

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :

N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie Appliquée

*Par : HADJ BRAHIM Hafsa
BEN OUDINA Hamida*

Thème

**Activité antioxydante et antibactérienne
des différents extraits de *Cotula cinerea***

Soutenu publiquement le : 26 /06/2018 de 13:00h à 15:30h

Devant le jury

Mr. BELGHIT Saïd	Maître de Conférences B	Univ. Ghardaïa	Président
M^{lle}. TELLI Alia	Maitre de Conférences B	Univ. Ghardaïa	Encadreur
M^{lle}. DAREM Sabrine	Doctorante	Univ. Annaba	Co- Encadreur
M^{lle}. BELABBASSI Ouarda.	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Examineur

Année universitaire 2017/2018

Dédicace

Je m'incline devant Dieu tout puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé la franchir

Je le dédie à toutes les personnes qui me sont chères :

 *A MES PARENTS je leurs exprimes tout le respect et l'amour que j'ai pour leurs témoigner ma reconnaissance pour tous les efforts et sacrifices qui ont entrepris pour me voir ce que je suis*

 *Ma chère sœur: SALMA Ce qui me soutient au cours de ma vie.*

 *Mes chers frères: ELHACHMI. ABDERRAHMEN. ABDELDJALIL .AKRAM.*

 *MA GRAND-MERE que j'estime beaucoup, Qui m'ont accompagnée par leurs douaa*

 *Toute la famille BEN OUDINA et BENGHANIA; mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines.*

 *Mes spéciales dédicaces pour mon binôme HAFSA et toute sa famille.*

 *A mes amies: IMÉN, AMEL, MOUNISSA. WARDA. WAHIBA. SABRINE SABAH, MERIEM, SALIMA, NACIRA ET ABIR.*

 *À tous les personnels de laboratoire de polyclinique EL ATTEUF (AMIAISSA .TAYAB. BAKIR, ZINEB .RACHIDA. ET AICHA)*

 *À tous mes Profs Durant ces longues années d'études, en spécifique à M. TELLI.*

 *A tous les étudiants de la promotion BIOCHIMIE APPLIQUEE 2018.*

 *Et à tous ceux que j'aime*

BEN OUDINA HAMIDA

Dédicace

Je dédie ce travail :

 *A MES CHERS PARENTS*

AUX PRUNELLES DE MES YEUX

Maman, Papa je ne saurais vous remercier pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mes premiers pas dans la vie jusqu'au jour d'aujourd'hui pour vos sacrifices et pour la confiance que vous me portez. J'espère être à la hauteur de vos attentes. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive

 *A mon chère FRÈRE Aissa*

 *A mes chères SOEURS, Aicha, Badia, Fatima, Biya, Amina les vedettes du théâtre de ma vie en témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès*

 *A mes neveux Bakir, Lokman, Omar lamine*

 *A mes nièces Assia, meriem, Yamma, Rahima*

 *A ma grande Mère pour son doaa*

 *A ma grande famille chacun en son nom pour leurs encouragements*

 *A toutes mes professeurs (primaire, moyen, secondaire) et de l'enseignement supérieur. S'ipiciallement Mr Hadj mohamed Belhadj, et Mr Hadj Aissa Hadj Omar*

 *Au chef de laboratiore des analyses médicale de polyclinique Elatteuf et mes collègues Bakir, Zineb, Aicha*

 *A toutes mes amies chacune en son nom pour leur soutien moral, leurs amours et leurs soins*

 *A mon Binom Hamida*

 *A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mon coeur et de ma pensée*

HADJ BRAHIM HAFSA

Remerciements

Nous remercions les plus profonds et inexprimables, s'adressent avant tout à ALLAH le tout puissant, de nous avoir accordé la force, la santé et le courage afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

*Nous exprimons nos sincères remerciements à Mr **BELGHIT Said**, Maître de conférences B, au département de la Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Ghardaïa, pour avoir accepté de présider le jury de notre mémoire.*

*Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à notre encadreur, **Dr. TELLI Alia**, Maître de Conférences B, au département de la Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Ghardaïa, qui a mis toute sa compétence à notre disposition, pour ces directives et Conseils judicieux et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce travail.*

*Nos sincères remerciements vont également à M^{elle} **DAREM Sabrina**, Co-promotrice de ce mémoire, Doctorante à l'Université Badji Mokhtar-Annaba. Son aide et sa disponibilité ont été des atouts précieux.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à M^{elle} **BELABASSI Ouarda**, Maître assistant A, au département de la Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Ghardaïa, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce travail.*

*Un grand merci est adressé aux techniciens de laboratoire : **MESITFA Nouredine**, **BEN HAMADI Hicham**, **CHIKH BELKOUZ**, **MOULAY Ali**, **ZAHOUINI Ahlem** et **Imene**.*

Un grand merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, particulièrement nous collègues de promotion de Master Biochimie appliquée (2018).

Activités anti-oxydante et antimicrobienne des différents extraits de *Cotula cinerea*

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source riche et diversifiée des molécules bioactives, dotées de nombreuses activités biologiques. Pour cela, la présente étude vise à évaluer l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne des extraits de la partie aérienne de *Cotula cinerea*, espèce de la famille des Asteraceae qui a des propriétés médicinales très reconnues couramment utilisée dans la médecine populaire de la région de Ghardaïa. L'extraction des principes actifs a été réalisée selon les modes traditionnels de préparation (décoction et infusion) et la macération hydroéthanolique (éthanol/eau : 80/20 : v/v). L'analyse qualitative des différents extraits a mis en évidence la présence des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins, des saponines, des stéroïdes et des terpénoïdes. La quantification de certaines classes des composés phénoliques a montré la richesse de la décoction en polyphénols totaux ($28,51 \pm 2,46$ mg EAG/g), en flavonoïdes ($12,94 \pm 1,60$ mg ER/g) et en tanins condensés ($7,61 \pm 0,93$ mg EC /g). Le taux le plus important des acides phénols est enregistré pour l'extrait hydroéthanolique qui est égal à $8741,12 \pm 372,96$ µg EAC/g. L'activité antioxydante est évaluée par trois tests à savoir : test à l'ABTS, la capacité réductrice de fer et blanchissement du β-carotène. L'extrait hydroéthanolique présente le pouvoir antioxydant le plus important à piéger le radical cation $ABTS^{•+}$ ($CI_{50} = 4,52 \pm 0,18$ µg/ml), à réduire le fer ($CI_{50} = 60,04 \pm 1,56$ µg/ml) et à inhiber le blanchissement du β-carotène ($CI_{50} = 32,56 \pm 4,00$ µg/ml). L'évaluation de l'activité antibactérienne est effectuée par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé et par micro-dilution en milieu liquide. Les résultats obtenus ont montré que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les souches sensibles à l'action de l'extrait hydroéthanolique avec des zones d'inhibition dépassant 14 mm et des CMI de l'ordre de 0,93 mg/ml et 1,89 mg/ml respectivement. Les extraits de la décoction et de l'infusion sont moins actifs sur les trois souches testées.

Mots clés: *Cotula cinerea*, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of *Cotula cinerea*

Abstract

Medicinal plants are a rich and diversified source of bioactive molecules, endowed with numerous biological activities. The present study aims to evaluate the antioxidant activity and the antibacterial activity extracts from the aerial part of *Cotula cinerea* species of the family Asteraceae that have medicinal properties very commonly recognized in folk medicine in the Ghardaia region. Thus, the extraction of the active ingredients was carried out according to the traditional methods of preparation (decoction, infusion) and hydroethanol maceration (ethanol/water: 80/20: v/v). The qualitative analysis of the various extracts revealed the presence of polyphenols, flavonoids, tannins, saponins, steroids and terpenes. The quantitative analysis based on the determination of total polyphenols, flavonoids, condensed tannins, which are more abundant in the decoction extract with contents of 28.51 ± 2.46 mg EAG/g, 12.94 ± 1.60 mg ER/g, 7.61 ± 0.93 mg EC/g respectively. The hydroethanolic extract is the richest in phenol acid with content of 8741.12 ± 372.96 μ g EAC/g. The antioxidant activity is evaluated by three assays such as ABTS assays, the reducing capacity of iron and β -carotene bleaching. The hydroethanolic extract presents the most important antioxidant potency: of trapped radical cation $ABTS^{+}$ ($IC_{50} = 4.52 \pm 0.18$ μ g/ml), in the iron reducing capacity ($IC_{50} = 60.04 \pm 1.56$ μ g/ml) and a very high β -carotene bleach inhibition capacity ($IC_{50} = 32.56 \pm 4.00$ μ g/ml). The antimicrobial activity was evaluated by the disk diffusion method in agar medium and by micro-dilution in a liquid medium. The obtained results showed that *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are the sensitive strain to the action of the hydroethanolic extract with zones of inhibition exceeding 14 mm and MIC of the order of 0.93 mg/ml and 1.89 mg/ml respectively. The extracts of the decoction and infusion are active less on the three tested strains.

Key words: *Cotula cinerea*, phenolic compounds, antioxidant activity, antibacterial activity.

الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا لمختلف مستخلصات نبتة *Cotula cinerea*

الملخص

تعتبر النباتات الطبية مصدر غني ومتنوع للجزيئات النشطة حيويًا، من أجل هذا تهدف هذه الدراسة لتقييم النشاط المضاد للأكسدة والنشاط مضاد البكتيريا للمستخلصات النباتية للجزء الهوائي للنبتة (*Cotula cinerea*) نوع من عائلة النجميات ذات الخصائص الطبية المعترف بها بها على نطاق واسع عادة ما تستخدم في الطب الشعبي في منطقة غرداية، تم استخراج المكونات الفعالة للنبتة وفقا للأساليب التقليدية للإعداد (الغلي، ، النقع. النقع الكحولي: الإيثانول والماء المقطر / 20 (80). وكشف التحليل النوعي لمختلف المستخلصات وجود البوليفينول ، الفلافونويد ، التانينات ، السابونين ، الستيرويدات والتيريبيانات . أظهر التقدير الكمي لفئات معينة من المركبات الفينولية ثراء مستخلص الغلي بالبوليفينول الكلي $(28,51 \pm 2,46)$ mg EAG/g، و الفلافونيدات $(12, 94 \pm 1.60)$ mg ER / g) وكذا الصباغ مكثف (7.61 ± 0.93) mg EC / g). تم تسجيل أكبر كمية من أحماض الفينول لمستخلص النقع الكحولي والتي تقدر (8741.12 ± 372.96) µgEAC / g). تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستعمال ثلاث اختبارات هي اختبار ABTS ، والقدرة الإرجاعية للحديد و تبييض B كاروتين. حيث أظهر مسخلص النقع الكحولي أفضل قدرة مضادة للأكسدة : لاحتجاز الكاتيون الراديكالي $(ABTS \cdot +)$ ب $(CI_{50}=4,52 \pm 0.18)$ µg/ml) ، و أفضل نشاط مرجع الحديد $(CI_{50}=60,04 \pm 1,56)$ µg/ml) وأظهر نفس المستخلص تثبيط قدرة تبييض β كاروتين $(CI_{50}=32,56 \pm 4,00)$ µg/ml). تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا بطريقة إنتشار القرص في وسط أغار و طريقة التخفيف الجزئي في الوسط السائل و أظهرت النتائج أن سلالة البكتريا *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* حساسة لعمل مستخلص الهيدروإيثانولي مع مناطق تثبيط تتجاوز 14 مم وتركيز أقل تثبيط من 0,93 mg/ml و 1,89 mg/ml على التوالي. مستخلصات الغلي والنقع هي أقل نشاطا على السلالات الثلاث التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: *Cotula cinerea* ، مركبات الفينول ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للجراثيم .

Tables des matières

Dédicace	
Remerciements	
Résumé	
Abstract.....	
المخلص.....	
Tables des matières.....	
Liste des abréviations	
Liste des tableau	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I-Matériel et méthodes	9
I.1. Matériel.....	9
I.1. 1.Matériel végétal	9
I.1.2. Souches bactériennes testés	10
I.2 Méthodes	11
I.2.1.Extraction.....	11
I.2.2. Détermination du rendement d'extraction	14
I.2.3. Criblages phytochimique	14

I.2.4. Quantification des composés phénoliques	15
I.2.5. Evaluation des activités biologiques	18
I.2.6. Analyse statistique	22
Chapitre II-Résultats et discussion	24
II.1. Criblage phytochimique	24
II.2. Rendement d'extraction	25
II.3. Analyses quantitatives.....	27
II.3.1. Teneur en polyphénols totaux.....	27
II.3.2. Teneur en flavonoïdes	28
II.3.3. Teneur en acides phénols.....	29
II.3.4. Teneur en tanins condensés	31
II.4 .Activités biologiques.....	32
II.4.1. Activité anti-oxydante	32
II.4.2. Activité antibactérienne	39
Conclusion.....	44
Références bibliographiques.....	46
Annexes	56

Liste des abréviations

Abréviations	Signification
ABTS :	Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3- sulfonique)
ANOVA :	Analyse de la variance
FRAP:	<i>ferric reducing ability of plasma</i>
CI₅₀ :	Concentration inhibitrice de 50% de radical
p/v :	Poids par volume
TPTZ	2,4,6- Tris(2-pyridyl)-s-triazine
BHT :	Buthylhydroxytoluène
EAC :	Equivalent d'acide caféique
EAG :	Equivalent d'acide gallique
EC :	Equivalent de catéchine
ER :	Equivalent de rutine
ERO:	Espèces réactives oxygénées
ET :	Equivalent de trolox
EtOH	Ethanol
RL :	Radicaux libres

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Différentes réactions de criblage photochimique	15
2	Résultats du criblage phytochimique des différents extraits de <i>Cotula cinerea</i>	24
3	CI ₅₀ (µg/ml) du test ABTS des différents extraits de <i>C.cinerea</i>	33
4	CI ₅₀ (µg/ml) du test FRAP des différents extraits de <i>C.cinerea</i>	36
5	CI ₅₀ du test de blanchissement du β-carotène des différents extraits de <i>Cotula cinerea</i>	38

Liste de figures

N°	Titre	Page
01	Figure <i>Cotula cinerea</i>	9
02	Schéma de protocole de la décoction de <i>Cotula cinerea</i>	12
03	Schéma de protocole de l'infusion de <i>Cotula cinerea</i>	13
04	Schéma de la macération hydroéthanolique de <i>Cotula cinerea</i>	14
05	Principe réactionnel du test FRAP	19
06	Rendement d'extraction de différents extraits de <i>Cotula cinerea</i>	26
07	Teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>Cotula cinerea</i>	27
08	Teneur des flavonoïdes des différents extraits de <i>Cotula cinerea</i>	28
09	Teneur en acide phénols dans les extraits de <i>Cotula cinerea</i>	30
10	Teneurs en tanins des différents extraits de <i>Cotula cinerea</i>	31
11	Activité anti-oxydante des différents extraits de <i>Cotula cinerea</i> déterminée par le test ABTS	33
12	Activité anti-oxydante des différents extraits de <i>Cotula cinerea</i> déterminée par le test FRAP .	35
13	Pourcentage d'inhibition de blanchissement du β -carotène par différents extraits de <i>Cotula cinerea</i>	37
14	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des différents extraits de <i>Cotula cinerea</i>	39
15	Concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents extraits de <i>Cotula cinerea</i>	41
16	Inhibition de la croissance d' <i>E Coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> par différentes concentrations de l'extrait hydroéthanolique de <i>C. cinerea</i>	42

Introduction

Introduction

Depuis la nuit des temps, l'homme s'est employé à exploiter la nature pour ses besoins médicaux et alimentaires, et au cours du développement des anciennes civilisations l'exploitation des plantes à usage médicinale (Rhattas *et al.*, 2015).

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (Iserin, 2001).

La médecine par les plantes est l'une des plus vieilles médecines du monde. Elle représente une alternative intéressante pour traiter et soigner sans créer de nouvelles maladies. Malgré le développement phénoménal de l'industrie pharmaceutique et chimique, l'intérêt populaire pour la médecine par les plantes n'a jamais cessé d'évoluer (Belkacem, 2009).

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Farnsworth *et al.*, 1986).

Les plantes médicinales constituent un groupe numériquement vaste et économiquement important, elles demeurent encore une des formes de médecine la plus répandue dans les pays en voie de développement (Bahorun, 1997).

Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (Boudjouref, 2011)

Les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à leur richesse en métabolites secondaires (Nedjmi et Soussou, 2014). Ces derniers constituent un groupe de molécules qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que dans la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les

pathogènes, comme agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (Judd *et al.*, 2002).

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Allam et Ayad, 2015).

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire qui dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzène. Les composés phénoliques sont très répandus dans le règne végétal; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'arôme, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Ces composés représentent 2 à 3% de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% et même d'avantage. Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins, lignines). Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes (Walton et Brown, 1999).

Le terme terpénoïdes désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone...etc.). Ce sont des substances du métabolisme secondaire qui dérivent des isoprénoïdes dont certains interviennent dans la photosynthèse, ainsi que plusieurs hormones végétales sont de structure terpénique. Ce sont des produits hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaînes ouverte formées de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta-carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyle butadiène, appelées unités isopréniques (Hopkins, 2003).

La caractérisation phytochimique et l'étude des activités biologiques des espèces végétales sahariennes constitue aujourd'hui l'un des plus importants défis pour la recherche scientifique au niveau des plantes médicinales (Iount-Florin, 2016).

En effet, on peut estimer que le métabolisme secondaire biosynthétise des quantités considérables de composés bioactifs, destinés à assurer le développement et la continuité de ces espèces, notamment leur survie dans ces conditions sahariennes précaires. Les propriétés pharmacologiques des extraits de plantes sahariennes peuvent apporter des bénéfices dans la

guérison de certaines maladies microbiennes ou prolifératives ou également contribuer au développement de certaines activités antioxydantes. L'étude des propriétés toxiques vise donc à enrichir la connaissance du potentiel bioactif des plantes sahariennes (Ionut-Florin , 2016).

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités des dérivés réactifs de l'oxygène. Une forte production de ces réactifs entraînent le stress oxydatif qui peut être défini comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules (Nafla *et al.*, 2005 ; Iacopini *et al.*, 2008).

Le stress oxydant a été décrit réellement comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative, inflammation, diabète mellitus et vieillissement (Uttara *et al.*, 2009). Ces dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur de divers biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort de cellules (Moonet Shibamoto, 2009).

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Haloun et Hamoudi, 2015).

Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables, leur structure comprend un électron célibataire qu'il cherche à appairer en attaquant et en endommageant les molécules voisines. L'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxynitrite ($ONOO^-$) (Haton, 2005).

Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydant en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (Meddour *et al.*, 2013).

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Ardestantet Yazdanparasty, 2007).

Les plantes spontanées développées sur des milliers d'années s'adaptent et s'harmonisent parfaitement avec toutes les conditions ; notamment en milieux arides. En Algérie; les milieux arides offrent des opportunités exceptionnelles pour l'évaluation et la compréhension des mécanismes impliqués dans la diversification et l'adaptation des plantes en relation avec l'évolution de leur environnement (Amirouche et Misset, 2009).

L'Algérie, pays connu pour sa biodiversité, dispose d'une flore particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques. Ce potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques et condimentaires, est peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique. A cet effet, il constitue à notre avis, une source non négligeable de recherche de substances naturelles (Quezel, 1963).

Les conditions climatiques méditerranéennes de l'Algérie favorisent aussi bien le développement des plantes médicinales spontanées. La température et les précipitations sont des facteurs climatiques de toute première importance car elles contrôlent l'ensemble des phénomènes métaboliques et conditionnent la répartition de la totalité des espèces et des communautés d'être vivant dans la biosphère (Allam et Ayad, 2015).

La superficie du Sahara est de 8 millions Km² ; il est le plus grand des déserts, mais également le plus expressif et typique par son extrême aridité, c'est-à-dire celui dans lequel les conditions désertiques atteignent leur plus grande âpreté (Toutain, 1979 ; Ozenda, 1983). En fait le Sahara est le plus vaste, le plus aride et le plus chaud des déserts. Il est caractérisé par des conditions édapho-climatiques très contraignantes à la survie spontanée des êtres vivants. La grande majorité de la végétation au désert adapté aux conditions désertiques les plus rudes, caractérisées par de fortes chaleurs et des pluviométries faibles (Chehema, 2005).

les espèces végétales désertiques vivent généralement en conditions climatiques draconiennes et par conséquent, elles possèdent un système d'adaptation très particulier aux conditions environnementales sahariennes (Le Houérou, 1969).

Cette flore saharienne, est très remarquable par son adaptation à un climat sec, à un sol salé (Trabut et Mares, 1906).

Les familles les plus importantes sont les Composées (Asteraceae), les Graminées (Poaceae), les Chénopodiacées (Amaranthaceae) et les Labiées (Lamiaceae) (Ouled el hadj *et al*, 2003).

La famille des *Asteraceae* est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 13 000 espèces réparties en 1500 genres (Bremer, 1994). *Asteraceae*, aster (qui est un terme grec, signifiant «l'étoile» en référence à la forme des fleurs), la marguerite, ou la famille du tournesol, est la plus grande famille d'usines vasculaires, avec près de 1500 genre et plus de 23000 espèces décrites dont 750 endémiques (Gaussen et Leroy, 1982). Cette famille présente des caractères morphologiques divers : herbes annuelles ou vivaces, plus rarement des arbustes, arbres ou plantes grimpantes et quelques fois, plantes charnues (BONNIER, 1934). Généralement se sont des plantes herbacées à feuilles isolées (Crete, 1965).

Une large variété de produits naturels caractérise les espèces de la famille Asteraceae, les plus rencontrés sont les sesquiterpènes et les sesquiterpènes lactones, les diterpènes et les triterpènes, les flavonoïdes, les acides phénols,...etc. Comme toutes les espèces appartenant à la famille des Asteraceae, les composés terpéniques sont doués de plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques telles que les activités cytotoxique, anti-tumorale, antimicrobienne et phytotoxique (Rodrigue *et al*, 1976).

La famille des Asteraceae contient plusieurs espèces connues sous le nom de plantes médicinales populaires, elle est cultivée grâce à leur valeur alimentaire et pharmacologique. Les espèces constituant cette famille exercent de nombreux effets thérapeutiques : anti-inflammatoire, analgésique et antiseptique (Tadrent *et al.*, 2014). Parmi ces plantes, nous citons *Cotula cinerea* L. nommée aussi *Brocchia cinerea* Del. et appeler localement « El- Gartoufa » (Bouziane, 2002).

Cotula cinerea une petite plante annuelle d'aspect laineux de 5 à 15 cm entièrement tomenteuse. Les tiges sont dressées ou diffuses. Les feuilles et les tiges vert-blanchâtre sont recouvertes de petits poils denses qui forment comme un manteau de velours. Les feuilles petites, entières épaisses et veloutées sont découpées en trois à sept dents ou 'doigts' qui se présentent comme une main légèrement refermée. Les fleurs sont de petits demi pompons jaune d'or au bout d'une

courte tige, c'est une espèce Saharo-arabique commune dans tout le Sahara et les lieux sablonneux désertiques (Quézal et Santa, 1963).

Cotula cinerea est citée parmi les plantes médicinales les plus utilisées par la population locale saharienne, en raison de ses vertus médicinales (Abdenbi, 2014). Elle est utilisée pour traiter les douleurs d'estomac, la fièvre, les maux de tête et migraines, la toux et l'inflammation des articulations (Chuikh et Chefrou, 2014). Elle présente des propriétés biologiques très variées, citons entre autres l'activité : anti-inflammatoire, analgésique, antiseptique, antibactérienne, antipyrétique (Benhammou, 2012). Elle est très appréciée par les habitants des régions sahariennes, ils l'ajoutent à leur boisson de thé vert pour la parfumer aussi elle est additionnée à certaines nourritures pour rehausser la saveur (Maiza *et al*, 1993)

Cette plante contient de nombreux composés chimiques avec des avantages thérapeutiques tels que les flavonoïdes (Dendougut *et al*. 2012), les terpènes et les huiles essentielles qui donnent une spécificité des odeurs (Markouk *et al.*, 1999).

Markouk *et al.*(1999)et Amarouch *et al*, (1998) ont signalé que *Cotula cinerea* est très riche en sesquiterpènes lactones, sesquiterpènes, coumarines et flavonoïdes.

Parmi les flavonoïdes isolés à partir de cette plante on peut citer: kaempféritine, quercétine, quercétrine, kaempférol, lutéoline, lutéoline 6-OH-7-O- β -D-glucoside, apigénine 7-O- α -L-rhamnoside, quercitine 3-O- β -glucoside et 5,3',4'-trihydroxy-3,6,7-triméthoxy flavone,...etc. (El sayed, 1987)

Les extraits des feuilles de *Cotula cinerea* sont efficaces contre les champignons microscopiques pathogènes, ils ont montré une activité insecticide vis-à-vis des larves d'insectes (Bouziane, 2002).

L'extraction des principes actifs des plantes est réalisée par différentes méthodes en utilisant des solvants polaires comme l'hydroéthanol (Markouk *et al* 1999b). Pour cela, cette étude vise à valoriser une espèce saharienne endémique en évaluant certaines activités biologiques de ses différents extraits obtenus dans les mêmes conditions que les modes traditionnels de préparation (décoction et infusion). L'efficacité de ces méthodes ou de solvant utilisé est évaluée par la quantification de certaines substances bioactives et l'évaluation de leur pouvoir antioxydant et antibactérien.

Dans ce contexte, cette étude vise à comparer les modes traditionnels de préparation (décoction et infusion) avec la macération hydroéthanolique de *Cotula cinerea* en se basant sur la quantification des composés phénoliques et l'évaluation des activités biologiques (anti-oxydante et antibactérienne).

Ce travail comporte deux chapitres précédés par une introduction :

- Le premier chapitre est consacré à la présentation du matériel végétal étudié et les différentes méthodes du travail expérimental ainsi que le matériel utilisé.
- Le deuxième chapitre sera réservé à la présentation de tous les résultats obtenus dans notre étude, suivi d'une discussion.

Enfin, à l'issue de ce manuscrit, une conclusion générale sera présentée portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achèvent ce travail.

Chapitre I-Matériel et méthodes

Chapitre I-Matériel et méthodes

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

I.1.1.1. Choix de l'espèce étudiée

Cotula cinerea Del. C'est une plante saharienne spontanée très utilisée par la population locale pour aromatiser les préparations alimentaires (aromatiser le thé et le lait), en cosmétologie et surtout en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies telles que la colique, la diarrhée, la toux et aussi pour des applications broncho-pulmonaires. Les études expérimentales réalisées sur cette espèce montrent qu'elle a des activités biologiques très intéressantes (anti-inflammatoire, antiseptique, analgésique, antibactérienne, fébrifuge et larvicide).

I.1.1.2. Description botanique

Elle contient des petites feuilles, entières, tridentées au sommet, laineuses blanchâtres, épaisses, divisées dans leur partie supérieure en 3 à 5 dents obtuses; tiges de 10-40 cm, couchées puis redressées; capitules de 6 à 10 mm de diamètre, à involucre laineux à fleurs toutes tubuleuses, brunes en boutons puis jaune d'or lorsqu'elles s'ouvrent (Fig. 01). Très commun dans tout le Sahara, notamment dans les sols un peu sablonneux (ozenda.1993).



Figure 1: *Cotula cinerea* Del.(Bouziane ., 2002)

I.1.1.3. Position systématique

La détermination de la position taxonomique de l'espèce végétale *Cotula cinerea* Del. Dans la classification systématique botanique a été faite selon (Quézel et Santa, 1963). Elle est la suivante :

- **Embranchement** : Phanerogame ou Spermaphyta
- **Sous embranchement** : Angiospermae
- **Classe** : Eudicots
- **Sous classe** : Asterids
- **Ordre** : Asterales
- **Famille** : Asteraceae ou Composées
- **Genre** : *Cotula*
- **Espèce** : *Cotula cinerea* Del., syn: *Brocchia cinerea* (Del.)
- **Nom vernaculaire**: Gartoufa

I.1.1.4. Répartition géographique

L'espèce *Cotula cinerea* est très rencontrée dans tout le Sahara, elle pousse dans les ergs et les sols peu ensablés. Dans la région Ghardaïa elle est retrouvée à Oued Zelfana, Oued M'zab, (Zabeirou ,H. 2001) Où elle est connue sous le nom de chouiha (ou parfois chihia). Où elle est connue sous le nom de Gartoufa D'après (Chahma et Djebar, 2008).

I.1.1.5. Echantillonnage

La partie récoltée pour cette étude est la partie aérienne de *Cotula cinerea* Del. La récolte est réalisée en février 2018 durant la période de floraison à oued Zelfana et oued M'zab dans la région de Ghardaïa (Sahara Septentrional Algérien).

I.1.2. Souches bactériennes testées

Les souches utilisées pour l'activité antibactérienne des différents extraits de *Cotula cinerea* sont : *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) et *Escherichia coli* (ATCC25922).

➤ ***Escherichia coli*** : est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires, elle peut provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers ainsi que diverses infections nosocomiales, initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, elle a acquis une résistance fréquente, surtout en milieu hospitalier (Nauciel, 2005)

➤ ***Staphylococcus*** : sont des coques à Gram+. Globalement, les infections à staphylocoques sont peu fréquentes et le plus souvent iatrogènes. Certaines souches de staphylocoques résistants à la pénicilline sont retrouvées lors d'infections ne répondant pas à la thérapeutique classique et dans ce cas une origine humaine est alors fortement suspectée (Hartmann, 1997) les staphylocoques peuvent être mis en évidence dans des infections articulaires, du cordon spermatique (après une castration), de l'utérus ou de plaies.

➤ ***Pseudomonas aeruginosa*** : est une bactérie Gram-négatif opportuniste vivant normalement à l'état saprophyte dans l'eau, les sols humides et les végétaux, mais qui peut également vivre à l'état commensale sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de divers animaux (Sabin, 2006). En milieu hospitalier il est à l'origine de surinfections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, etc.), et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées...). De même qu'il est phytopathogène avec beaucoup d'autres espèces du même genre (Leclerc et al. 1995).

I.2 Méthodes

I.2.1.Extraction

L'extraction des principes actifs de *Cotula cinerea* est effectuée selon les modes traditionnels de préparation (décoction et infusion) en plus de l'extraction par macération hydroéthanolique.

I.2.1.1. Décoction

Le matériel végétal est ajouté à un volume d'eau distillée avec un rapport p/v : 10/100, puis ce mélange est porté à ébullition pendant 5 min. Après un repos de 5 min, le mélange est filtré sur filtre Wattman n°1. Le filtrat obtenu est concentré par le rotavapor à 55 °C. l'extrait concentré est conservé à +4 °C jusqu'à son utilisation (la conservation ne dépasse pas 3 jours au max).

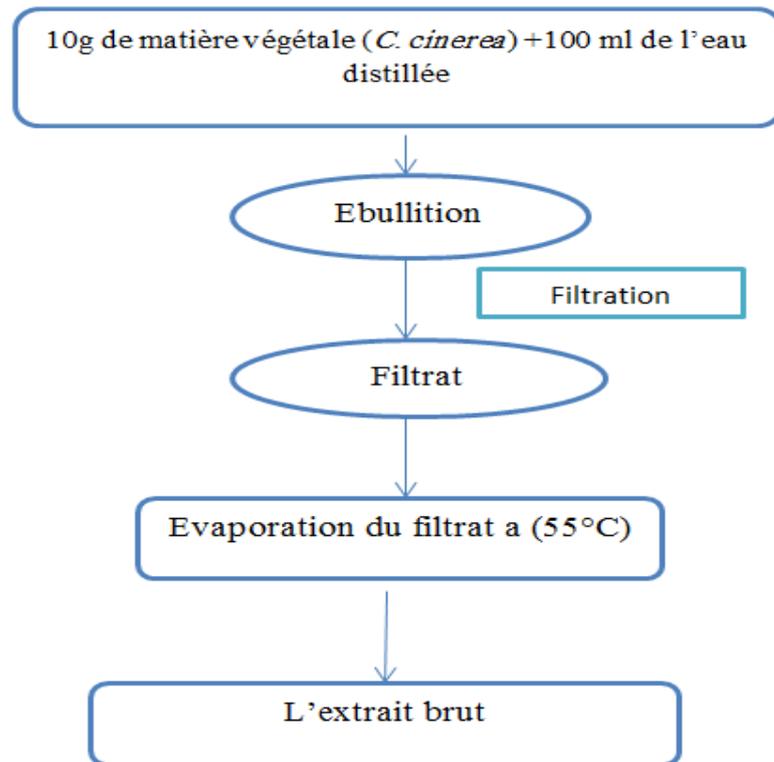


Figure 2 : Schéma de protocole de la décoction de *Cotula cinerea* Del.

I.2.1.2. Infusion

Une quantité de matériel végétal est additionnée à un volume de l'eau distillée portée à 100 °C (p/v : 10/100) pendant 5 min, puis ce mélange est filtré. Le filtrat obtenu est concentré par le rotavapor à 55 °C. L'extrait concentré est conservé à +4 °C jusqu'à son utilisation (la conservation ne dépasse pas 1 jour au max).

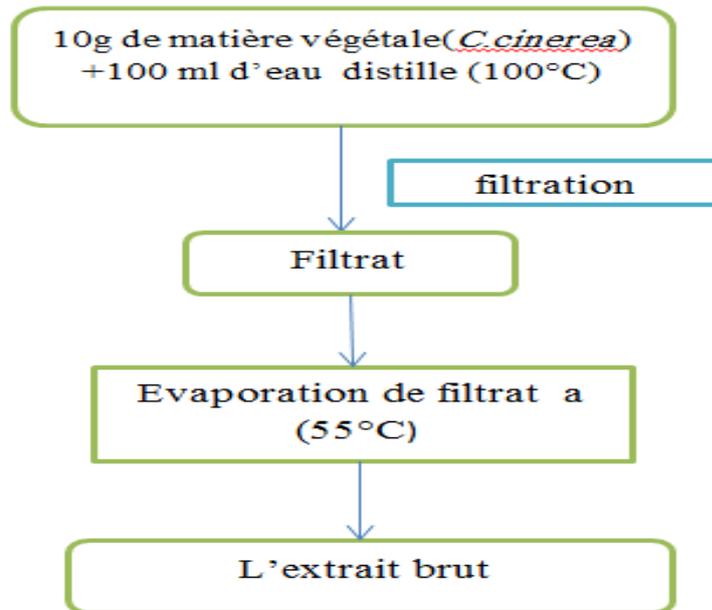


Figure 3 : Schéma de protocole de l'infusion de *Cotula cinerea* Del.

I.2.1.3. Macération

Pour la macération, 10 g de la plante est macéré dans 80 ml de éthanol et 20 ml de l'eau distillée pendant 24 heures à la température ambiante. L'extrait hydroéthanolique est récupéré à l'aide du papier filtre et l'opération est répétée trois fois pour épuiser le matériel végétal. Puis l'extrait obtenu est concentré en utilisant le rotavapor (Heidolph) à 40 °C jusqu'à l'élimination de l'éthanol. L'extrait concentré de couleur vert-noirâtre est conservé dans des flacons en verre fumé à +4 °C jusqu'à son utilisation.

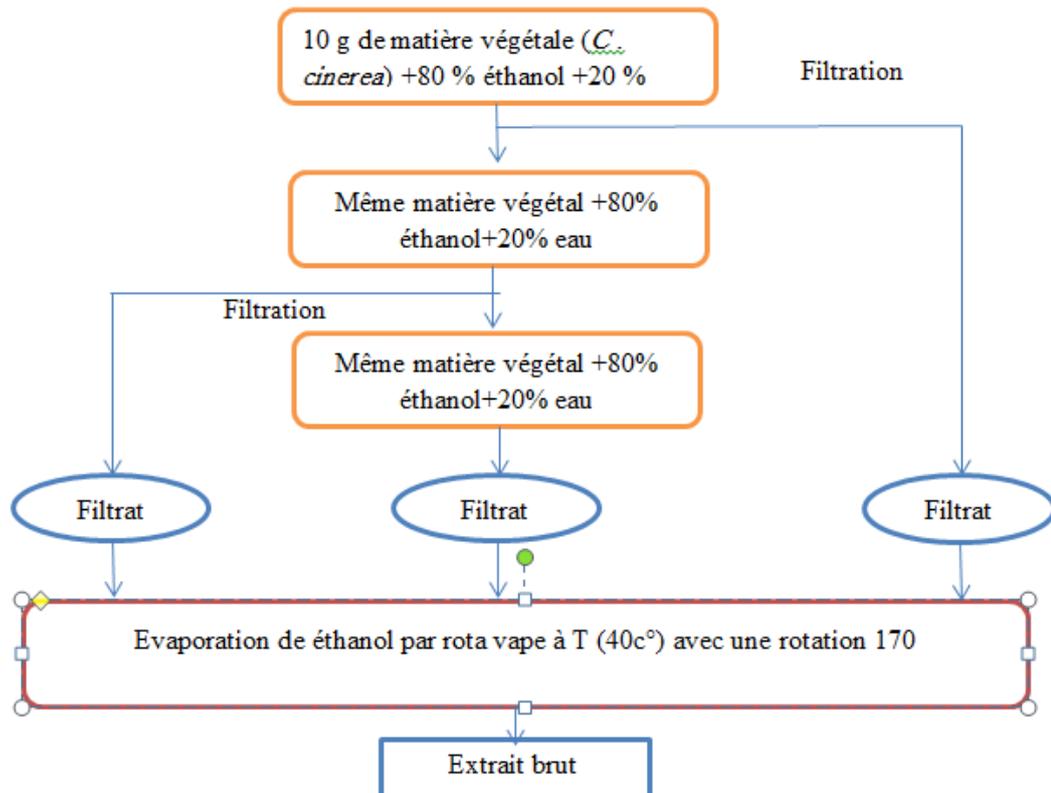


Figure 4 : Schéma protocole de la macération hydroéthanolique de *Cotula cinerea* Del.

I.2.2. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des différents extraits de *Cotula cinerea* est déterminé en utilisant la formule suivante:

$$R \% = (PEB/PMV) \times 100$$

Où

- **R :** Rendement
- **PEB :** Poids de l'Extrait Brut (g) après séchage
- **PMV :** Poids de Matière Végétale (g)

I.2.3. Criblages phytochimique

Ce teste consiste à détecter quelque composés chimiques existants dans les extraits de *Cotula cinerea* par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques. Ces dernières permettent de définir la présence ou non de quelques métabolites secondaires.

Tableau 1: Différentes réactions de criblage photochimique

Familles chimiques	Réactifs	Résultats	Références
Tanins hydrolysable	EtOH (50%) FeCl ₃	Coloration verte ou bleu noir	(Trease et Evans,1987)
Tanins catéchique	Formol (35%) HCl	Précipité rose claire	(Mibindzou, 2004)
Flavonoïdes	HCl (1%) - NH ₄ OH (2N) pH basique - Alcool Amylique - Mg (poudre)	Couleur jaune orangé	(Ribeau-Gayon,1968)
Alcaloïdes	Réactif de Mayer	Précipité blanc ou brun	(Ben Zahi,2001)
Stérols insaturés et Terpènes	CHCl ₃ et H ₂ SO ₄	Coloration verte	(Harborne,1998)
Saponosides	Solution aqueuse de la plante	Mousse	(Bruneton, 1999)
Coumarine	NaOH (10%)	Précipita jaune	(Diallc, 2000)
Quinone libre	NaOH (1%)	Précipita jaune	(Dohoi, 2004)
Composés réducteurs	Liqueur des Fehling	Précipité rouge- brique	(Bruneton, 1999)

I.2.4. Quantification des composés phénoliques

I.2.4.1. Dosage des polyphénols totaux

a. Principe

Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribereau -Gayon , 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximale est mesurée à 765 nm est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits de végétaux.

b. Mode opératoire

Pour le dosage des polyphénols totaux, la méthode consiste à prendre un volume de 1800 µl du réactif de Folin (10 fois dilué) à lequel sont ajoutés 40 µl d'échantillon testé. Après 5 min, 1200 µl d'une solution de carbonate de sodium (7,5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (50-800 µg/ml) et elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matériel végétal (mg EAG/g) (Ribéreau-Gayon, 1968).

I.2.4.2. Dosage des flavonoïdes

a. Principe

La quantification des contenu flavonoïque a été estimée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et le nitrite de sodium et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm. (Alyafi, 2007).

b. Mode opératoire

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par (Zhishen *et al.* 1999).

Une quantité de 1 ml de solution éthanolique de rutine à différentes concentrations (0-500 µg/ml) ou de 1 ml d'extrait dilué est ajoutée à 4 ml de l'eau distillée. Au temps zéro, 0,3 ml de nitrite de sodium (NaNO_2) (5 %) est ajouté au mélange. Après 5 min, 0,3 ml de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (10 %) est rajouté. Après l'incubation du mélange réactionnel pendant 6 min à la température ambiante, 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1M) sont additionnés. Le volume du mélange est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de l'espèce étudiée est exprimée en milligramme (mg) équivalents de rutine par gramme (g) du poids sec du matériel végétal (mg ER/g).

I.2.4.3. Dosage des acides phénols

a. Principe

Le test d'ARNOW (1937) tire son origine d'un dosage enzymatique de la 3,4-dihydroxyphényl-alanine-tyrosine intervenant dans la formation de la mélanine, et se base sur la variation de couleur du complexe formé. L'échantillon à traiter mis en présence d'un réactif de nitrite de sodium-molybdate de sodium en milieu acide se colore en jaune, puis en rouge, à la suite d'une élévation du pH. Le molybdate de sodium empêche une décomposition rapide de l'acide nitrique, qui se produit en présence de NaNO_3 , et l'acide chlorhydrique empêche le virage au rouge d'un éventuel précipité de mélanine, qui se produit dans le cas de solutions neutres ou basiques (Françoise, 1990).

b. Mode opératoire

L'estimation des acides-phénols est effectuée selon la méthode d'Arnov (Szauffer-Hadjrych, 2004). Un volume de 1 ml d'échantillon est mélangé avec 5 ml de l'eau distillée, puis 1 ml d'HCl (0,5 M), 1 ml de réactif d'Arnov [solution aqueuse de molybdate de sodium 10 (p/v) et nitrite de sodium 10% (p/v)] et 1 ml d'hydroxyde de sodium (1 M) ont été additionnés. Le volume du mélange réactionnel est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. La lecture de l'absorbance est faite à 490 nm par un spectrophotomètre UV-Visible. L'acide caféique a été utilisé comme référence pour la préparation de la courbe d'étalonnage avec des concentrations allant de 0 à 200 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats sont exprimés en μg équivalent d'acide caféique EAC/g de poids sec de matériel végétal.

I.2.4.4. Dosage des tanins condensés ou proantocyanidines

a. Principe

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui a une absorbance max à 510 nm (Schofield *et al.*, 2001).

b. Mode opératoire

Les quantités des tanins condensés sont estimées en utilisant la méthode de vanilline-HCl (Sun *et al.*, 1998).

Un volume de 0.2 ml de l'extrait brut est ajouté à 1 ml de la solution fraîchement préparée de vanilline 1 % (p/v) en acide acétique glacial et l'acide chlorhydrique concentré (98:2, v/v) et laissé réagir à la 30 °C pendant 20 min. L'absorbance à 510 nm est mesurée contre un blanc. La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids sec de matériel végétal (EC/g).

I.2.5. Evaluation des activités biologiques

Les activités anti-oxydante et antibactérienne des différents extraits de *Cotula cinerea* ont été évaluées en utilisant des tests appropriés.

I.2.5.1. Activité anti-oxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante est effectuée par trois tests à savoir : test ABTS, test FRAP et test de blanchissement du β -carotène.

I.2.5.1.1. Test d'ABTS

a. Principe

Cette méthode a été décrite pour la première fois par Miller and Rice-Evans (1993) puis améliorée en 1999. elle consiste à la réduction du radical-cation coloré (acide 2' 2 azobis 3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) connu sous le nom d'ABTS⁺. Le développement de sa concentration est suivi à 734 nm au cours de sa réaction avec les antioxydants

b. Mode opératoire

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $K_2S_2O_8$: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.

Un volume de 0,1 ml d'extrait de l'espèce étudiée à différentes concentrations (50.100.200.400.600.800 μ l) est mélangé à 3,9 ml de la solution du radical cation d'ABTS⁺. Le mélange est agité vigoureusement. La lecture de l'absorbance est effectuée à 734 nm après 6 min de la réaction. Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant le Trolox (acide carboxylique 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman) (0-500 μ M).(Kim *et al.*, 2003). Les résultats sont exprimé en IC50.

I.2.5.1.2. Test FRAP

a. Principe

L'essai FRAP (Ferric reducing antioxidant power) est réalisé selon la méthode décrite par Benzie & Strain (1996) avec quelques modifications (Jaitak *et al*, 2010). Cette méthode mesure le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité de réduire le tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en tripyridyl-triazine ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) (Fig. 5) mesurable par spectrophotométrie UV-vis à 593 nm.

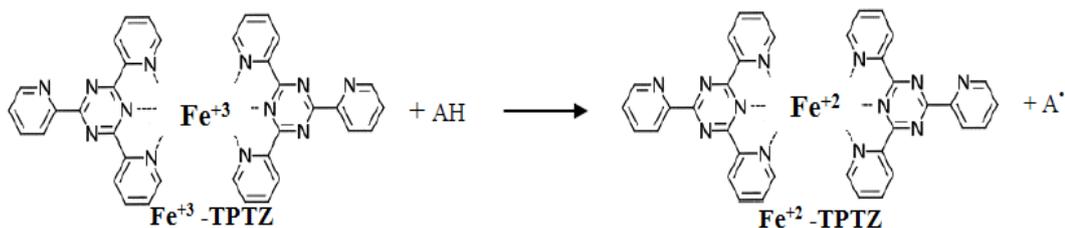


Figure 5: Principe réactionnel du test FRAP (Toure, 2015).

b. Mode opératoire

Le réactif FRAP est préparé à partir de tampon acétate (0,3 M, pH 3,6), de TPTZ (10 mM) en solution d'HCl (40 mM) et d'une solution de FeCl_3 (20 mM) en proportion de 10 : 1 : 1 (v/v) respectivement. Une quantité de 1 mg de chaque extrait sec est dissouts dans 5 ml d'éthanol aqueux (70%) puis dilué pour obtenir différentes concentrations (10, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$). un volume de 50 μl de ces solutions sont ajoutés à 1,5 ml de réactif FRAP. L'absorbance du mélange réactionnel est ensuite mesurée à 593 nm après 4 min par rapport à l'éthanol aqueux (70%) (Jaitak *et al.*, 2010). Le Trolox a été utilisé comme standard (0 à 800 μM) et les résultats sont exprimés en μM équivalent de Trolox. les résultat sont exprimé en IC50.

I.2.5.1.3. Test de blanchissement du β -carotène

a. Principe

Cette technique consiste à mesurer à 470 nm, la décoloration du β carotène résultant de son oxydation par les produits de la peroxydation de l'acide linoléique.

La dispersion de l'acide linoléique et du β carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50°C) de manière non spécifique en présence de l'eau oxygénée. L'addition d'antioxydantes purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de la décoloration du β -carotène (Koleva et al., 2001).

b. Mode opératoire

L'émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par la solubilisation de 0,5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de tween 60 ont été ajoutés. Le chloroforme a été complètement évaporé dans le rotavapor à 40 °C, ensuite 100 ml d'eau oxygénée ont été ajoutés, l'émulsion en résultant a été agitée vigoureusement. Un volume de 350 μ l d'extrait ou d'antioxydant de la référence (butylhydroxytoluène : BHT) [solubilisé dans le méthanol] ont été ajoutés à 2,5 ml de l'émulsion précédente. L'absorbance a été mesurée à 490 nm avant et après le traitement thermique avec des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures après 20 min durant les deux premières heures puis après 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h et 48 h. Les capacités anti-oxydantes des différents échantillons ont été comparées avec celles des antioxydants de référence (BHT). Le pourcentage d'inhibition du blanchissement du β -carotène est calculé par la formule suivante :

$$\text{IPL}\% = (\text{teneur en } \beta\text{-carotène après 2 heures de l'essai} / \text{teneur initiale de } \beta\text{-carotène}) \times 100$$

I.2.5.2. activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits de *Cotula cinerea* est effectuée selon deux méthodes : diffusion sur milieu gélosé et micro dilution.

I.2.5.2.1. Diffusion sur milieu gélosé (CA-SFM, 2010)

Cette technique consiste à utiliser la méthode d'antibiogramme pour mentionner la sensibilité ou la résistance du microorganisme vis-à-vis des extraits testés.

a. Réalisation d'une suspension

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on prélève une colonie bien isolée d'une culture de 18h à 24h, puis nous déchargeons la pipette dans un écouvillon qui contient de l'eau physiologique. La concentration de la suspension doit être équivalente à 0.5 McFarland. Dans cette méthode, la surface de l'agar est inoculée avec l'inoculum normalisé (turbidité ajustée par spectrophotomètre entre 0,08 et 0,12 à 625 nm) (Ca-sfm, 2010).

b. Ensemencement

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par le trempage d'un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ensuite nous l'essorons en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. Enfin, l'ensemencement est réalisé par le frottement de l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de la boîte de Pétri (Ca-sfm, 2010).

c. Application des disques

Les disques choisis sont posés à l'aide d'une pince stérile. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance doit séparer un disque périphérique au bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés pour que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas (Ca-sfm, 2010).

d. Incubation et lecture

Après l'incubation à 37°C pendant 24 heures, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque à l'aide d'une règle (Ca-sfm, 2010).

I.2.5.2.2. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne par la méthode des micro-dilutions en milieu liquide

a. Principe

La méthode de microdilution est une méthode quantitative qui permet de déterminer la concentration inhibitrice minimale (CMI). La méthode étudiée et celle de Koneman *et al.*, (1997) et rapportée par Oke *et al.*, (2009) avec quelques modifications. La CMI est étudiée seulement pour les microorganismes sensibles aux extraits.

b. Mise en œuvre pratique

Cette méthode est utilisée pour déterminer la CMI (concentration minimale inhibitrice) des différents extraits végétaux. Une microplaque a été utilisée. Aussi, l'iodonitrotétrazolium chlorure (INT) est un indicateur de la croissance microbienne après sa réduction en formazane de couleur rouge rosé. Ce test est réalisé en utilisant une microplaque de 96 puits selon la méthode décrite par Perumal *et al.* (2012). Les puits des colonnes A jusqu'à H (sens verticale) de chaque rangée 1 à 12 (sens horizontale) sont remplis avec 80 µl de bouillon de Muller Hinton stérile. Un volume de 40 µl de la gamme de dilution de l'extrait végétal testé est ajouté dans les puits des colonnes B jusqu'à G de chaque rangée et des dilutions de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32 de la concentration mère. Les rangées de 1 à 6 de chaque colonne sont utilisées pour l'extrait de *Cotula cinerea*. Les puits de la colonne H ont servi pour les témoins positifs (les antibactériens 5 mg/ml Gentamycine). Les rangées de la colonne A ne renferment aucun extrait ni agent antimicrobien. Enfin, 80 µl de la suspension microbienne contenant 10^6 UFC/ml sont additionnés à tous les puits et bien mélangés. Les microplaques sont incubées à 37 °C pendant 24 heures. La CMI des différents extraits est détectée après l'ajout de 40 µl d'une solution d'iodonitrotétrazolium chlorure INT (0,2 mg/ml) à tous les puits et incubés à 37 °C pendant 30 min. La croissance microbienne est déterminée en observant le changement de la couleur d'INT (rouge rosée de formazane quand il y a croissance et une solution claire quand il n'y a pas de croissance). La CMI correspond à la plus faible concentration en agent actif capable d'inhiber totalement la croissance d'un microorganisme donné (NCCLS, 2004 ; Perumal *et al.*, 2012 ; SFM, 2014).

I.2.6. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm écart type de trois répliques analytiques. L'ANOVA a été réalisée pour évaluer la variabilité entre les paramètres étudiés. La régression linéaire a été utilisée comme modèle afin de déterminer IC50. Le coefficient de corrélation de Person a été calculé pour déterminer la corrélation entre les méthodes de l'activité antioxydant et l'influence de différents solvants à la capacité antioxydante des différents extraits. Toutes les analyses ont été réalisées avec XLSTAT 2017.

Les différences de variabilité en fonction de *P* (probabilité de mettre en évidence des différences significatives) sont classées en :

$P > \alpha = 0,05$: différence non significative.

$P < \alpha = 0,05$: différence significative.

$P < \alpha = 0,01$: différence hautement significative.

$P < \alpha = 0,001$: différence très hautement significative.

Chapitre II-Résultats et discussion

Chapitre II-Résultats et discussion

II.1. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique réalisé sur les différents extraits de *Cotula cinerea* a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires et les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résultats du criblage phytochimique des différents extraits de *Cotula cinerea*.

Composé recherché	Résultat		
	EtOH/H ₂ O	DC	IF
Tanins hydrolysable	+	+	+
Tanins catichique	-	+	+
Flavonoïdes	+	+	+
Alcaloïdes	+	-	-
Stérols insaturés et Terpènes	+	+	+
Saponosides	+	+	+
Coumarines	+	-	-
Quinone libre	+	-	-
Composée réducteur	-	-	-

+ : présence ; - absence

Il ressort de ces résultats que les différents extraits aqueux de *Cotula cinerea* renferment la majorité des molécules polaires (flavonoïdes.tanins) et même apolaires (stéroïdes et terpénoïdes) Le tableau 2 fait également ressortir que les alcaloïdes les quionons et les coumarines ne sont détectés que dans l'extrait hydroéthanolique De même, les tanins catéchiqes sont absents dans l'extrait hydroéthanolique mais présents dans la décoction et l'infusion, Par ailleurs on signale l'absence des composée réducteur dans les trois préparations de *Cotula cinerea*.

Les flavonoïdes jouent des rôles très importants dans les plantes, dont elles protègent les plantes contre le stress hydrique et génèrent une tolérance des plantes aux métaux lourds présents

dans les sols. Hors la plante, les flavonoïdes possèdent plusieurs effets pharmacologiques (El-Sakka *et al.*, 2010).

Selon Iserin (2001), les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Cavin.,1999).

La présence des molécules apolaires dans la décoction et l'infusion peut être due à la température élevée qui facilite l'extraction de ces molécules. En effet, cette température affecte négativement les différentes propriétés de l'eau telles que la densité, les liaisons hydrogène et la constante diélectrique induisant ainsi la solubilité des molécules apolaires et l'augmentation de leur passage vers la phase aqueuse (Telli, 2017).

La variation de la composition chimique des plantes peut être influencée par plusieurs facteurs tels que la situation géographique, l'organe prélevé, la période, le moment de récolte et les conditions de stockage (Kone *et al.*, 2009).

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par Mecheri et Zaghabi (2015) qui ont indiqué la présence des tanins, des alcaloïdes et des flavonoïdes dans l'extrait hydrométhanolique de *Cotula cinerea*. L'étude réalisée par Bouziane (2002) et celle de Mebarki (2017) ont montré la présence des saponines, des tannins, des flavonoïdes, des stéroïdes et des terpénoïdes dans l'extrait méthanolique de *Cotula cinerea*.

L'ensemble des composés mis en évidence leur présence dans les différents extraits de *Cotula cinerea* ayant des propriétés pharmacologiques diverses (Ouedragoo, 2001), ce qui peut justifier les différentes utilisations de cette espèce dans la médecine traditionnelle.

II.2. Rendement d'extraction.

Le rendement d'extraction des différentes préparations de *Cotula cinerea* est calculé et les résultats sont présentés dans la figure 6.

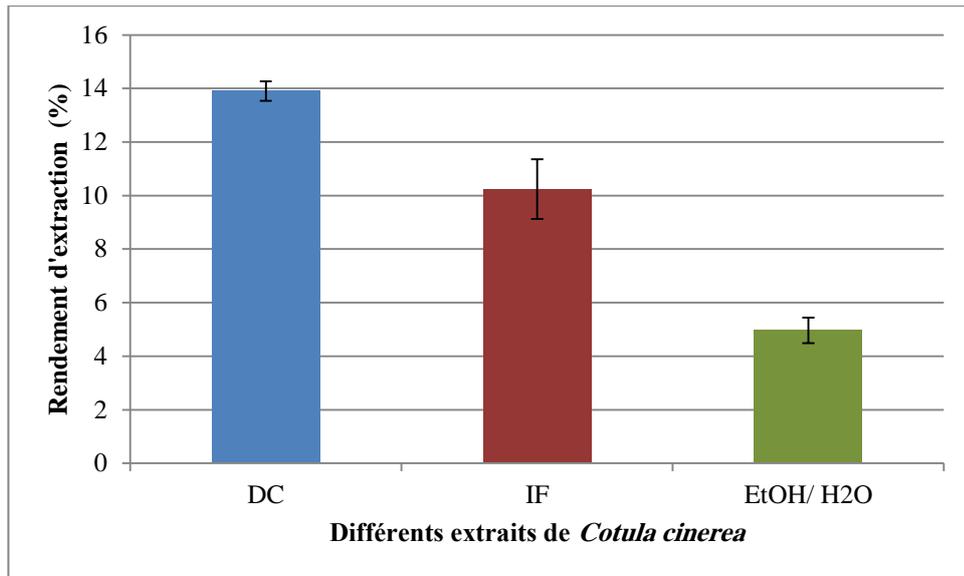


Figure 6: Rendement d'extraction de différents extraits de *Cotula cinerea*.

Les résultats présentés dans la figure 6 ont montré que le rendement le plus élevé est enregistré pour l'extrait obtenu par décoction avec un taux de $13,90 \pm 0,36\%$, suivi par celui de l'infusion qui est de l'ordre de $10,23 \pm 1,11\%$, alors que l'extrait préparé par macération hydroéthanolique présente un rendement faible ne dépassant pas $4,96\%$ (Fig. 6).

L'analyse de variance effectuée a montré que les différences entre les trois modes de préparation ne sont pas significatives ($P > 0,05$).

Il semble que les principes actifs des plantes ont tendance à extraire avec l'eau plus que les autres solvants. La polarité de l'eau ainsi que l'action de la température peuvent expliquer les rendements élevés de la décoction et de l'infusion. Majhenic *et al.* (2007) ont démontré que l'extraction à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs en comparaison avec ceux obtenus à température ambiante. l'élévation de la température favorise l'intensification de la solubilité et le coefficient de diffusion des molécules extraites (Al-Farsi *et al.*, 2007 ; Jerez *et al.*, 2006 ; Silva *et al.*, 2007).

D'une manière générale, les teneurs en extrait sec varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant. En plus de ces aspects quantitatifs, quel que soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir

compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bioactivité de ces principes actifs (Dridi et Segeuni, 2015).

En comparaison avec les résultats obtenus par Ousameur *et al.* (2013) dont la valeur du rendement de l'extrait hydroéthanolique (6,0%) est proche a notre résultat. Cependant, la valeur signalée par Benzaoui et Houari (2016) pour l'extrait méthanolique est plus élevée 9,45% de même partie de *Cotula cinerea*.

II.3. Analyses quantitatives

II.3.1. Teneur en polyphénols totaux

La quantification des polyphénols totaux est effectuée par une méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7.

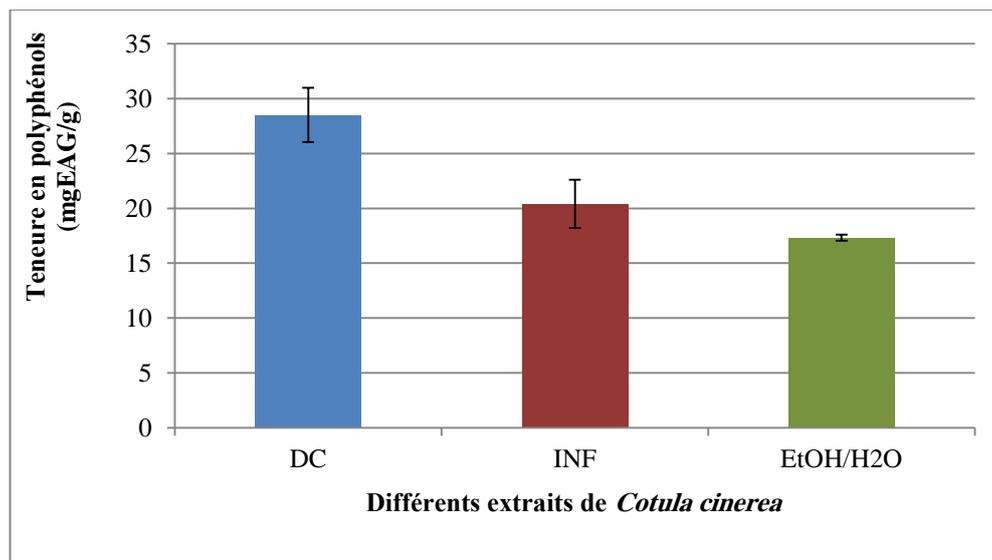


Figure 7 : Teneur en polyphénol totaux des différents extraits de *Cotula cinerea*.

D'après les résultats présentés dans la figure 7, il est à constater que la teneur en polyphénols totaux varie d'un extrait à un autre pour l'espèce choisie. Cette figure fait ressortir que l'extrait de *Cotula cinerea* le plus riche en polyphénols est celui obtenu par décoction avec un taux de $28,51 \pm 2,46$ mg EAG/g, suivi par celui de l'infusion qui est de l'ordre de $20,42 \pm 2,20$ mg EAG/g, alors que la teneur la plus faible est enregistrée pour l'extrait obtenu par la macération hydroéthanolique où la concentration des polyphénols est égale à $17,33 \pm 0,28$ mg EAG/g.

Statistiquement, il n'y a pas des différences significatives entre les teneurs en polyphénols des différents extraits ($P>0,05$).

Généralement, les solvants d'extraction entraînent des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique. (Benzaoui et Houari, 2016).

Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha *et al.*, 2007).

Les études effectuées sur la teneur en polyphénols totaux des différents extraits de *Cotula cinerea* ont montré que les valeurs obtenues par ces études sont inférieures à nos résultats, en particulier celle de la décoction. en effet, Benzaoui et Houari (2015) ont signalé que la teneur en polyphénols de *Cotula cinerea* est égale à 20 μg EAG/mg. L'étude réalisée par Belyagoubi (2011) a montré que le taux des polyphénols de l'extrait méthanolique de cette espèce est de l'ordre de $22,22\pm 0,41$ mg/g .

II.3.2. Teneur en flavonoïdes

Les résultats de la quantification des flavonoïdes des différents extraits de *C. cinerea* sont présentés dans la figure 8.

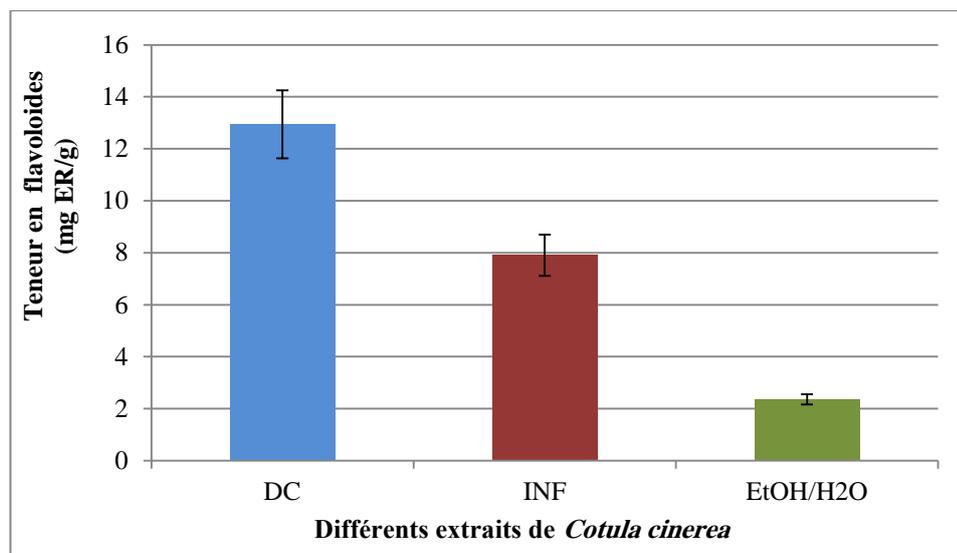


Figure 8: Teneur en flavonoïdes des différents extraits de *Cotula cinerea*.

Selon les résultats de la figure 8, une variabilité est constatée dans les teneurs en flavonoïdes des extraits testés. Il ressort de ces résultats que les préparations aqueuses obtenues par décoction et infusion sont les plus riches en flavonoïdes en comparaison avec l'extrait hydroéthanolique. La décoction a la meilleure concentration en flavonoïdes qui est égale à $12,94 \pm 1,60$ mg ER/g, suivie par celle de l'infusion qui est égale à $7,90 \pm 0,96$ mg ER/g. L'extrait hydroéthanolique a la teneur la plus faible en flavonoïdes avec un taux de $2,35 \pm 0,20$ mg ER/g.

L'analyse statistique effectuée montre qu'il n'y a pas des différences significatives entre les teneurs en flavonoïdes des différents extraits ($P > 0,05$).

Maisuthisakul *et al.* (2008) ont constaté que la teneur totale des flavonoïdes des extraits de plantes est liée à la teneur des composés phénoliques totaux. La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante est liée à la solubilité qui dépend non seulement de la polarité du solvant d'extraction mais aussi du nombre et de la position des groupements hydroxyles libres, au poids moléculaire et de la glycosylation (Mohammedi et Atik, 2011 ; Iloki-Assanga *et al.*, 2015).

Nos résultats laissent apparaître que les polyphénols et les flavonoïdes sont des composés majoritaires des composés phénoliques, les taux élevés des polyphénols et des flavonoïdes peuvent être dus à l'augmentation du métabolisme de ces composés en réponse aux conditions climatiques extrêmes de cette plante saharienne (Djeridane *et al.* 2006).

L'étude réalisée par Belyaagoubi (2011) a montré que l'extrait méthanolique de *Cotula cinerea* a une teneur en flavonoïdes de l'ordre de $3,931 \pm 0,061$ mg EC/g, qui est proche à celle de notre extrait hydroéthanolique mais inférieure à celles de la décoction et de l'infusion.

II.3.3. Teneur en acides phénols

La quantité des acides phénols dans les différentes préparations est évaluée et les résultats sont présentés dans la figure 9.

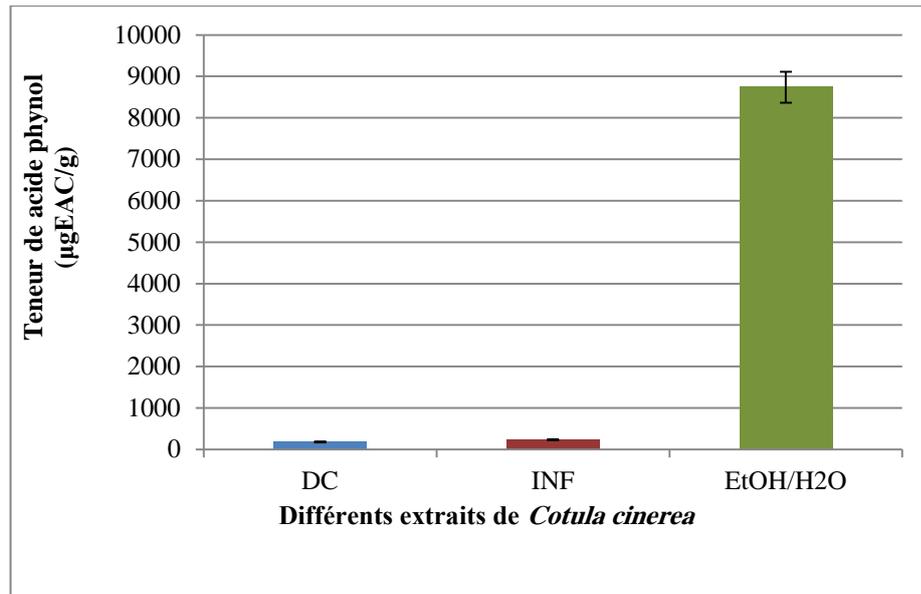


Figure 9: Teneur en acides phénols dans différents extraits de *Cotula cinerea*

Les résultats présentés dans la figure 9 montre que l'extrait de *C. cinerea* le plus riche en acides phénols est celui obtenu par macération hydroéthanolique avec un taux égal à 8741,12±372,96 µg EAC/g, alors que les extraits obtenus par décoction et infusion ont des taux faibles en acides phénols qui sont de l'ordre de 235,63±14,89 µg EAC/g et de 179,63± 12,67 µg EAC/g respectivement.

L'analyse de variance de ces résultats montre que la différence est significative pour les teneurs en acides phénols entre les différentes préparations ($P < 0,05$).

La concentration élevée des acides phénols dans l'extrait hydroéthanolique peut être due à la grande solubilité de ces molécules dans le solvant organique. Ceci peut être due à la formation des liaisons ester entre la fonction acide d'un acide phénol et un groupement OH de l'éthanol comme les acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique (acide 4-coumarique, acide caféïque, acide férulique et acide sinapique) Cependant, les taux faibles enregistrés dans l'extrait aqueux peuvent être dus à l'estérification de différentes fonctions alcools des acides phénols ce qui diminue leur polarité et par conséquent leur solubilité dans l'eau (Babaouyoub, 2017)..

La solubilité des acide phénols dépend de leur nature chimique dans la plante qui varie de composées simples à fortement polymérisées, cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité de leurs propriétés physico-chimiques, influençant sur leur extraction (Garcia *et al.*, 2010).

II.3.4. Teneur en tanins condensés

La quantité des tanins condensés dans les différentes préparations est évaluée et les résultats sont présentés dans la figure 10.

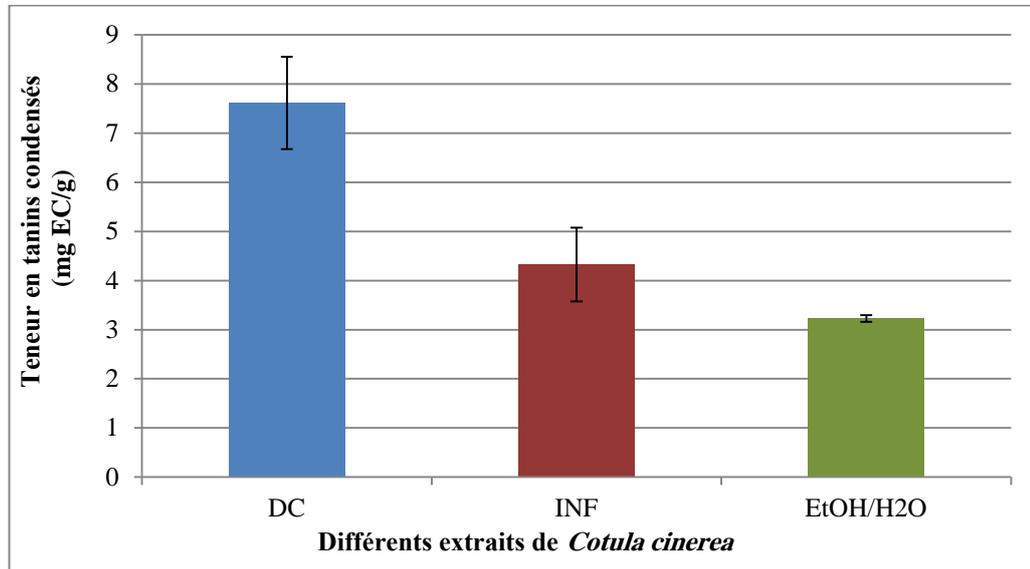


Figure 10: Teneurs en tanins condensés des différents extraits de *Cotula cinerea*

Il apparaît que la concentration des tanins est plus élevée dans les préparations aqueuses notamment dans la décoction qui est de l'ordre de $7,61\pm 0,93$ mg EC/g, suivie par celle de l'infusion ($4,32\pm 0,74$ mg EC/g), tandis que la concentration la plus faible est celle obtenus par la macération hydroéthanolique ($3,22\pm 0,07$ EC mg/g) (Fig 10).

L'analyse de variance effectuée montre que la différence n'est pas significative des teneurs en tanins condensés dans les différents extraits ($P>0.05$).

Les résultats obtenus ont montré que l'extraction effectuée par l'eau chaude (décoction et infusion) donne les meilleurs rendements en tanins. En effet, Markom *et al.* (2007) ont prouvé que l'eau donne le meilleur rendement d'extraction des tanins de *Phyllanthus niruri* Linn. Ces auteurs ont aussi indiqué que la température a un effet positif sur le taux des tanins extraits. Giron et Piemonte (2011) ont aussi signalé que le taux des Tanins le plus important est obtenu avec l'eau à 60-80 °C.

Au point d'ébullition du solvant, sa tension superficielle et sa viscosité sont considérablement réduites par rapport à la température plus basse, et par conséquent le solvant

peut atteindre plus facilement les sites actifs à l'intérieur de la matrice et d'extraire une quantité importante des molécules (Markom *et al.*, 2010).

Nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Belyagoubi (2011) pour le taux des tanins condensés dans l'extrait méthanolique de *Cotula cinerea* ($8,61 \pm 0,18$ mg EC/g).

II.4 .Activités biologiques

II.4.1. Activité anti-oxydante.

Jusqu'à présent, il n'y a pas de méthode simple et universelle par laquelle l'activité anti-oxydante est évaluée qualitativement et quantitativement (Prior *et al.*, 2005).

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des différents extraits de *C. cinerea* est effectuée par trois méthodes différentes : l'inhibition du radical cation ABTS^{•+}, le pouvoir réducteur du fer (FRAP, *ferric reducing ability of plasma*) et l'inhibition de blanchissement du β -carotène.

a. Inhibition du radical cation ABTS^{•+}

L'activité antioxydante est déduite de la capacité d'un extrait à inhiber le radical ABTS^{•+} comparativement à un antioxydant de référence: Trolox. Le pouvoir antioxydant de différents extraits de *Cotula cinerea* est testé à différentes concentrations en extraits et les résultats exprimés en μ M équivalent Trolox/g de poids sec de matériel végétal sont présentés dans la figure 11.

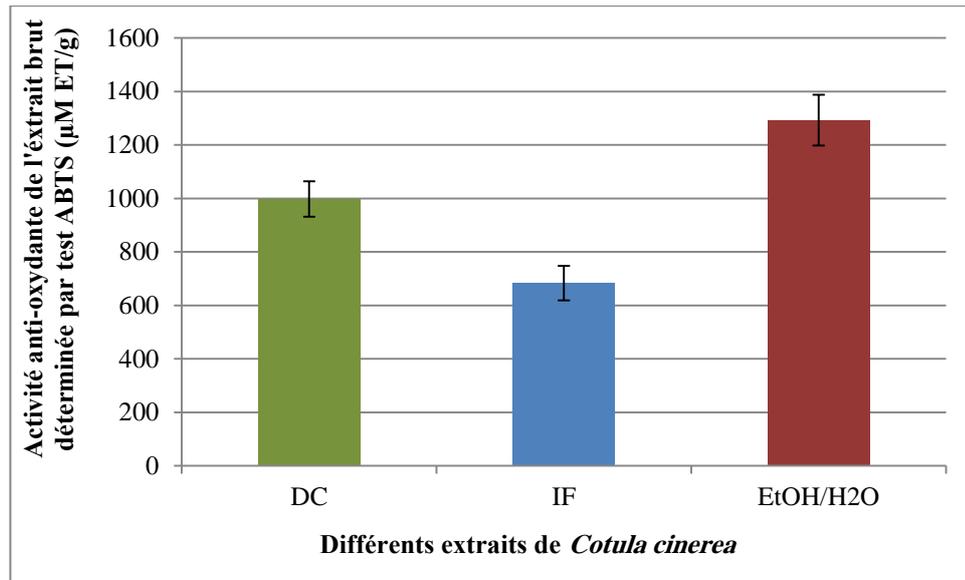


Figure 11: Activité anti-oxydante des différents extraits de *Cotula cinerea* déterminée par le test ABTS.

La figure 11 fait ressortir que l'activité anti-oxydante varie considérablement entre les différents extraits. Elle est comprise entre $1292,47 \pm 95,15 \mu\text{M ET/g}$ pour l'extrait hydroéthanolique et $683,33 \pm 64,64 \mu\text{M ET/g}$ pour l'extrait obtenu par infusion.

Les valeurs de CI_{50} pour le test ABTS des différents extraits de *Cotula cinerea* sont calculées et les résultats sont illustrés dans le tableau 3.

Tableau 3: CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) du test ABTS des différents extraits de *C. cinerea*

Extrait	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Décoction	$140,55 \pm 11,45$
Infusion	$157,97 \pm 10,78$
Macération	$4,52 \pm 0,18$
Trolox	$390,05 \pm 0,34$

Il ressort des résultats présentés dans le tableau 3 que les différentes préparations de *Cotula cinerea* sont très puissantes dans l'inhibition du radical cation $ABTS^{+\cdot}$ et plus efficaces en comparaison avec l'antioxydant standard le Trolox. La valeur de CI_{50} la plus basse est enregistrée pour l'extrait hydroéthanolique qui est de l'ordre de $4,52 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$, tandis que les

extraits aqueux obtenus par décoction et infusion ont des valeurs de CI_{50} très élevées ($140,55 \pm 11,45 \mu\text{g/ml}$ et $157,97 \pm 10,78 \mu\text{g/ml}$ respectivement) par rapport à celle de l'extrait hydroéthanolique mais restent plus faible à celle de standard utilisé (Trolox) qui a une CI_{50} égale à $390,05 \pm 0,34 \mu\text{g/ml}$.

Le calcul de coefficient de corrélation entre le pouvoir antioxydant déterminé par le test ABTS et les teneurs en différents composés phénoliques, permet de montrer qu'il n'y a pas de corrélation significative entre les paramètres étudiés pour les extraits hydroéthanolique et infusion. Par contre, nous constatons qu'il y a une corrélation significative entre l'activité antioxydante déterminée par le test ABTS et la teneur en tanins condensés pour l'extrait préparé par décoction (coefficient de corrélation 1.00) (annexe 9).

Il apparaît clairement que l'extrait hydroéthanolique obtenus par macération de *Cotula cinerea* enregistre la meilleure concentration inhibitrice par rapport à celles de la décoction et l'infusion.

Pour nos extraits, l'absence de la corrélation dans certain extraits ne signifie pas forcément que les composés phénoliques ne sont pas participés dans l'inhibition de radicale l'ABTS^{•+} mais peut être les fonctions hydroxyle donneuses d'électrons sont engagées dans des liaisons glycosidiques (O- glycosides, C-glycoside), ester ou éther (Babaoyoub,2017).

b. Pouvoir réducteur de fer

Le test FRAP est plus répondu pour déterminer la capacité anti-oxydante des extraits végétaux à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} .

Les résultats du pouvoir réducteur de fer des différents extraits de *Cotula cinerea* sont présentés dans la figure 12.

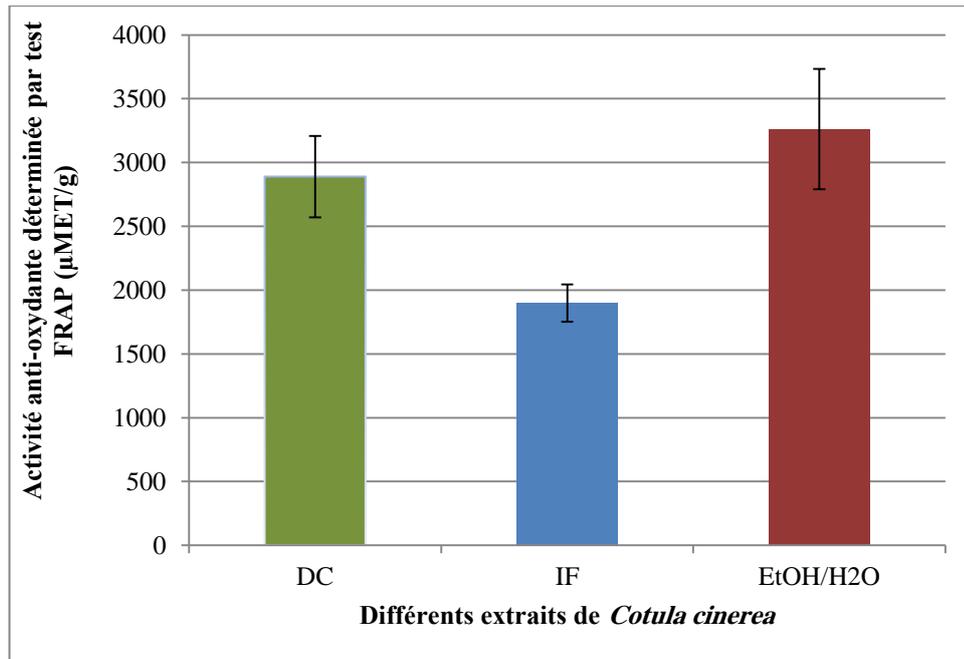


Figure 12: Activité anti-oxydante des différents extraits de *Cotula cinerea* déterminée par le test FRAP ($\mu\text{M ET/g}$).

La figure 12 montre que l'extrait obtenu par macération hydroéthanolique de la partie aérienne de *Cotula cinerea* a la capacité réductrice de fer la plus élevée avec une valeur égale à $3261,22 \pm 471,78 \mu\text{M ET/g}$, suivi par la décoction qui a un pouvoir réducteur égal à $2890,01 \pm 318,89 \mu\text{M ET/g}$.

Cependant, l'extrait obtenu par infusion de l'espèce étudiée présente la capacité réductrice de fer la plus faible en comparaison avec les autres extraits ($1897,67 \pm 146,09 \mu\text{M ET/g}$) (Fig 12).

D'après ces résultats, il apparaît que la macération hydroéthanolique de *Cotula cinerea* est la plus efficace dans la réduction de fer en comparaison avec les deux autres extraits.

Les concentrations des extraits qui permettent la réduction de 50 % de fer sont calculées et les résultats sont illustrés dans le tableau 4.

Tableau 4 : CI₅₀ (µg/ml) du test FRAP des différents extraits de *C. cinerea*.

Extrait	CI ₅₀ (µg/ml)
Décoction	91,67± 2,78
Infusion	135,90± 5,82
Macération	60,04± 1,56
Trolox	1271,45± 64,62

Le tableau 4 montre que l'extrait obtenu par macération hydroéthanolique de la partie aérienne de *Cotula cinerea* a la capacité réductrice de fer la plus élevée exprimée en CI₅₀ qui est de l'ordre de 60,04±1,56 µg/ml.

Les préparations de *Cotula cinerea* obtenues par décoction et infusion ont des valeurs de CI₅₀ supérieures à celle de l'extrait hydroéthanolique et qui sont égale à 91,67± 2,78 µg/ml et 135,90± 5,82 µg/ml respectivement. Tous ces extraits présentent des pouvoirs réducteurs de fer nettement supérieurs à ceux de Trolox (1271,45± 64,62 µg/ml) (tableau 4).

Le test de corrélation réalisé entre l'activité anti-oxydante évaluée par le test FRAP et les teneurs en différents composés phénoliques montre qu'il n'y a pas de corrélation significative entre ces paramètres (annexe 10).

Le pouvoir réducteur de fer des extraits de la plante est probablement dû à la présence de groupements hydroxyle sur les cycles benzène des composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Bougandoura & Bendimerad, 2012).

Les résultats de test de corrélation révèlent que l'activité anti-oxydante des différents extraits n'est pas attribuée à sa richesse en composés phénoliques. Celle-ci peut être due à la présence d'autres composées ayant la capacité de donner des électrons, tels que les terpénoïdes (monoterpène et sesqueterpène) (Mohammedi, 2006).

c. Inhibition de blanchissement du β -carotène

La capacité anti-oxydante des différents extraits de *Cotula cinerea* est évaluée et comparée avec celle d'un antioxydant de référence BHT (butylhydroxytoluène) et les résultats sont présentés dans la figure 13.

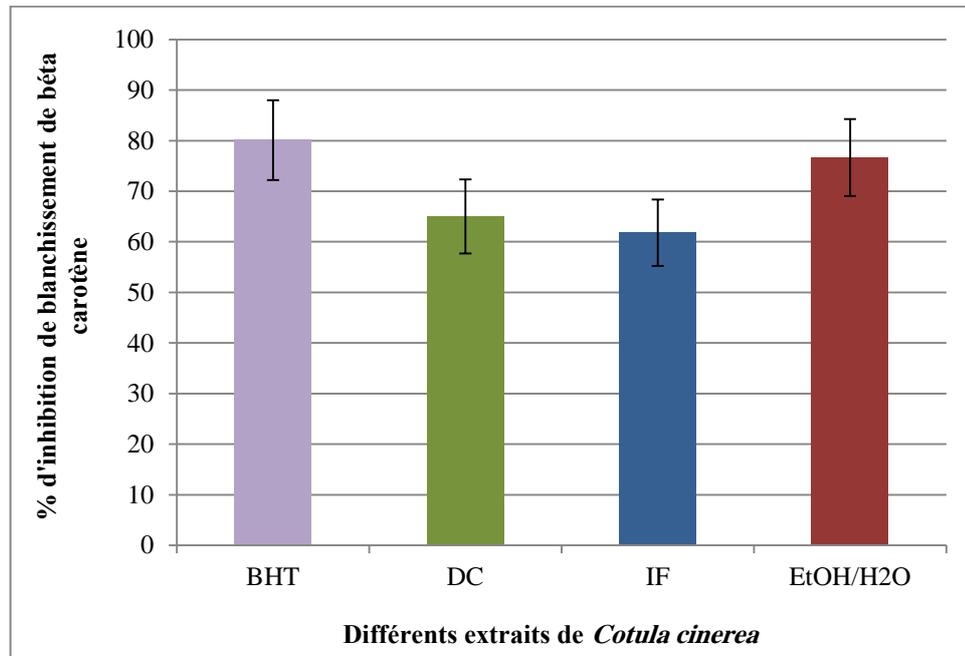


Figure 13: Pourcentage d'inhibition de blanchissement du β -carotène par différents extraits de *Cotula cinerea*.

il ressort des résultats présentés dans la figure 13 que tous les extraits de *Cotula cinerea* ont des pourcentages d'inhibitions de blanchissement du β -carotène allant de $61,78 \pm 6,58\%$ pour l'extrait obtenu infusion à $76,76 \pm 7,61\%$ pour l'extrait hydroéthanolique, mais ces pourcentages sont inférieures à celui de standard utilisé (BHT) ($80,12 \pm 7,88\%$).

Les valeurs de CI_{50} d'inhibition de blanchissement du β -carotène exprimées en $\mu\text{g/ml}$, de différents extraits de *Cotula cinerea* sont déterminées et les résultats sont regroupés dans le Tableau 5.

Tableau 5: CI_{50} du test de blanchissement du β -carotène des différents extraits de *Cotula cinerea*

Extrait	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Infusion	121,44 \pm 5,84
Décoction	92,24 \pm 6,48
Macération	32,56 \pm 4,00
BHT	31,50 \pm 2,80

Selon les résultats présentés dans le tableau 5, on constate que les différents extraits de *Cotula cinerea* ont des CI_{50} supérieures à celle obtenue avec le standard utilisé : le BHT (31,50 \pm 2,80 $\mu\text{g/ml}$).

Les valeurs CI_{50} calculées nous a permis d'évaluer et comparer l'efficacité des extraits, plus la valeur est petite, plus l'activité antioxydante à piéger les radicaux libres formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique est élevée (Belyagoubi , 2011).

Comme la faible valeur de CI_{50} signifie la forte activité antioxydante, l'extrait de hydroéthanolique obtenu par macération présente la meilleure activité inhibitrice de blanchissement du β -carotène et proche à celle de BHT avec une valeur de 32,56 \pm 4,00 ($\mu\text{g/ml}$)

Les extraits de décoction et infusion ont des pouvoirs inhibiteurs de blanchissement du β -carotène très faibles en comparaison avec l'antioxydante de référence BHT.

Statistiquement il n'y a pas de corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux dans les trois extrait, mais il y a une corrélation négatif (-0.999) entre la teneur en tanins et l'activité antioxydante pour la décoction; et une corrélation négatif entre la teneur en acide phénols et l'activité antioxydante pour l'extrait hydroéthanolique (annexe 9).

Le blanchissement du β -carotène est basé sur le transfert d'un atome d'hydrogène de l'antioxydante vers le radical alkoxyl ($RO\cdot$) ou peroxy ($ROO\cdot$) (Gupta, 2015).

Les résultats obtenus ont montré l'efficacité de l'extrait hydroéthanolique de l'espèce étudiée dans l'inhibition de blanchissement du β -carotène en comparaison avec les autres extraits.

II.4.2 .Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation est effectuée par deux méthodes : une qualitative basée sur la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm (méthode de diffusion sur milieu gélosé), et l'autre quantitative basée sur la recherche de la plus faible concentration (CMI :concentration minimale inhibitrice), des extraits, qui inhibent la croissance microbienne (méthode de micro-dilution sur milieu liquide), Cette valeur est définie comme étant la concentration minimale d'extrait qui inhibe toute croissance visible après 24 heures d'incubation à 37°C.

II.4.2.1. Diffusion sur disque en milieu gélosé

La figure 14 représente l'activité inhibitrice de la croissance bactérienne des différents extraits de *Cotula cinerea* sur les souches testées évaluant par la mesure de la zone d'inhibition (mm).

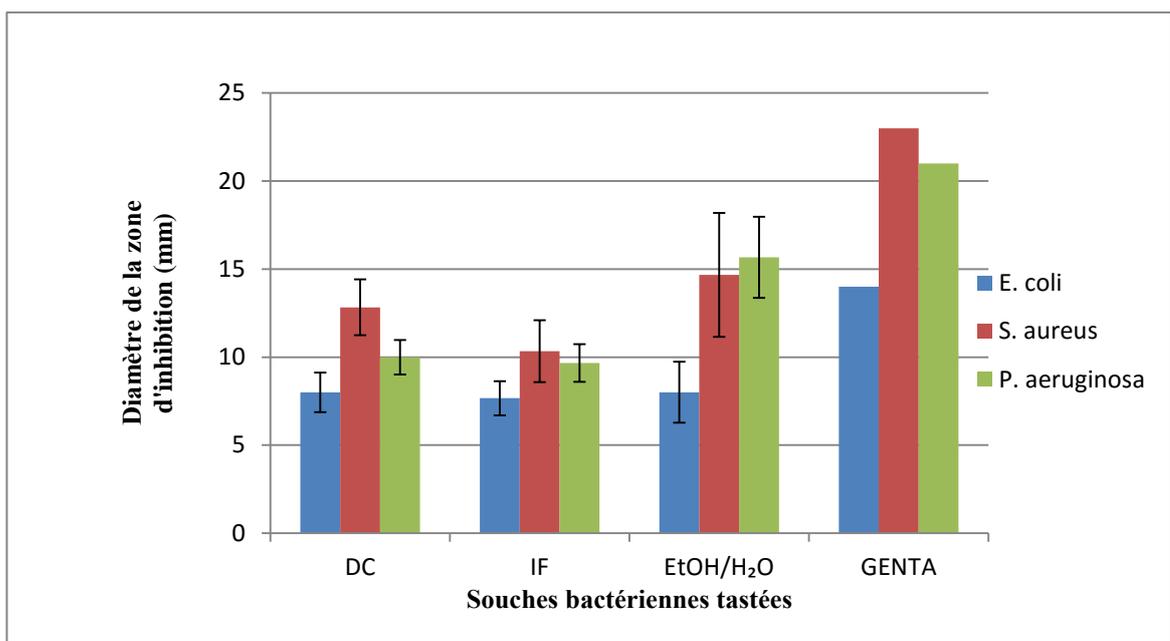


Figure 14: Diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus avec les différents extraits de *Cotula cinerea*

Ces résultats font ressortir que

La gentamicine antibiotique à large spectre utilisée comme témoins positif présente du diamètre d'inhibition élevée par rapport à nous extraits vis-à-vis a tous les souches testées

tous les extraits présentent des capacités inhibitrices de la croissance microbienne plus ou moins intéressantes sur les trois souches testées.

Escherichia coli a montré une résistance aux différents extraits de l'espèce étudiée avec des zones d'inhibition comprises entre 7 et 8 mm.

Les différents extraits de *Cotula cinerea* inhibent la croissance de *S. aureus* avec des diamètres de zones d'inhibition comprises entre 10 à 15 mm (Fig. 14).

P. aeruginosa a montré une résistance aux extraits aqueux obtenus par décoction et infusion avec des zones d'inhibition allant de 9 à 10mm, mais sensible à l'extrait hydroéthanolique avec une zone d'inhibition dépassant 15 mm.

L'analyse de variance a montré que la nature de solvant et la souche bactérienne n'ont pas des effets significatifs sur l'inhibition de la croissance bactérienne par différents solvants ($P > 0,05$).

Cette différence serait due au fait que la sensibilité d'un microorganisme à un extrait dépend non seulement de l'extrait, mais aussi du microorganisme lui-même et de l'environnement où se situe l'action (Boutalbi, 2014).

Nous n'avons pas trouvé des études effectuées sur l'activité antimicrobienne des extraits aqueux obtenus par décoction ou infusion de l'espèce *Cotula cinerea*.

Généralement, l'absence d'une zone d'inhibition ne signifie pas nécessairement l'inactivité de l'échantillon testé, parfois certains produits diffusent plus lentement dans le milieu de culture (Bensizerara *et al.*, 2013).

L'étude de Benzauoui et Houari (2016) a signalé que l'extrait méthanolique de *Cotula cinerea* montre une activité antibactérienne modérée avec des zones d'inhibition comprises entre 5 et 10 mm.

II.4.2.2. Concentration minimale inhibitrice CMI (méthode de micro-dilution)

Les valeurs de CMI sont déterminées pour les différents extraits de *Cotula cinerea* et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 15.

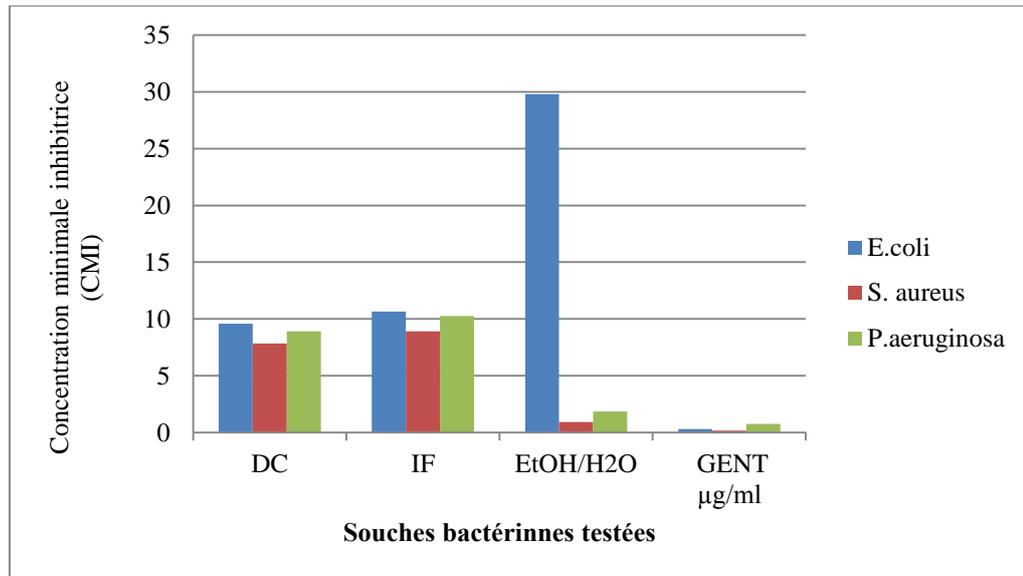


Figure 15 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents extraits de *Cotula cinerea* sur les différentes souches testées

La figure 15 montre que

- La gentamicine montre une activité antibactérienne puissante vis-a-vis des souches testées avec des CMI comprise entre 0,19 et 0,78 µg/ml.
- l'extrait hydroéthanolique de *Cotula cinerea* présente la meilleure concentration minimale inhibitrice de la croissance avec une valeur de CMI = $1,26 \pm 0,45$ mg/ml suivie par CMI de l'extrait obtenu par décoction avec un CMI = $7,86 \pm 1,33$ mg/ml, la faible CMI est correspondre à l'extrait de l'infusion avec CMI = $8,91 \pm 1,89$ mg/ml.

Les valeurs de CMI sont en parfait accord avec les diamètres des zones d'inhibition des différents extraits de *Cotula cinerea*.

Les résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait hydroéthanolique sur microplaque sont présentés dans la figure 16.

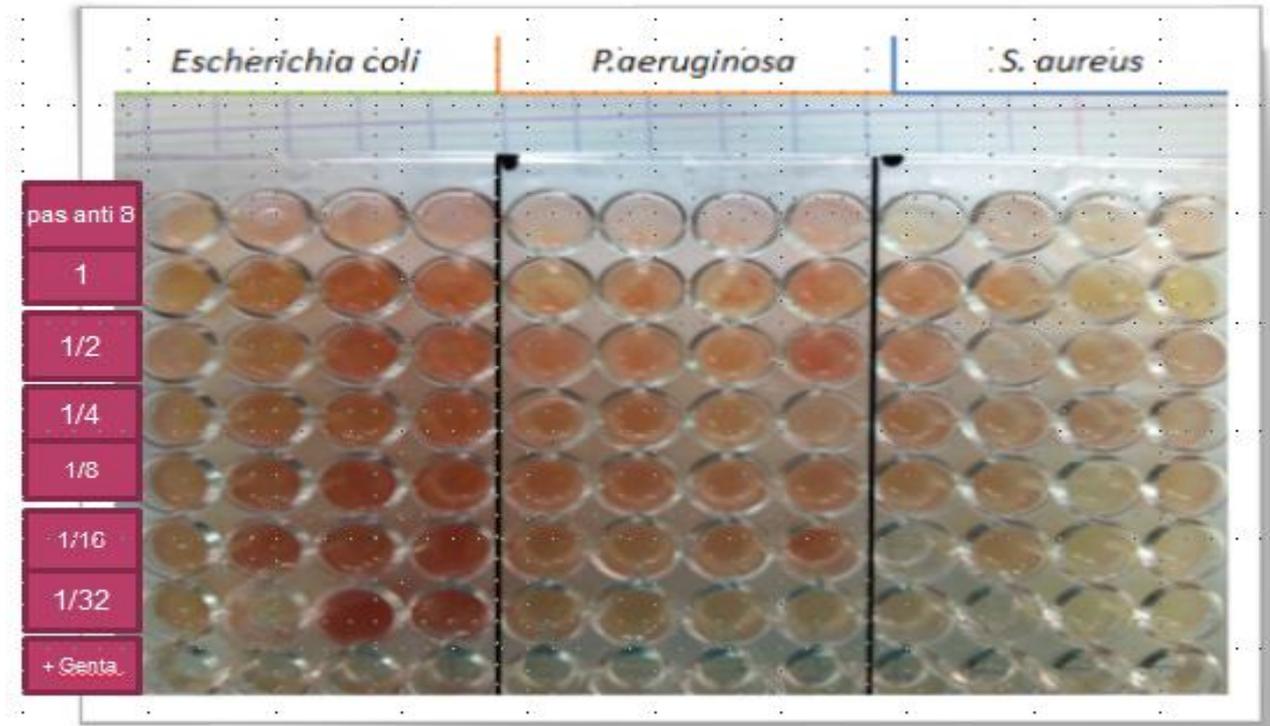


Figure 16: Inhibition de la croissance d'*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* par différentes concentrations de l'extrait hydroéthanolique de *C. cinerea*

Les résultats présentés dans la figure 16 montrent que l'extrait hydroéthanolique de *Cotula cinerea* a des activités antimicrobiennes de degrés variables contre les différents microorganismes testés. La souche la plus sensible à l'extrait hydroéthanolique est *S. aureus* avec une valeur de CMI de l'ordre de 0,93mg/ml suivie par la souche *P.aeruginosa* CMI égale 1,86 mg/ml, tandis que la souche *E. coli* présente moins de sensibilité vers l'extrait hydroéthanolique avec une valeur de CMI > 29,8 mg/ml.

L'analyse de la variance a montré que la nature de solvant et la souche bactérienne n'ont pas des effets significatifs sur l'inhibition de la croissance bactérienne par différents solvants ($p > 0,05$).

La couleur rouge dans les puits qui précèdent les puits de CMI des *S. aureus* et *P. aeruginosa* peut être due au fait que les molécules antibactériennes ne sont actives que si elles sont isolées pour cela la dilution de l'extrait fait apparaître leur effet ou bien peut être due à une contamination durant la manipulation.

Selon Lewis et Ausubel (2006), une molécule isolée à partir des plantes est considérée comme antimicrobienne si elle inhibe la croissance des microorganismes pour des valeurs de

CMI comprises entre 0,1 et 1 mg/ml. Pour les antibiotiques d'origine microbienne, les CMI qui sont comprises entre 0,01 à 10 µg/ml sont suffisantes pour engendrer une activité inhibitrice.

Nous n'avons pas trouvé des études sur l'activité antimicrobienne des extraits aqueux de *Cotula cinerea*.

D'après le travail de Bensizerara *et al.* (2013), l'extrait du n-butanol de *Cotula cinerea* a été démontré une valeur de CMI égale 250µg/ml contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*. L'étude de Markouk *et al.* (1999) a indiqué que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Cotula cinerea* collectée dans la région de Zagora (Maroc) a présenté un effet antibactérien avec une concentration minimale inhibitrice CMI de 200 µg/ml vis-à-vis *P. aeruginosa* tous ces résultats sont inférieure à notre résultats.

D'après ces résultats, on déduit que la méthode de préparation de l'extrait, la polarité de solvant et l'origine de la plante ont une influence sur la nature des molécules extraites et par conséquent sur leurs activités biologiques.

En conclusion, il est à noter que l'étude microbiologique a permis d'illustrer la potentialité bioactive de la plante étudiée. En effet, il est possible d'utiliser des préparations à base de cette plante pour soigner des maladies d'origines bactériennes.

Conclusion

Conclusion

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Dans ce travail, on s'est intéressé à l'analyse phytochimique et à l'étude des activités biologiques (antioxydante et antibactérienne) des différents extraits de *Cotula cinerea* plante largement utilisée dans la région de Ghardaïa, récoltée dans la région Zelfana – oued M'Zab- Ghardaïa

L'extraction des principes actifs a été effectuée selon les modes traditionnels de préparation des extraits décoction infusion, et la macération hydroéthanolique (80/20 (v/v) et avec un rapport solide/liquide de 10/100 (p/v). ces méthodes d'extraction ont été appliquées sur le matériel végétal de *Cotula cinerea* frais, par lesquelles on a ciblé les métabolites secondaires précisément les composés phénoliques qui peuvent être contenus dans ces plantes. Par ailleurs les meilleurs rendements d'extraction de la plante fraîche sont ceux obtenus par Décoction avec un taux de $13,90 \pm 0,36\%$.

La présente étude a porté sur l'espèce *C. cinerea*. Elle a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique la présence des tanins condensés et hydrolysables, des flavonoïdes, des stérols et terpénoïdes, des stéroïdes, des saponines et des alcaloïdes ne sont détectés que dans l'extrait hydroéthanolique.

Dans la première partie, la quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu, en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium, en les tannins par le test de la vanilline et acide phénol par le réactif d'Arnov. *Cotula cinerea* caractérisée par sa richesse en polyphénols totaux et la teneur la plus élevée en Flavonoïdes et tanins condensés dans l'extrait obtenu par décoction qui sont respectivement de $28,51 \pm 2,46$ mg EAG/g, $12,94 \pm 1,60$ mg ER/g, $7,61 \pm 0,93$ mg EC /g.

La macération hydroéthanolique de cette espèce présente la teneur la plus élevée en acide phénols qui est égale $8741,12 \pm 372,96$ µgEAC/g. Les teneurs en différents composés phénoliques de *Cotula cinerea* lui confère des activités biologiques plus intéressantes telles que l'activité antioxydante et antimicrobienne.

Afin d'évaluer l'activité anti-oxydante des extraits de *Cotula cinerea* en utilisant trois méthodes chimiques : le piégeage du radical cation ABTS•+ et la réduction du fer FRAP et le teste de B carotène, nous avons constaté que les différents extraits présentent des activités antioxydants intéressantes, La macération hydroéthanolique de *Cotula cinerea* est l'extrait qui présente une l'activité anti-oxydante la plus importante exprimée en $\mu\text{M ET/g}$ pour tous tests ABTS et FRAP, B carotène et Les trois extraits présentent des CI50 souvent supérieures à celles des antioxydants standards (Trolox, BHT)et sont respectivement $4,52 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$ $60,04 \pm 1,56 \mu\text{g/ml}$ $32,56 \pm 4,00 \mu\text{g/ml}$.

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur trois bactéries pathogènes humaines à savoir : *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* par la méthode de diffusion sur disque et par Microdilution sur milieu liquide. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait hydroéthanolique de *Cotula cinerea* manifeste une activité antibactérienne contre un certain nombre de bactéries tel que *P. aeruginosa*, *S. aureus*. la concentration minimale inhibitrice (CMI) est égal $1.26 \pm 0.45 \text{mg/ml}$. alors que la seule souche qui résiste tous les extraits est *E. coli*. les extraits aqueuse obtenus par décoction et infusion présentes une activité antibactérienne moins important.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement active.

A cet effet, nous pouvons suggérer les perspectives suivantes :

- Identifier caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés Pharmacologiques dans les plante
- Elargir les champs des activités antioxydantes et anti bactérienne *in vitro* et *in vivo* et réalise d'autres tests biologiques : antitumorale, anticancéreuse et anti-inflammatoire

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1. **Abdenbi, A .Abdelwahed, D. Bouaaza, M .Touati, B. 2014.** Screening phytochimique et activitéantibactérienne de l’huile essentielle de *cotula cinerea* (gartoufa) dans la region de bechar. Journal of Research inEngineering & Technology , 2(2) :49-54.
2. **Achour ,A . 2016.**Cractérisation physiologique et biochimique du gombo (*Abelmoschus esculentus*)
3. **Ahmed, AA. El sayed, NH.El Negoumy , SI. Mabry, TJ.1987.**Flavonoids of cotula cinerea. J Nat prod, 50 : 519-520.
4. **Akiya, N. Savage, P.E., 2002.** Chemical reactions in high-temperature water. Chem. Rev.,102: 2725-2750.
5. **Allam, S. Ayad, K. 2015.** L’effet des facteurs climatiques sur la variation de quelques métabolites secondaires suivis de l’activité antibactérienne chez les deux espèces *Hyoscyamus albus* L. et *Hyoscyamus muticus* L). Mémoire Master, Université des Frères Mentouri Constantine.
6. **Alyafi Alzhri ,G. 2007.** Determination of chemical composition of Prangos and the possibility to use in the applied field, Damascus University. P 54.
7. **Amirouche, R et Misset, M. (2009).** Flore spontanée d’Algérie : différenciation éco géographique des espèces et polyploïdie. Faculté des sciences biologiques. Cah Agric, Vol 6(18). 474-480.
8. **Ardestani, Y.azdanparast, R. 2007.** Antioxidant and free radical scavenging potential of Achilleasantolina extracts, Food chemistry. 104 (1) : 21-29.
9. **Babayoub, F .2017.**Activitie biologique de extraits de feuilles de *Zizyphus* .Mimoire master,universitie Ghardia.
10. **Bahaz, M .Rachdi, H. 2010.** Quantification des principes actifs (Les composés phénoliques) de *Rhetinolepis Lonadoides Coss* (Tichert) , Mémoire d’ingénieur ,université Ouargla.
11. **Bahorun, T.1997.** Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*: 83-94.
12. **Belkacem, S. (2009),**"Investigation phytochimique de la phase n-butanol de l’extrait hydroalcoolique des parties aériennes de *centaurea parviflora* (compositae)",Mémoire magister, Université Mentouri – Constantine, p 1.

13. **Belyagoubi ,N. Benhammou, N .2011.** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse Doctorat, *Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*.p161
14. **Benhammou, N. 2011-** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de Doctorat en biologie. Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen. Algérie. 113 p.
15. **Bensizerara, D.Menasria, T. Melouka, M. Cheriet, L. Chenchouni, H. 2013.** Antimicrobial Activity of Xerophytic Plant (*Cotulacineria Delile*) Extracts Against Some Pathogenic Bacteria and Fungi. 6(4) : 266 – 271.
16. **Benzaoui, F. Houari, A.2016.** Contribution à l'étude des activités biologiques de *Brocchia cinerea*(Vis.) et *Matricaria pubescens* (Desf.),mémoire master. université Ouargla.
17. **Boizot, N. Charpentier, J.P. 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'INRA, numéro spécial : 79-82.
18. **Bonnier, G. 1934.** *Flore complète de France, Suisse et Belgique*. Édition 10. p 118.
19. **Boudjouref, A . 201.** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L,thèse Magister Université Ferhat Abbas-Sétif.
20. Bougandoura N., 2011.- Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha* (nabta) et *Ajugaiva* L (chendgoura) de l'ouest d'algerie. Mémoire de Magister. Université ABOU BAKR BELKAID-Tlemcen. Pp 76.
21. **Bougandoura, N. Bendimerad, N. 2012.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp.*Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*. 09 : 14-19.
22. **Boutaghane, N. 2013.** Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Asteraceae),Thèse Doctorat . Université de Constantine 1. P 11-58
23. **Boutalbi, S. 2014.** Criblage chimique et l'activité biologique de spiruline (*arthrospira platensis*). mémoire de master. université kasdi merbah ouargla. pp 82.
24. **Bremer, K. (1994).** Asteraceae, Cladistics and Classification. (Timber Press), Portland, Oregon.pp. 752.
25. **Brown, JH, 2009.** Theobald Smith 1859-1934, *J Bacteriol*, vol. 30, no 1, 1935, p. 1–3

26. **Cazin, J. C. Pinkas, M.m .1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations .*Arznei. Forschung.*, 46; 1086-1089.
27. **Chehma, A. et Djebar, M.R. 2008** - Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien : inventaire, symptômes traités, modes d'utilisation et distribution spatio-temporelle et abondance, Com. *Sém. Inter. Val.* Plantes médicinales dans les zones arides. Université d'Ouargla, 107-118 p.
28. **Chehma, A. 2005.** Etude floristique et nutritive des parcours camelin du Sahara septentrional Algérien, cas des régions d'Ouargla et Ghardaïa. Thèse Doctorat d'état, Université de Annaba, 178 p.
29. **Chehma, A et Djebar, M R. (2008).** Les espèces médicinales spontanées du sahara septentrional algérien :distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique. Revue synthèse N°17.vol10. 36-45.
30. **Chouikh, A .Chefrour , A. 2014.**Seasonal, biometric and dynamic monitoring of the Shihia plant *Cotula cinerea* Del (1831) and its accompanying plants in the Saharan region Oued-Souf (south-east of Algeria). *International Journal of Science and Research* Vol 3(7): 826-832.
31. **Chouikh, A. Mayache, B. C.Maazi, M. Hedef, Y. Chefrour, A. 2015.** J. App. Pharm. Sci., 5(3), 29-34.
32. **Cimanga, K. Kambu, K. Tona, L. 2002.** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 79(2): 213–20.
33. **Crete., P. (1965).** *Précis de botanique*. Tome I : *Morphologie et reproduction des plantes vasculaires. Systématique des Cryptogames vasculaires et des Gymnospermes.* — Tome II : *Systématique des Angiospermes*, Paris Masson, Paris. Édition 2. pp. 245-246.
34. **Dendougui, H. Seghir, S. Jay, M. Benayache, F. Benayache, S. 2012.** *Arom.Plants, Int. J. Med.*, 2(4), 589-595.
35. **Dent, M. Verica, D-U. Peni, Mladen, B. Tomislav, B and Branka, L.2012.** The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. Faculty of Food Technology and Biotechnology, Pierottijeva Croatia
36. **Djebaili, S.1984 .** *Steppe algérienne. Phytosociologie et écologie*. Ed. OPU, Ben-Aknoun,Alger: 177

37. **Djenidi, H. 2012.** Etude du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.), essais de germination, extraction des polyphénols et activité antimicrobienne. Mémoire De Magister. Université Mohamed Khider-Biskra. pp 80
38. **Djeridane, A. Yousfi, M. Nadjemi, B. Boutassouna, D. Stocker, P. Vidal, N. 2006.** Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654–660.
39. **Dridi, N et Segueni, N. (2015).** Etude de l'effet antitoxique de l'extrait méthanolique de l'espèce *Cotula cinarea* vis à vis le pesticide Chlorpyrifos chez les rats *wistar albinos*. MEMOIRE Master Académique. universite echahid hamma lakhdar d'el-oued. el-oued. Algérie. P 94.
40. **Françoise, W. (1990).** *production de siderophores dans des sols acides et calcimagnésiques et alteration de mineraux (oxyhydroxydes, silicates) par des champignons ectomycorhiziens.* Docteur de l'Université de Nancy 1.France. Pp 13.
41. **Farnsworth, N. R. Akerele, O. Bingel , A. S. Soelartod, D. et Guo, Z. 1986.** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique, *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*.64(2) : 159-164.
42. **Filipe, G. 2010 .** Les glutarédoxines : de la réduction des peroxyrédoxines de type II aux systèmes d'assemblage des centres fer-soufre,thèse Doctrat, Université Henri Poincaré-Nancy I.p 70
43. **Garcia-Slas, P. Morales-Soto, A. Sequira-Carretero, A. & Fernández Gutiérrez, A. 2010.**Phenolic compound extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12): 8813-8826.
44. **Gaussen, H. Leroy, H. F. 1982.** *Précis de Botanique (végétaux supérieurs).* 2ème Ed.426.
45. **Ghedadba, N. Bousselsela, H. Hambaba, L. Benbia, S. Mouloud,Y.(2014).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L.*Phytothérapie* 12:15-24.
46. **Gherboudj, O.2014.** Étude phytochimique et activité antioxydante de *Matricaria pubescen*(Desf.) Sch. Bip. et *Chrysanthemum deserticum* Batt .& Trab. (ASTERACEAE), these Doctorat, *Université Constantine 1.*
47. **Gupta, D. 2015.** Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *IJPSR*, 6(2):546-566.

48. **Haioun,A .Hamoudi,F. 2015** . Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne *Anethumgraveolens* et leur effet cardioprotectrice .Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine.
49. **Hanifi, N.1991**. Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication de Actes éditions: 47-49.
50. **Haton.C, 2005**. Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale, Thèse de doctorat , l'université de Paris VI, France, pp : 43.
51. **Hoceini, M.2015**. Etude phytochimique de *Rosmarinus Officinalis* (L) et *Marrubium Vulgare* (L) (Aspect qualitatif), mmoire master ,université Ziane Achoue -djalfa.
52. **Hodek, P.Trefil, P. Stiborova, M.,2002**. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact*, 139: 1–21.
53. **Hopkins, WJ. 2003**.physiologie végétale (1 édition).Ed. De boek université. P514.
54. **Houérou, H.N.1969**. La végétation de la Tunisie steppique. Ann. Inst. Nat. Rech.Agron. Tunisie, 42: 1- 64
55. **Iacopini, P. Baldi, M. Storchi, P. Sebastiani, L. (2008)**. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions, *Journal of Food Composition and Analysis*, , Vol.21; pp 589– 598.
56. **Iloki-Assanga, S.B. Lewis-luján, L.M. Lara-Espinoza, C.L. Gil-Salido, A.A. Fernandez- Angulo, D. Rubio-Pino, J.L. Haines ,D.D. 2015**. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceros* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res. Notes*, 8: 396.
57. **Ionut-Florin, P.2016**.Valorisation des Activités biologiques de certaines espèces végétales sahariennes Nord-africaines.Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux. p152.
58. **ISERIN, P. 2001** - Encyclopédie des plantes médicinales. Ed.Larousse-Bordas, Paris : 275 p.
59. **Jaitak V, Sharma K, Kalia K, Kumar N, Singh H.P., Kaul V.K. and Singh B (2010)**. Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of western Himalaya. *J. Food. Composition. Anal* 23(2): 142-147.
60. **Judd, W.S. Campbell, C.S. Kelloug, E.A. et Stevens, P. 2002**. Botanique Systématique: une perspective phylogénétique; Ed 1: DEBOECK; p: 84-336.

61. **Julien, F.2002.** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire desThymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles :*Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. ,Thèse doctorat, Université Lausanne.
62. **Kim ,D.O. Jeong ,S. W. and Lee ,C. Y. 2003.** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81, 321-326.
63. **Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., De Groot, A., Evstatieva, L.N. (2001).** Screening of plant extracts for antioxidant activity: à comparative study on three testing methods, *Phytochem Anal*, Vol.13; pp 08-17.
64. **Kone, M. Bleyere, N.M. Yapo, A.P. Vangah, M.O. Ehile, E.E. 2009.** Evaluation de la toxicité d'un extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis*(Baille) urban (Humiriaceae) chez les rongeurs, une plante utilisée dans le traitement de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 3(6): 1286-1296.
65. **Larhsini, M. Markouk, M.. Jaouhari, J. T Bekkouche, K. Lazrek, H. B. Jana, M. 1999.** The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants.*Therapie*. 54(6),759-761.
66. **Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M (1995).** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.
67. **Lewis, K. & Ausubel, F.M. 2006.** Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature Biotechnology*, 24(12): 1504-1507.
68. **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. Randall, R. J. 1951 .** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
69. **Maisuthisakul,P., Suttajit, M., Pongsawatmmit, R. 2007.** Assessment of phenolic content and free radicalscavenging capacity of some Thai indigenous plants, *Food Chemistry* .Vol.100 : pp 140- 141.
70. **Maizak, K. Brac De La Perriere.R.A, et Hammiche, V. 1993.** Pharmacopée traditionnelleSahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg, p169-181.
71. **Majhenic, L. Kerget, M.S. Knez, Z. 2007.** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104: 1258-1268.
72. **Makhloufi ,A.2007.** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région d bechar(*matricaria pubescens* (desf.) et *rosmarinus officinalis* l) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. microbiologie et sécurité sanitaire des aliments. l'universite aboubaker belkaid. algérie. p131.

73. **Markom M., Hasan M., Daud W., Singh H. & Jahim J., 2007.** Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn. : Effects of solvents and extraction methods. *Separation Purif. Technol.*, 52: 487-496.
74. **Markouk, M. Lazrek, H. B.Jana ,M. 1999b.** Analgesic Effect of Extracts from *Cotula cinerea*(L). *phytother Res.*, 13(3), 229-230.
75. **Mebarki, L.2018.** Traditional uses, phytochemistry and biological activities of *Cotula cinerea* Del, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, ; 17 (2): 365-373
76. **Meddour A., Yahia M., Benkiki N., Ayachi A., 2013.** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis Spinosa* L. *Lebanese Science Journal*. Vol. (14): 49-60.
77. **Meziti, A.2007 .** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Étude invitro et in vivo. Mémoire de Magister, Université de Batna. p 71.
78. **Mibindzou Mouellet A., 2004.** - Screening phtochimique de deux espèces de plantes : *Crotalaria retusa* L (papilionaceae) et *Hallea ciliata* Aubrev & Pellegrer. (rubiaceae) récoltées au Gabon, thèse de doctorat, Mali, 58 p.
79. **Mohammedi, Z. & Atik, F. 2011.** Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1): 609-61
80. **Moon, JK. Shibamoto ,T. (2009)** Antioxidant assays for plant and food components. *J Agr Food Chem* 57: 1655–66.
81. **Nafia, D.B.R.I. Nieollon, A. Goff, L.K.L. and Had-Aissouni, L. (2005).** Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérable aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate. Implication sur la survie neuronale. *Cerebral oxydativestress: are astrocytes vulnerable to lowintacellular glutamate concentrations. Consequences for neuronal viability.* *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24: 502-509.
82. **NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2004b.** Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline M44-A, Wayne, Pennsylvania. *meridionales*.Vol II.Ed: centre nationale de la recherche scientifique, Paris. P 1170.
83. **Nedjmi ,A .Soussou ,A. 2014.** Caractérisations biochimiques de quelques plantes spontanées médicinales à travers des différents modes de séchage , Mémoire master, universite Kasdi Marbah –ouargla .pp61.
84. **Ouedraogo, S. 2001.** Politique économique et agriculture durable : analyse à partir du modèle récursif- CEDRES, université de Ouagadougou.

85. **Ould el hadj, M. Hadj mohammed, Mzabeirou, H. (2003).** place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est). *Courrier du savoir*, n°03, pp. 47-51
86. **Ousamur, N. Ksikis, C. (2016).** Fractionnement des extraits obtenus de deux plantes spontanées sahariennes et évaluation de leur activité antioxydante. Mémoire Master, Université Kasdi Merbah-Ouargla, p.56.
87. **Ozenda P, (2004).** Flore et végétation du Sahara. 3ème Ed. CNRS édition. 750005 Paris, 92, 438, 662.
88. **Ozenda, P. (1983).** Flore et végétation du Sahara. 1ère édition. Ed. C.N.R.S. Paris. P.662.
89. **Ozenda, P. (1993).** Flore et végétation du Sahara', éd. Paris.
90. **Park, E. J. Kim, Y. Kim, J. (2000).** Acylated flavonol glycosides from the flower of *Inula britannica*. *J. Nat Prod*, 63(1), 34-36.
91. **Perumal, S. Pillai, S. Cai, L. W. Mahmud, R. Ramanathan, S. (2012).** Determination of minimum inhibitory concentration of *Euphorbia hirta* (L.) by tetrazolium microplate assay. *Journal of Natural Products*, 5: 68-76.
92. **Prior, R. I., Wu, X. L., Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric Food Chem*, 53 (10): 4290-4302.
93. **Quezel, P. et Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, 1168 p.
94. **Radwane, A. Markouk, M. Lazrek, H. B. Amarouch, H. Jana, M. (1998).** Laboratory evaluation of molluscicidal activity of extracts from *Cotula cinerea* (L.) and *Quercus lusitania* var. *infectoria* galls (Oliv.). *Ann. Pharm. Fr.* 56(6), 274-276.
95. **Rhattas, M. Allal, D. Lahcen, Z. (2015).** Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc), *Journal of Applied Biosciences* 97:9187 – 9211
96. **Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp.
97. **Rodriguez, R. Towers, G. H. N. Mitchell, J. C. (1976).** Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15: 1573-1580.
98. **Sabin Charles., (2006).** La lectine PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa* : Structure, affinité et spécificité pour des ligands naturels et glycomimétiques. Thèse de doctorat. P. 14.

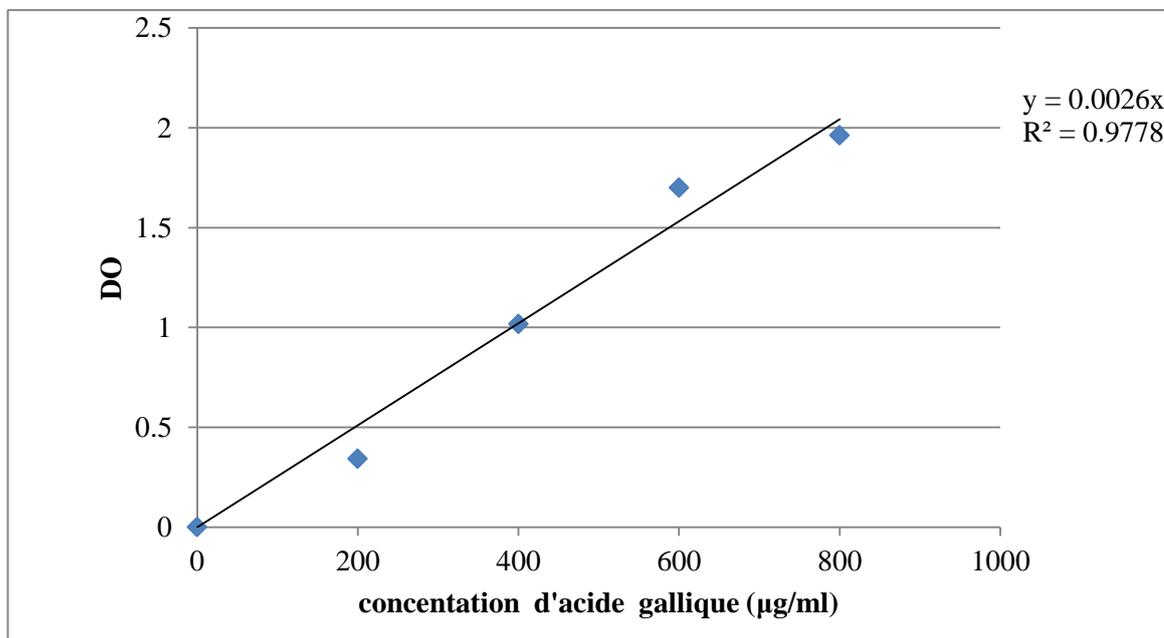
99. **Schofield ,P. Mbugua ,D.M. Pell ,A.N. 2001.** Analysis of condensed tannins: a review. *Anim Feed Sci Tech* 91, 21-40
100. **Seghir,S. Dendougui, H.Benayache. S. Benayache, F.2011.**«Des substances bioactives de *Cotula cinerea* (Del.) SIPM'2. Université Mentouri de Constantine.
101. **SFM, 2014.** Société Française de Microbiologie. www.sfm-microbiologie.org
102. **Siddiqui, MH., Mohamed Al-Whaibi, H., Mohammed Basalah, O.2010.** Role of nitric oxide in *tolerance of plants to abiotic stress*. *Protoplasma*, 248:447-455.
103. **Sun, B. Ricardo-Da-Silva, J. M. Spranger, I.1998.** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric. Food Chem*, 46 (10), 4267-4274.
104. **Szauffer-Hajdrych, M. Goślińska, O. 2004 .** The quantitative determination of phenolic acids and antimicrobial activity of *Symphoricarpos albus* (L.) Blake. *Jan-Feb;61(1):69-74.*
105. **Tadrent, W. Kabouche, A. Touzani, R. Kabouche, Z. 2014.** Chemotypes investigation of essential oils of “Guertoufa” herbs. *Journal of Materials and Environmental Science*. 5 (4),1200-1205
106. **Telli, A. 2017.**activite anti-oxidante, antimicrobienne,antidiabétique de deux especes spontanée utilisée dans le traitement de diabète dans la rigion de ouaregl :*Amoducus locotruchus* et *Anevilla radiata*..thèse doctorat. Université Kasdi Merbah-Ouargla.p230.
107. **Thaipong , K. Boonprakob ,U. Crosby, K. Cisneros-Zevallos, L. Hawkins Byrne, D. 2006.***J. Food CopositionAnd Analysis*, 19.
108. **TOUTAIN G., 1979 .** Elément d'agronomie saharienne. De la recherche au développement. Ed. Inst. Rech. Sah., cel . zone ar., Paris, 276 p.
109. **Trabut, L. MARES, R. 1906.** L'Algérie agricole en 1906. Ed J.Danguin, Tunis, 250 p.
110. **Usamur N., Ksikis C.,2016.** Fractionnement des extraits obtenus de deux plantes spontanées sahariennes et évaluation de leur activité antioxydante. Mémoire Master. Université Kasdi Merbah-Ouargla.
111. **Uttara, B.Singh, AV. Zamboni, P. (2009).** Oxidative stress and neurodegenerative diseases: à review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7: 65–74..
112. **Waltonn.J. et Broned.E.,1999.** Chemical from Plants: Perspectives on plantsecondary products, Ed: WORLD SCIENTIFIC, p: 1-14.

113. **Zabeirou, H. 2001** : Contribution à l'inventaire et à l'étude physico-chimique des plantes spontanées médicinales de la région de Ouargla .Ing. Agro. Sah. , INFS/AS, Ouargla, 90p.
114. **Zhishen ,J. Mengcheng ,T. Jianming ,W . 1999** .The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, 64, 555-559.

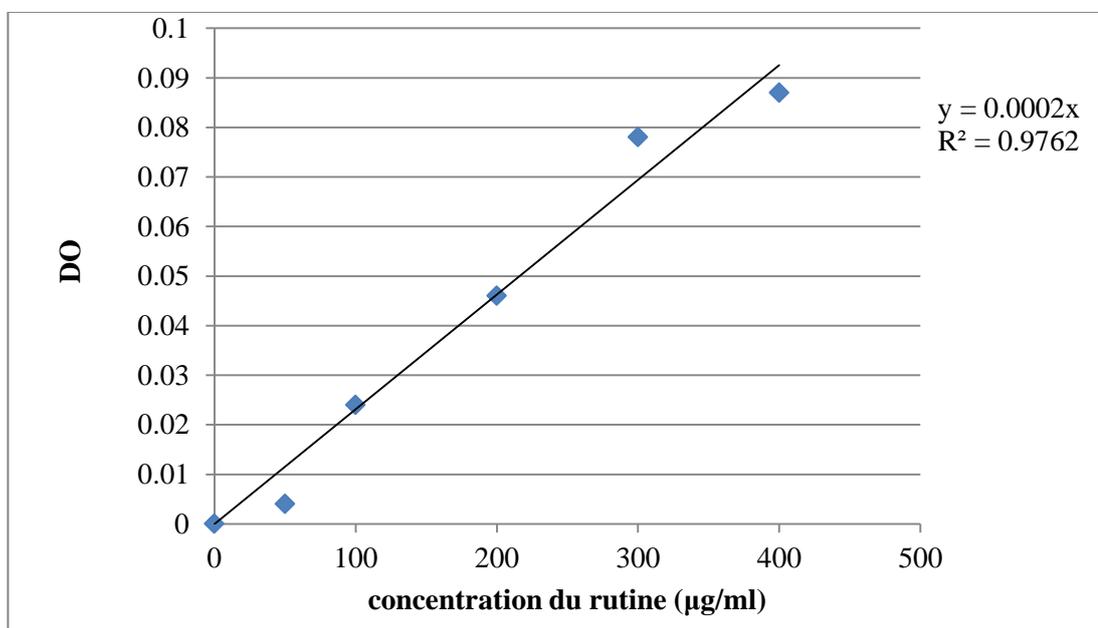
Annexes

Annexes

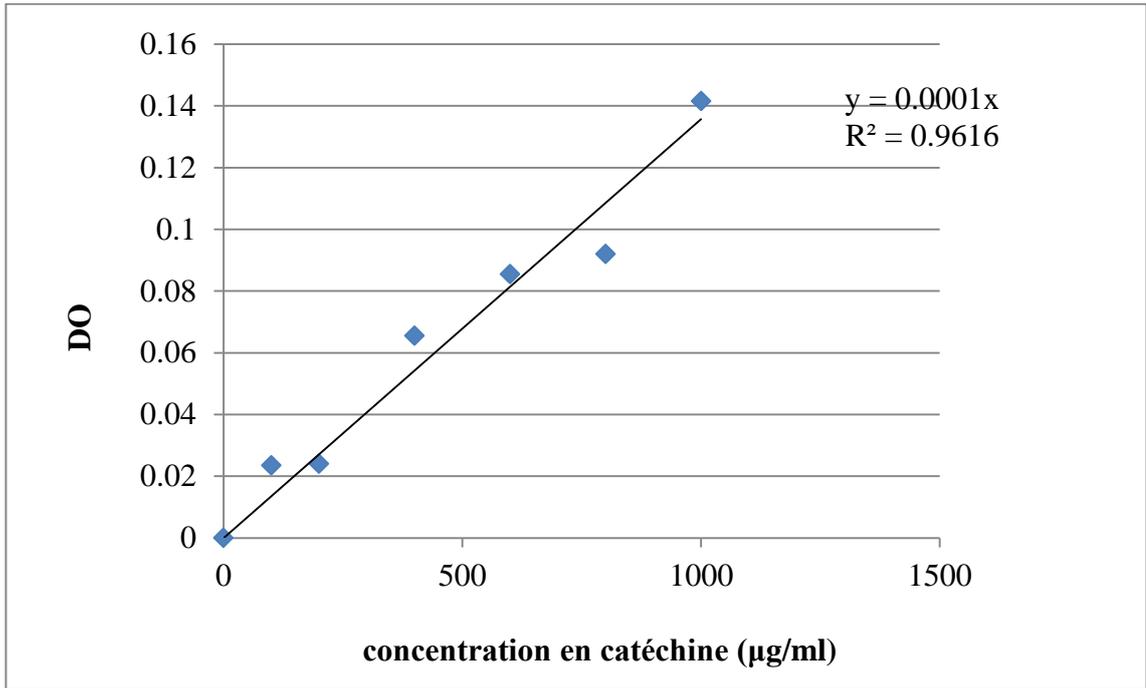
Annexe 01 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.



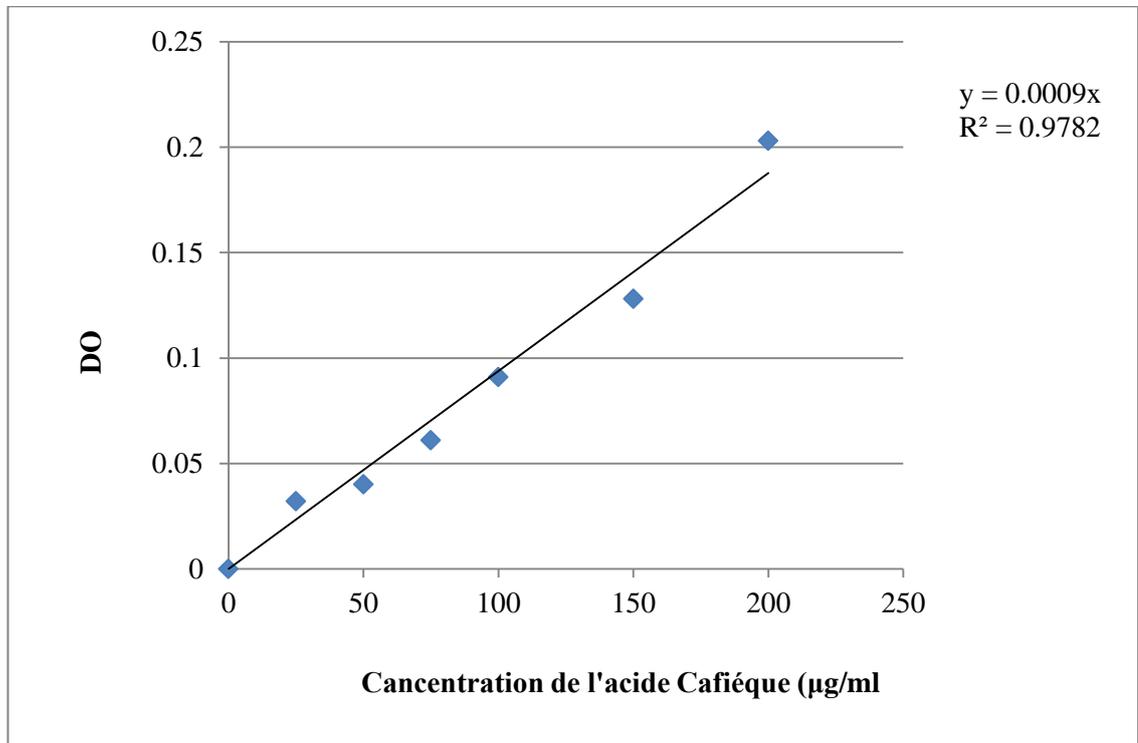
Annexe 02 : Courbe d'étalonnage de la rutine.



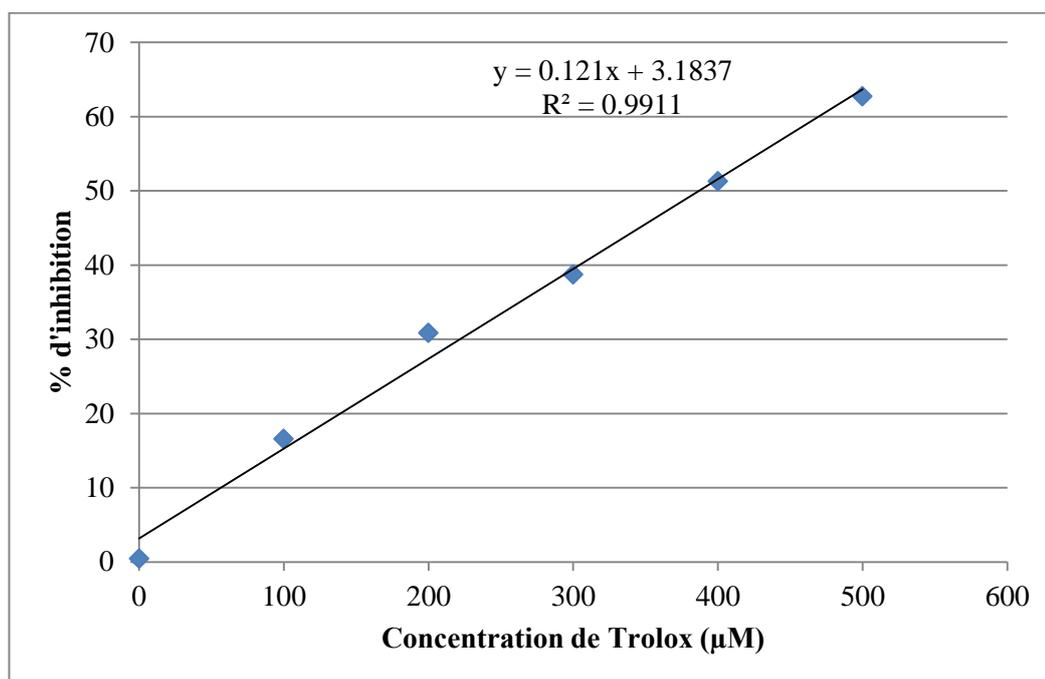
Annexe 03 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.



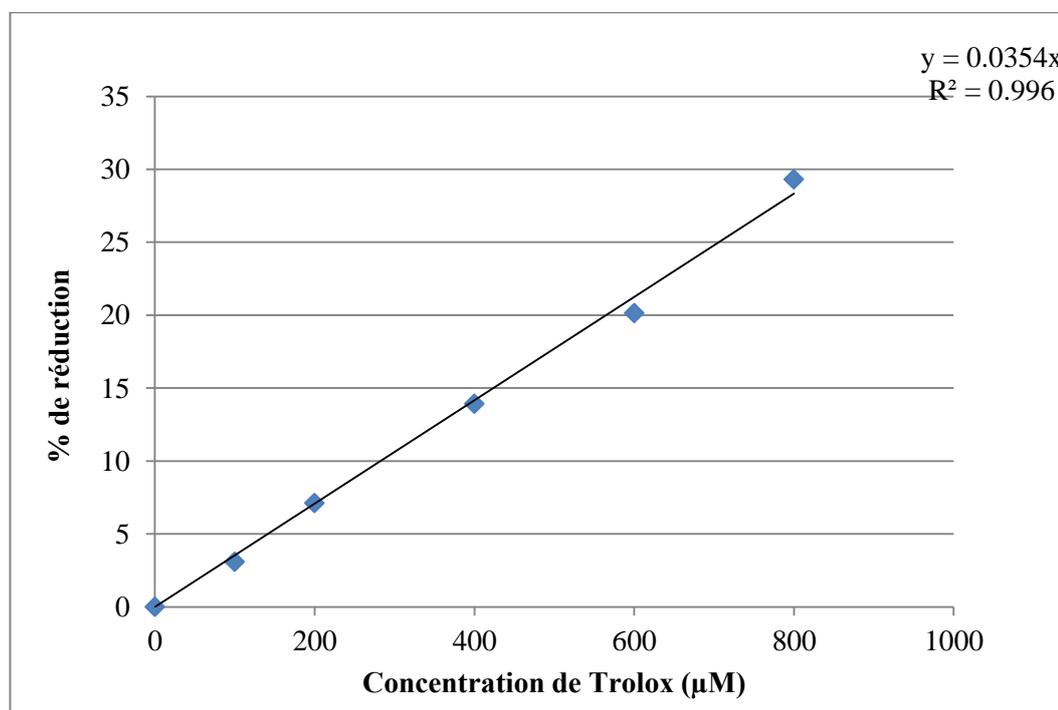
Annexe 04 : Courbe d'étalonnage de l'acide caféique.



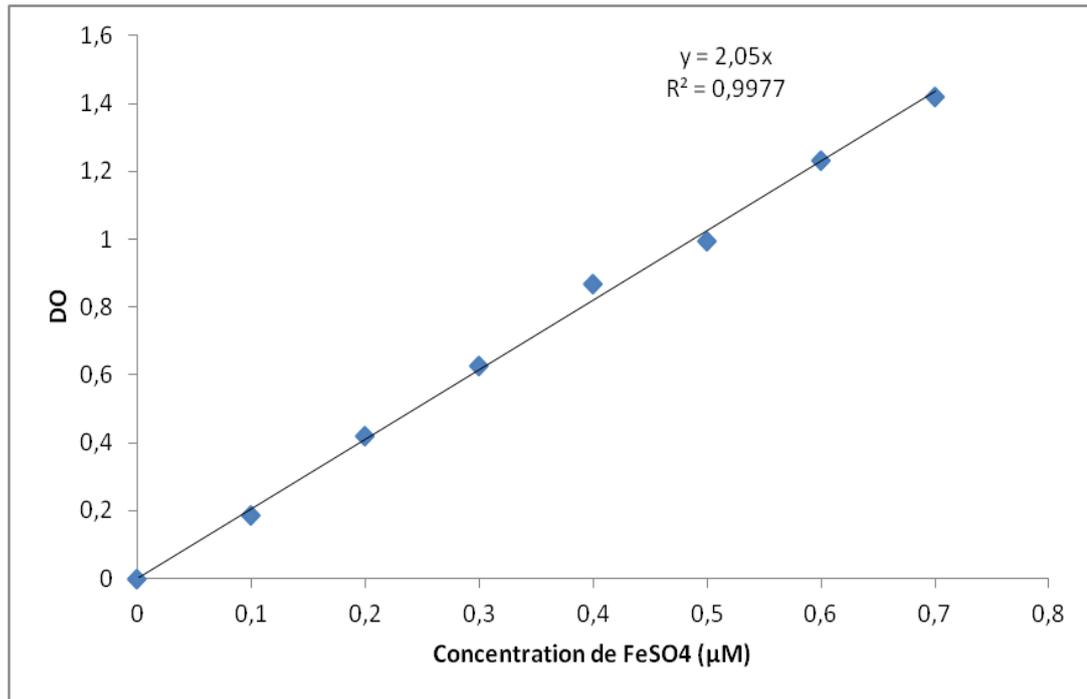
Annexe 05 : Courbe d'étalonnage de Trolox pour le test à l'ABTS.



Annexe 06 : Courbe d'étalonnage de Trolox pour le test FRAP.



Annexe 07 : Courbe d'étalonnage de FeSO4 pour le test FRAP.



Analyses statistiques

Annexe 08 : Corrélation entre les testes d'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques dans l'extrait de l'infusion

PPT I	FLV I	Ac Ph I	TC I	ABTS I	FRAP I	Béta I
1						
-0,608	1					
0,982	-0,446	1				
0,999	-0,570	0,990	1			
0,498	0,386	0,653	0,538	1		
0,600	0,271	0,741	0,637	0,993	1	
-0,959	0,357	-0,995	-0,971	-0,724	-0,803	1

Annexe 09: Corrélation entre les testes d'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques dans l'extrait de décoction

Matrice de corrélation (Pearson) :

Variabes	PPT D	FLV D	Ac Ph D	TC D	ABTS D	FRAP D	Béta D
PPT D	1						
FLV D	0,725	1					
Ac Ph D	-0,622	-0,990	1				
TC D	0,368	-0,373	0,499	1			
ABTS D	0,379	-0,362	0,488	1,000	1		
FRAP D	0,916	0,940	-0,884	-0,036	-0,024	1	
Béta D	-0,338	0,403	-0,526	-0,999	-0,999	0,068	1

Annexe 10 : Corrélation entre les testes d'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques dans l'extrait hydroéthanolique

Matrice de corrélation (Pearson) :

Variabes	PPT E	FLV E	Ac Ph E	TC E	ABTS E	FRAP E	Béta E
PPT E	1						
FLV E	-0,866	1					
Ac Ph E	0,326	0,190	1				
TC E	0,866	-0,500	0,755	1			
ABTS E	0,772	-0,986	-0,349	0,351	1		
FRAP E	-0,108	-0,403	-0,975	-0,591	0,548	1	
Béta E	-0,283	-0,234	-0,999	-0,725	0,391	0,984	1

