm153	103,2	1,93
<b>Th</b>	Pa233	300,1	26,97
<b>Th</b>	Pa233	311,9	26,97
<b>Zn</b>	Zn65	1115,5	244,26

## Annexe II

Les spectres de raies gamma collectés obtenu par analyse d'activation neutronique de courte, moyenne et longue période des échantillons de *Teucrium polium* L, *Matricaria chamomilla* L et *Mentha pulegium* L

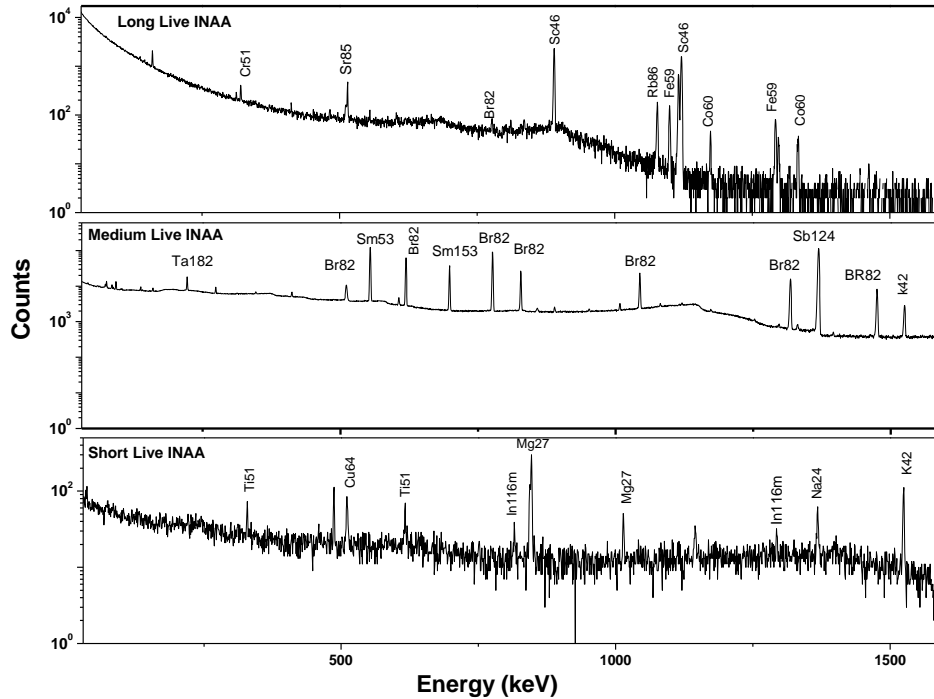


Figure S1. Les spectres de raies gamma de courte, moyenne et longue période de *Matricaria chamomilla* L

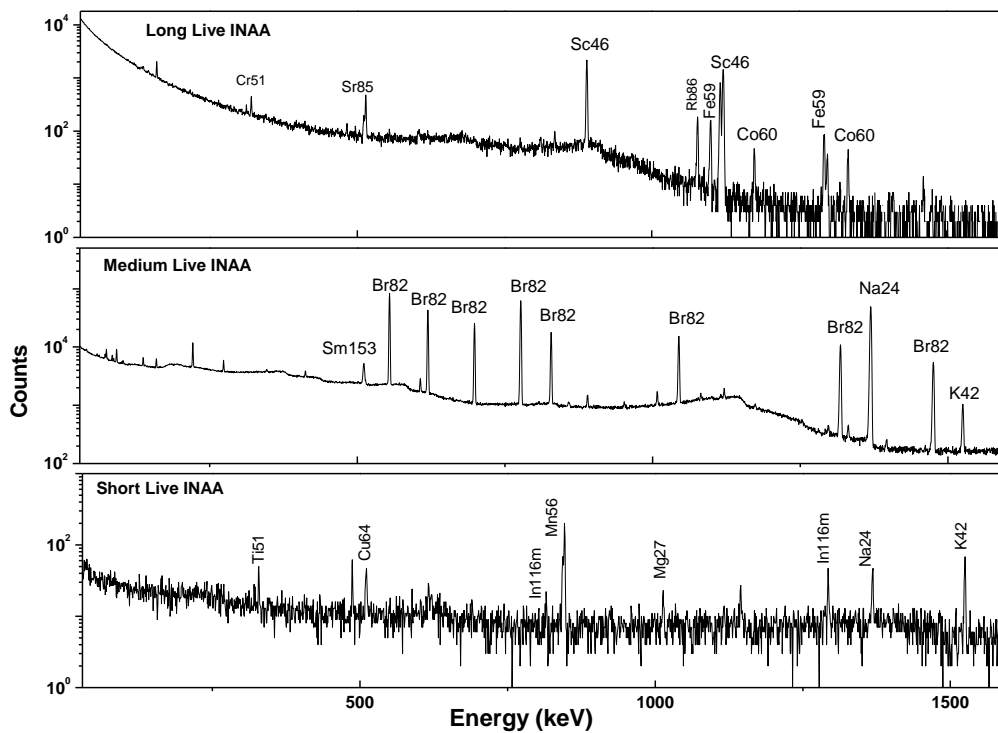


Figure S2. Les spectres de raies gamma de courte, moyenne et longue période de *Teucrium polium* L



---

*Publications et communications  
internationales*

---



# Certificate of Attendance

The Chairman of the Conference's Organizing Committee ascertains that:

**MESSAOUDI Mohammed**

has Attended the Second International Conference on Radiations and Applications (*ICRA-2019*) which has been held in Algiers, from 28 to 30 of October 2019, with a communication entitled " Liquid-liquid extraction of Radiochemical separation for the determination of selenium in Mentha pulegium L.: Toxicity and health study".

Co-authors: Samir Begaa, Lilya Hamidaton



The Chairman of the Organizing Committee  
**Prof. Mohamed BELGAID**



People's Democratic Republic of Algeria  
Ministry of Higher Education and Scientific Research  
University of Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued  
Faculty of Technology



**International Seminar on Green Chemistry and Sustainable Engineering (ISGCSE)**

## CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This Certifies That

**Mohammed Messaoudi**

Presented a poster communication at the first **International Seminar on Green Chemistry and Sustainable Engineering (ISGCSE)**

, organized from December 17-18, 2019 at the University of Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued, entitled:

"Antioxidant activity and phenolic compounds of Algerian *Mentha pulegium* L. Medicinal plant used traditionally for treatment of digestive system disorders"

**Co-author (s):** Hamza Ouakouak, Samir Begaa, Naima Benchikla Adel Benarfa, Mokhtar Benmohamed, Mohamed Amine Ferhat



**Chairman of ISGCSE 2019**  
Dr. Salah Eddine LAOUINI  
**International Seminar**  
**on Green Chemistry**  
**and Sustainable Engineering**  
GCSE-2019, December 17-18/2019