



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI - CONSTANTINE 1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALE

N° d'ordre : .....

N° de Série : .....

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Biologie Végétale

Spécialité : Production Végétale

Thème

**Etude Morphologique, Biochimique, Physiologique et Biologique de quelques populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* dans l'Est algérien**

Présentée par : **MALKI Samira**

Devant le jury :

|                     |                    |   |
|---------------------|--------------------|---|
| <b>Président :</b>  | Mr. D. KHELIFI     | Prof à Univ. Frères Mentouri - Constantine 1    |
| <b>Rapporteur :</b> | Mr. A. YAHIA       | Prof au Centre Univ. Abdelhafid Boussouf – Mila |
| <b>Examineurs:</b>  | Mr. H. GHERROUCHA  | Prof à Univ. Frères.Mentouri – Constantine 1    |
|                     | Mr. L. SAHAB       | Prof à Univ. Oum El Bouaghi                     |
|                     | Mr. A.A. OULDJAOUI | M.C. Univ. Oum El Bouaghi                       |

Soutenue le : 26/01/ 2017

Année : 2016/2017

***Je dédie ce modeste travail à,***

*La mémoire de ma chère mère,  
Mon cher frère omar,  
Mes chères sœurs soulef et wafia,  
et à tous ceux qui me sont chers.*

*Samira*

## Remerciements

Je remercie tout d'abord Allah qui m'a donné la santé et le courage pour terminer cette thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à ma directeur de thèse Pr. A. YAHIA pour la confiance qu'elle m'a témoignée, et il a constamment porté un regard ouvert et constructif sur mes travaux.

Je remercie Prof. D. KHELIFI Directeur du Laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologies Végétales (Université Frères Mentouri, Constantine 1) qui m'a honoré en acceptant d'être président de ce jury, je tiens à le remercier pour sa contribution à la réalisation de l'étude biochimique.

Je tiens à présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements aux membres de Jury Prof. H. GHERROUCHA, Prof. L. SAHAB et Dr. A.A. OULDJAOUI et d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Ma reconnaissance va également à Mr. Chekara Bouziani Mohamed qui m'a énormément aidé dans la partie biochimique et m'a fait bénéficier de son expérience dans ce domaine sans hésitation.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements (Ali, Sorya, Hanane, Sonia, Souad, Asma, Imene).

## Résumé

L'objet de notre travail a porté sur l'étude de *Teucrium polium* L. *Capitatum* une plante médicinale très répandue dans les steppes algériennes. Plusieurs volets d'étude ont été touchés tels que l'aspect morphologique, les constituants physio-biochimiques, et les effets biologiques.

Les analyses morphologiques ont porté sur dix populations échantillonnées dans différents biotopes de l'Est algérien. Cette étude a montrée que les feuilles ont le plus faible nombre (cinq sur dix) de types de trichomes, suivies par les calices et les corolles avec huit types chacun. Ce qui confirme l'absence d'une variabilité intraspécifique chez les populations examinées. D'autre part, l'analyse des relations entre les caractères morphologiques et les facteurs du milieu d'origine, ont permis de montrer que le biotope intervient sur la longueur des trichomes.

L'utilisation de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle sur gel polyacrylamide en présence d'un détergent (SDS-PAGE) a permis de déterminer les profils des protéines totales des dix populations. Les coefficients de similitude des bandes polypeptidiques obtenus montrent des similitudes élevées entre les populations étudiées.

Les analyses biochimiques sur les trois phénotypes de *Teucrium polium* L. *Capitatum* ont montré que les extraits des phénotypes mauves sont les plus riches en anthocyanines, en sucres solubles et en caroténoïdes par rapport aux phénotypes rose et blanc mettant ainsi l'importance de la couleur de la fleur.

La combinaison de certaines méthodes d'analyses chimiques; spectrophotométrie (UV) et chromatographique (CLHP) ont permis d'identifier 3 flavonoïdes dont un majoritaire la cyanidine et deux autres flavonoïdes; la quercétine et l'acide caféique.

L'évaluation du pouvoir antioxydant qui a été réalisée en utilisant les méthodes du piégeage du radical libre DPPH et celle de la réduction du fer FRAP a indiqué que l'extrait de la population de Biskra a montré une meilleure capacité réductrice par rapport à celui de Sétif et un fort piégeage des radicaux DPPH●.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne, il apparait que les extraits des deux populations possèdent des propriétés antibactériennes acceptables.

L'évaluation de l'effet pharmacologique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* a mis en évidence une propriété diurétique intéressante.

**Mots clés:** *Teucrium polium* L. *Capitatum*, Lamiaceae, trichome, électrophorèse, CLHP, polyphénols, activité antioxydante, activité antibactérienne, effet diurétique.

## ملخص

الهدف من هذا البحث هو دراسة مرفولوجية، كيميائية، فيزيولوجية و بيولوجية لنبته طبية معروفة في السهوب الجزائرية باسم *Teucrium polium L. Capitatum*. التحاليل المرفولوجية تناولت بالدراسة 10 عشائر من مناطق مختلفة من الشرق الجزائري، أوضحت النتائج أن الأوراق تمتلك أكبر عدد من أنماط الأوبار (5 من 10 أنماط)، يليها السبلات و البتلات ب: 8 أنماط لكل عضو، الأمر الذي يبين غياب التنوع تحت النوعي بين العشائر المدروسة، ومن جهة أخرى، تحاليل الارتباطات بين الخصائص المرفولوجية و العوامل البيئية سمحت بتأثير وسط المعيشة على أطوال الأوبار.

استخدام تقنية الفصل الكهربائي أحادية الأبعاد بهلام متعدد الأكريلاميد في وجود SDS-PAGE، سمحت بتحديد ملامح البروتينات الكلية للعشائر المدروسة، حيث جاءت نسبة التجانس عالية بين وحدات متعدداً البيئي.

أما التحاليل الفيزيو كيميائية لأنماط المظهرية الثلاثة لنبته *Teucrium polium L. Capitatum* بينت أن مستخلصات النمط المظهري البنفسجي هي الأكثر وفرة من الأنتوسيانين، السكريات المنحلة و الكاروتينويدات مقارنة مع النمطين المظهرين الوردية و الأبيض.

التداخل بين طرق التحليل الكيميائي: جهاز الطيف الضوئي (UV-visible) و الكروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء (CLHP)، ساعد في تحديد 3 فلافونويدات أغلبها cyanidine، و الفلافونويدات المتبقية عبارة عن: quercétine و acide caféique.

فيما يخص تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بطريقتي: محاصرة الجذر الحر DPPH و إرجاع الحديد (FRAP) أظهرت تفوق لمستخلص الايثانولي لنبات منطقة بسكرة على نظيره من منطقة سطيف.

أما النشاط المضاد للبكتيريا، أثبت أن كلا المستخلصين لمنطقتي بسكرة و سطيف يملكان خصائص مضادة للبكتيريا مقبولة.

و أخيراً تم تثمين الدور الصيدلاني للنبته من خلال إظهار ادرارها للبول.

**الكلمات المفتاحية:** *Teucrium polium L. Capitatum*، العائلة الشفوية، الأوبار، الفصل الكهربائي، CLHP، الوظيفة المضادة للأكسدة، الوظيفة المضادة للبكتيريا، فعل ادرار البول.

## ABSTRACT

The purpose of our work has focused on the study of *Teucrium polium* L. *Capitatum*, which is a widespread medicinal plant in Algerian steppes. Several study topics were investigated such as the morphology, physio-biochemical constituents and biological effects.

The morphological analysis consisted of ten populations sampled at different habitats in eastern Algeria. This study revealed that the leaves have the lowest number (five out of ten) of types of trichomes, followed by the calyx and corolla with eight types for each. This confirms the absence of intraspecific variability within the study populations. Furthermore, the analysis of relationships between morphological characteristics and environmental factors of their habitat showed that the latter influences the length of trichomes.

The use of one-dimensional electrophoresis technique on polyacrylamide gel in the presence of detergent (SDS-PAGE) allowed to determine the total protein profiles of the ten study populations. The similarity coefficients of polypeptide bands indicated high similarity between populations.

Biochemical analyzes of the three phenotypes of *T. polium* L. *Capitatum* showed that extracts of purple phenotypes were richest in anthocyanins, soluble sugars and carotenoids compared with pink and white phenotypes enlightening there by the importance of flower color.

The combination of certain chemical analysis methods, spectrophotometry (UV-visible) and chromatographic (HPLC) have identified three flavonoids including mostly the cyanidin and two other flavonoids, quercetin and caffeic acid.

The evaluation of the antioxidant potency, that was conducted using the method of trapping the free radical DPPH and that of iron reduction FRAP, revealed that the extract of Biskra population showed higher reducing capacity compared to that of Sétif, with a strong trapping of DPPH• radicals.

As regards to the antibacterial activity, it appears that extracts from two populations have acceptable antibacterial properties.

The pharmacological effect of *T. polium* L. *Capitatum* showed an interesting diuretic property.

**Keywords:** *Teucrium polium* L. *Capitatum*, Lamiaceae, trichomes, electrophoresis, HPLC, polyphenols, antioxidant activity, antibacterial activity, diuretic effect.

## Table des matières

|  |             |
|--|-------------|
| <i>Résumés</i> .....   | <i>i</i>    |
| <i>Table des matières</i> .....  | <i>iv</i>   |
| <i>Liste des tableaux</i> .....  | <i>viii</i> |
| <i>Liste des planches</i> .....  | <i>ix</i>   |
| <i>Liste des figures</i> .....   | <i>x</i>    |
| <i>Liste des abréviations</i> .....  | <i>xii</i>  |
| <i>Liste des annexes</i> .....   | <i>xiii</i> |
| <b>Introduction générale</b> .....   | <b>1</b>    |
| <b>Chapitre 1 : Recherche bibliographique</b>  |             |
| <b>I. Etude ethnobotanique de la plante <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i></b> ..... | <b>3</b>    |
| Introduction.....  | 3           |
| 1. Caractères morphologiques de <i>Teucrium polium</i> ssp. <i>Capitatum</i> .....           | 3           |
| 2. Taxonomie et systématique.....  | 4           |
| 3. Habitat et répartition géographique.....  | 5           |
| 4. Noms vernaculaires.....   | 5           |
| 5. Données phytochimiques de la plante.....  | 5           |
| 6. Utilisations en médecine traditionnelle.....  | 6           |
| 7. Données pharmacologiques.....   | 6           |
| 8. Données toxicologiques.....   | 7           |
| <b>II. Les trichomes</b> .....   | <b>7</b>    |
| Introduction.....  | 7           |
| 1. Données anatomiques.....  | 8           |
| 2. Développement des trichomes.....  | 11          |
| 2.1. Initiation et morphogenèse des trichomes.....   | 11          |
| 2.2. Bases moléculaires de la formation des trichomes.....                                   | 12          |
| 3. Rôle.....   | 14          |
| 3.1. Trichomes glandulaires.....   | 14          |
| 3.2. Trichomes non-glandulaires.....   | 18          |
| <b>III. Métabolisme secondaire</b> .....   | <b>19</b>   |
| Introduction.....  | 19          |
| 1. Composés phénoliques.....   | 19          |
| 2. Les flavonoïdes.....  | 21          |
| 2.1. Généralités sur les flavonoïdes.....  | 21          |
| 2.2. Structure et classification.....  | 22          |
| 2.3. Rôle des flavonoïdes.....   | 25          |
| 2.3.1. Propriétés chez les plantes.....  | 25          |
| 2.3.2. Propriétés pour la santé humaine et l'industrie.....                                  | 26          |
| 2.4. Les pigments anthocyaniques.....  | 27          |
| 2.4.1. Biosynthèse des anthocyanes.....  | 28          |
| 2.4.2. Types d'anthocyanes.....  | 31          |
| 2.4.3. Changements de structure.....   | 33          |
| A. pH du milieu.....   | 33          |

|  |    |
|--|----|
| B. Le degré de substitution.....   | 34 |
| C. Interactions avec les ions métalliques.....                                 | 35 |
| 2.4.4. Accumulation d’anthocyanes suite à un stress biotique ou abiotique..... | 36 |

## **Chapitre 2: Matériel et méthodes**

### **I. Etude morphologique et biochimique**

|   |    |
|---|----|
| 1. Matériel végétal.....  | 38 |
| 2. Etude des trichomes .....  | 39 |
| 2.1. Méthodologie utilisée pour décrire et classifier les trichomes ..... | 39 |
| 2.2. Détermination de la longueur des trichomes.....                      | 41 |
| 3. Etude des grains de pollen.....  | 42 |
| 3.1. Extraction des grains de pollen.....                                 | 42 |
| 3.2. Préparation des lames.....   | 42 |
| 3.3. Observation microscopique.....                                       | 43 |
| 3.4. Paramètres étudiés .....   | 43 |
| 3.5. Vérification de l’identification .....                               | 43 |
| 3.6. Prises des photos.....   | 43 |
| 4. Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE.....                 | 44 |
| 4.1. Principe .....   | 44 |
| 4.2. Extraction des protéines .....                                       | 44 |
| 4.3. Lecture des diagrammes.....  | 45 |

### **II. Etude physio-biochimique** .....

|   |    |
|---|----|
| 1. Situation géographique de site d’étude.....                                      | 45 |
| 2. Données climatiques d’Oum El Bouaghi.....  | 46 |
| 3. Méthodes d’analyse du sol.....   | 47 |
| 4. Analyses physio- biochimiques .....  | 48 |
| 4.1. Matériel végétal .....   | 48 |
| 4.2. Dosage des anthocyanines.....  | 49 |
| 4.3. Dosage des Pigments photosynthétiques.....                                     | 49 |
| 4.4. Dosage des sucres totaux (méthode au phénol-sulfurique).....                   | 49 |
| 5. Identification spectrale des produits isolés.....                                | 50 |
| 5.1. Spectroscopie infrarouge (IR).....   | 50 |
| 5.2. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance..... | 51 |
| 5.3. Analyse spectrophotométrique UV-visible.....                                   | 52 |

### **III. Les activités biologiques**.....

|  |    |
|--|----|
| 1. Matériel végétal .....  | 54 |
| 2. Screening phytochimique.....  | 55 |
| 3. Protocole d’extraction des flavonoïdes.....                           | 59 |
| 4. Etude quantitative.....   | 59 |
| 4.1. Dosage des polyphénols totaux.....                                  | 59 |
| 4.1. Dosage des flavonoïdes.....   | 60 |
| 5. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de la plante.....      | 61 |
| 5.1. Réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power).....     | 61 |
| 5.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)..... | 63 |
| 6. Test d’activité antibactérienne .....                                 | 64 |
| 6.1. La méthode de diffusion .....                                       | 64 |
| a. Définition de l’antibiogramme.....                                    | 64 |



|  |           |
|--|-----------|
| b. Méthode.....  | 66        |
| c. La lecture .....  | 67        |
| 6.2. Détermination des CMI ( <i>Concentration Minimale Inhibitrice</i> .....                     | 67        |
| 6.3. Détermination des CMB ( <i>Concentration Minimale bactéricide</i> ).....                    | 69        |
| 7. Détermination de l'activité diurétique.....   | 69        |
| 7.1. Matériel végétal.....   | 69        |
| 7.2. Animaux et produits chimiques.....  | 70        |
| 7.3. Etude de l'activité diurétique.....   | 70        |
| 7.4. Mode opératoire .....   | 70        |
| <b>IV. Etude statistique.....</b>  | <b>71</b> |
| <br><b>Chapitre 3 : Résultats et discussion</b>  |           |
| <b>Première partie: Etude morphologique et biochimique de <i>Teucrium polium</i> L. ssp.</b>     |           |
| <b><i>Capitatum</i> dans l'Est algérien .....</b>  | <b>72</b> |
| <b>I. Etude morphologique.....</b>   | <b>72</b> |
| 1. Détermination des types de trichome.....  | 72        |
| 1.1. Poils glandulaires.....   | 72        |
| 1.2. Poils non glandulaires.....   | 73        |
| A. Trichomes simples et non-ramifiés.....  | 73        |
| B. Trichomes embranchés.....   | 73        |
| 2. Détermination de la longueur des trichomes.....   | 80        |
| 3. Analyse en composantes principales.....   | 82        |
| 3.1. Cercle des corrélations.....  | 82        |
| 3.2. Diagramme des individus.....  | 84        |
| 4. Description des grains de pollen.....   | 86        |
| 5. La morphologie des noix.....  | 87        |
| <b>II. Etude du polymorphisme des protéines de réserve .....</b>                                 | <b>89</b> |
| 1. Indices de similarité .....   | 91        |
| 2. Classification hiérarchique des populations de <i>Teucrium polium</i> L.....                  | 93        |
| <br><b>Deuxième partie: Etude physio-biochimique de la plante <i>Teucrium polium</i> L. ssp.</b> |           |
| <b><i>Capitatum</i>.....</b>   | <b>96</b> |
| 1. Données climatiques de la zone d'étude.....   | 96        |
| 1.1. Précipitations.....   | 96        |
| 1.2. Températures.....   | 96        |
| 1.3. Indice d'aridité.....   | 97        |
| 1.4. Données climatiques de l'année d'étude 2011.....  | 97        |
| 1.4.1. Précipitations .....  | 97        |
| 1.4.2. Température.....  | 97        |
| 1.4.3. Le vent.....  | 98        |
| 1.4.4. Diagramme ombrothermique.....   | 98        |
| 2. Caractérisation physico-chimique du sol de la station de Sidi Rghiss (Oum El Bouaghi).....    | 99        |
| 3. Les paramètres biochimiques étudiés .....   | 102       |
| 3.1. Teneurs des anthocyanines.....  | 102       |

|   |     |
|---|-----|
| 3.2. Teneurs en sucres solubles.....  | 103 |
| 3.3. Variations des pigments photosynthétiques.....   | 106 |
| 2.3.1. Teneurs en chlorophylles (A+B).....  | 106 |
| 2.3.2. Teneurs en caroténoïdes.....   | 107 |
| 2.3.3. Rapport carot / chl.....   | 108 |
| 3.4. Corrélation entre les paramètres physio-biochimiques étudiés.....                          | 109 |
| 4. Interprétation des données spectrales.....   | 110 |
| 4.1. Spectres IR.....   | 110 |
| 4.2. Caractérisation par CLHP.....  | 111 |
| 4.3. Spectre UV.....  | 112 |
| <br>  |     |
| <b>Troisième partie : Evaluation des activités biologiques de <i>Teucrium polium</i> L ssp.</b> |     |
| <b>Capitulum</b> .....  | 116 |
| 1. Screening phytochimique .....  | 116 |
| 2. Rendements et teneurs des composés phénoliques.....  | 117 |
| 2.1. Rendement des extraits bruts.....  | 117 |
| 2.2. Dosage des phénols totaux.....   | 117 |
| 2.3. Dosage des flavonoïdes.....  | 119 |
| 3. Pouvoir antioxydant des composés phénoliques.....  | 120 |
| 3.1. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power).....                           | 120 |
| 3.2. Piégeage du radical libre DPPH.....  | 122 |
| 4. Détermination de l'activité antibactérienne.....   | 125 |
| 4.1. Résultats de l'antibiogramme.....  | 125 |
| 4.2. Détermination de la CMI (Concentration minimale inhibitrice) .....                         | 129 |
| 4.3. Détermination de la CMB (Concentration minimale bactéricide) .....                         | 130 |
| 5. Détermination de l'activité diurétique.....  | 131 |
| 5.1. Elimination de la surcharge hydrique.....  | 131 |
| 5.2. L'excrétion de Na <sup>+</sup> .....   | 132 |
| 5.3. L'excrétion de K <sup>+</sup> .....  | 133 |
| 5.4. L'excrétion de Cl <sup>-</sup> .....   | 134 |
| <br>  |     |
| <b>Conclusion générale et perspectives</b> .....  | 136 |
| <b>Références bibliographiques</b> .....  | 140 |
| <b>Annexes</b> .....  | 182 |

| <b>Liste des tableaux</b>  | <b>Page</b> |
|--|-------------|
| <b>Tableau 1:</b> Quelques anthocyanidines naturelles  | <b>32</b>   |
| <b>Tableau 2:</b> Caractéristiques données bioclimatiques des sites des récoltes   | <b>38</b>   |
| <b>Tableau 3:</b> Interprétation des déplacements de BI et BII   | <b>54</b>   |
| <b>Tableau 4:</b> Les différentes dilutions de la solution mère  | <b>68</b>   |
| <b>Tableau 5:</b> Carrés moyens de l'analyse de variance de la longueur des trichomes  | <b>81</b>   |
| <b>Tableau 6:</b> Matrice des coefficients de corrélation des différentes variables analysées  | <b>83</b>   |
| <b>Tableau 7:</b> Etude des variations des différentes variables analysées par l'ACP   | <b>84</b>   |
| <b>Tableau 8:</b> Description des grains de pollen de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i>   | <b>86</b>   |
| <b>Tableau 9:</b> Caractères morphologiques des noix et leurs induments  | <b>87</b>   |
| <b>Tableau 10:</b> Diagrammes types des populations de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i>  | <b>90</b>   |
| <b>Tableau 11:</b> Indices de similarité des populations de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> selon les diagrammes électrophorétiques | <b>92</b>   |
| <b>Tableau 12:</b> Variations mensuelles et moyennes des précipitations (Oum El Bouaghi 2001 à 2011)   | <b>96</b>   |
| <b>Tableau 13:</b> Variations mensuelles et moyennes des températures (Oum El Bouaghi 2001 à 2011)   | <b>97</b>   |
| <b>Tableau 14:</b> Variations moyennes des précipitations des 8 mois d'étude (Oum El Bouaghi)  | <b>97</b>   |
| <b>Tableau 15:</b> Variations moyennes des températures des 8 mois d'étude (Oum El Bouaghi)  | <b>98</b>   |
| <b>Tableau 16:</b> Variations des vents des 8 mois d'étude (Oum El Bouaghi)  | <b>98</b>   |
| <b>Tableau 17:</b> Caractérisation du sol de la station de Sidi Rghiss (Oum El Bouaghi)  | <b>100</b>  |
| <b>Tableau 18:</b> Carrés moyens de l'analyse de variance des paramètres physio-biochimiques   | <b>103</b>  |
| <b>Tableau 19:</b> Carrés moyens de l'analyse de variance des pigments photosynthétiques   | <b>106</b>  |
| <b>Tableau 20:</b> Matrice des coefficients de corrélation des différentes variables analysées   | <b>109</b>  |
| <b>Tableau 21:</b> Temps de rétention des différents témoins polyphénoliques obtenus par la séparation avec CLHP                               | <b>111</b>  |
| <b>Tableau 22:</b> Valeurs des pics correspondent aux BI et BII  | <b>113</b>  |
| <b>Tableau 23:</b> Résultats du screening phytochimiques de <i>Teucrium polium</i> L.  | <b>116</b>  |

*Capitatum*

|  |            |
|--|------------|
| <b>Tableau 24:</b> Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne par les deux extraits de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> (en mm)          | <b>125</b> |
| <b>Tableau 25:</b> Effet de l'administration orale de l'extrait éthanolique de <i>Teucrium polium</i> L. sur le volume des urines                                    | <b>132</b> |
| <b>Tableau 26:</b> Effet de l'administration orale de l'extrait éthanolique de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> sur l'excrétion des électrolytes urinaires | <b>133</b> |

**Liste des planches**

**Page**

|  |              |
|--|--------------|
| <b>Planche 1:</b> Fiche descriptive des trois phénotypes étudiés de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> | <b>48</b>    |
| <b>Planche 2:</b> Poils glandulaires   | <b>74-75</b> |
| <b>Planche 3:</b> Poils non glandulaires, trichomes simples et non-ramifiés                                    | <b>76</b>    |
| <b>Planche 4:</b> Poils non glandulaires, trichomes embranchés   | <b>77</b>    |

| <b>Liste des figures</b>  | <b>Page</b> |
|---|-------------|
| <b>Figure 1:</b> <i>Teucrium polium</i> L. ssp. <i>Capitatum</i>  | 4           |
| <b>Figure 2:</b> Exemples des trichomes non-glandulaires et glandulaires  | 9           |
| <b>Figure 3 :</b> Trichomes glandulaires capitaux et peltés de <i>Teucrium polium</i> L.  | 10          |
| <b>Figure 4:</b> Etapes de la différenciation des glandes peltées de <i>Mentha X Piperita</i>   | 11          |
| <b>Figure 5 :</b> Régulation moléculaire du développement des trichomes   | 14          |
| <b>Figure 6:</b> Trichomes glandulaires capités et peltés de <i>Lavandula pinnata</i>   | 15          |
| <b>Figure7:</b> Schéma simplifié de la biosynthèse les principaux métabolites secondaires stockés et/ou sécrétés par les cellules des trichomes glandulaires de la tomate | 17          |
| <b>Figure 8:</b> Classification de quelques métabolites secondaires   | 21          |
| <b>Figure 9:</b> Structure générale des flavonoïdes   | 22          |
| <b>Figure 10:</b> Formule générale des familles de flavonoïdes  | 22          |
| <b>Figure 11:</b> Différentes classes des flavonoïdes   | 24          |
| <b>Figure 12:</b> Groupements chromophores des flavonoïdes  | 25          |
| <b>Figure 13:</b> Voie de biosynthèse des anthocyanes à partir de la phénylalanine  | 30          |
| <b>Figure 14:</b> Un dérivé de la cyanidine de trois glycosides conjugués   | 32          |
| <b>Figure 15:</b> Forme des anthocyanes en fonction du pH   | 34          |
| <b>Figure 16:</b> Squelette flavylum  | 35          |
| <b>Figure 17:</b> Protagonistes du pigment supramoléculaire commélinine   | 36          |
| <b>Figure 18:</b> Carte bioclimatique de l'Algérie  | 39          |
| <b>Figure 19:</b> Poils sécréteurs capités des Lamiacées  | 40          |
| <b>Figure 20:</b> Poils sécréteurs peltés des Lamiacées   | 41          |
| <b>Figure 21:</b> Carte de localisation de la zone d'étude Djebel Sidi Rghiss à la wilaya d'Oum El Bouaghi  | 45          |
| <b>Figure 22:</b> Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH)                  | 62          |
| <b>Figure 23:</b> Structure de DPPH● et mécanisme de sa réduction par un antioxydant  | 63          |
| <b>Figure 24:</b> Variation de la longueur des trichomes des feuilles chez les 10 populations étudiées  | 90          |
| <b>Figure 25:</b> Variation de la longueur des trichomes des calices chez les 10 populations étudiées   | 81          |
| <b>Figure 26:</b> Cercle des corrélations   | 82          |
| <b>Figure 27:</b> Diagramme des individus   | 85          |

|   |                 |
|---|-----------------|
| <b>Figure 28:</b> Les grains de pollen de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i>  | <b>87</b>       |
| <b>Figure 29:</b> Akène de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> (x5)  | <b>88</b>       |
| <b>Figure 30:</b> Electrophorégrammes des différentes populations de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> collectées en Algérie           | <b>89</b>       |
| <b>Figure 31:</b> Classification hiérarchique des populations de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i>                                     | <b>93</b>       |
| <b>Figure 32:</b> Diagramme ombrothermique pour la période d'étude (Oum El Bouaghi, 2011)   | <b>99</b>       |
| <b>Figure 33:</b> Teneur en anthocyanines chez les trois phénotypes étudiés   | <b>103</b>      |
| <b>Figure 34:</b> Teneur en sucres solubles chez les trois phénotypes étudiés   | <b>104</b>      |
| <b>Figure 35:</b> Teneur en chlorophylles A+B chez les trois phénotypes étudiés   | <b>106</b>      |
| <b>Figure 36:</b> Teneur en caroténoïdes chez les trois phénotypes étudiés  | <b>107</b>      |
| <b>Figure 37:</b> Rapport chlorophylles carot/ chlo tot chez les trois phénotypes étudiés   | <b>108</b>      |
| <b>Figure 38:</b> Spectres IR (4000-700 cm <sup>-1</sup> ) réalisés sur pastilles de KBr  | <b>110</b>      |
| <b>Figure 39:</b> Chromatogramme d'CLHP de l'extrait de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i>  | <b>112</b>      |
| <b>Figure 40:</b> Spectres UV de l'extrait de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i>  | <b>114-115</b>  |
| <b>Figure 41:</b> Cyanidine   | <b>115</b>      |
| <b>Figure 42:</b> Rendements d'extraction des deux plantes  | <b>117</b>      |
| <b>Figure 43:</b> Teneurs en polyphénols totaux dans les deux extraits étudiés  | <b>118</b>      |
| <b>Figure 44:</b> Teneur en flavonoïdes dans les extraits bruts   | <b>119</b>      |
| <b>Figure 45:</b> Pouvoir réducteur des extraits bruts par la méthode FRAP  | <b>121</b>      |
| <b>Figure 46:</b> Relation entre le pouvoir réducteur total et les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes                                     | <b>122</b>      |
| <b>Figure 47:</b> L'activité antioxydante des extraits bruts et de l'acide ascorbique par la méthode DPPH                                       | <b>123</b>      |
| <b>Figure 48:</b> Relation entre l'activité antioxydante et les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes  | <b>124</b>      |
| <b>Figure 49:</b> Effet de l'extrait éthanolique de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> sur les différentes souches bactériennes testées | <b>126- 127</b> |
| <b>Figure 50:</b> Résultats de CMI des produits actifs sur les bactéries  | <b>129-130</b>  |
| <b>Figure 51:</b> Résultats de CMB des produits actifs sur les bactéries  | <b>130-131</b>  |

## Liste des abréviations

**Abs** : Absorbance

**Cm** : Centimètre

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**DL50** : Dose Létale 50

**CLHP** : Chromatographie Liquide à Haute Performance

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

**DO** : densité optique

**EDTA** : acide éthylène diamine tétracétique

**Et OH** : Extrait éthanolique

**FRAP** : Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (*Ferric reducing/antioxidant power*)

**G** : Gramme

**H** : Heure

**IR** : Spectre infrarouge

**KDa** : Kilo Dalton

**Kg** : Kilogramme

**LDL** : lipoprotéines à basse densité (*low density lipoproteins*)

**M** : Masse Molaire

**Max** : Maximum

**MeOH** : Méthanol

**Mg** : Milligramme

**Mg éq AG/g PS**: Microgramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait

**Mg éq Qu/g** : Microgramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait

**M-H** : milieu Mueller Hinton

**ml** : Millilitre

**mm** : Millimètre

**mM** : Millimolaire

**min** : Minimum

**mn** : Minute

**NaOAc** : Acétate de Sodium

**Nbr** : Nombre

**nm** : Nanomètre

**PAL** : Phénylalanine Ammonialyase

**PM** : Poids Moléculaire

**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis ou  
Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en présence de Dodécylsulfate de Sodium

**TCA** : Acide Trichloroacétique

**Tr** : Temps de rétention

**UV** : Ultra Violet

**V** : Volume

**µl** : Microlitre

**µg** : Microgramme

| <b>Liste des annexes</b>  | <b>Page</b> |
|---|-------------|
| <b>Annexe 1:</b> Electrophorèse monodimensionnelle selon Singh et <i>al.</i> , (1991) | <b>182</b>  |
| <b>Annexe 2:</b> Données climatiques de la station d'étude « Sidi Rghiss »            | <b>184</b>  |
| <b>Annexe 3:</b> Méthodes d'analyses du sol   | <b>185</b>  |
| <b>Annexe 4:</b> Etude morphologique, Résultats et Statistiques                       | <b>192</b>  |
| <b>Annexe 5:</b> Analyses physio-biochimiques, Résultats et Statistiques              | <b>195</b>  |
| <b>Annexe 5.1.</b> Résultats  | <b>195</b>  |
| <b>Annexe 5.2.</b> Traitements statistiques   | <b>196</b>  |
| <b>Annexe 6:</b> Activités biologiques, Résultats et Statistiques                     | <b>197</b>  |
| <b>Annexe 6.1.</b> Méthodes d'étude   | <b>197</b>  |
| <b>Annexe 6.2.</b> Résultats  | <b>197</b>  |
| <b>Annexe 6.3.</b> Traitements statistiques   | <b>198</b>  |

### **Publications**

- **Malki S. and Yahia A.L., 2014.** Evaluation of diuretic activity from *Teucrium polium* L. *Capitatum* extracts (Lamiaceae) in rats. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 5(4): 1259-62. doi: 0.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1259-62

- **Malki S., Abidi L., Hioun S., and Yahia A., 2015.** Variability of phenolic contents in ethanolic extracts of *Teucrium polium* L. populations and effect on antioxidant and antimicrobial activities. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 5 (4):21-27



# *Introduction générale*

Les espèces sont soumises en permanence aux contraintes environnementales des milieux où elles évoluent d'où le processus d'adaptation, sous l'effet de la sélection, une population va accroître sa survie et son succès reproducteur dans un environnement donné.

En effet, les individus d'une même espèce se répartissent dans des milieux qui sont rarement homogènes et où la sélection peut favoriser l'évolution dans une population, d'un ou plusieurs traits qui seront avantageux dans un milieu donné par rapport aux autres milieux. Cette évolution peut se faire soit à partir de variations génétiques préexistantes, soit à partir de nouvelles mutations (Jump et *al.*, 2008).

Parmi la diversité de plantes méditerranéennes, se trouvent de nombreuses espèces médicinales, dont la plupart appartient à la famille des Lamiaceae (environ 260 genres, pour un nombre d'espèces estimé entre 6 500 et 7 000 (Spichiger, 2004)). Ces dernières sont riches en métabolites secondaires notamment les flavonoïdes qui peuvent fonctionner comme des signaux chimiques qui permettent à la plante de répondre aux contraintes de l'environnement.

Actuellement, les travaux sur les mécanismes de régulation se basent essentiellement sur la régulation spatio-temporelle de la biosynthèse des flavonoïdes sans les introduire dans un contexte métabolique global de la plante. Toutefois, si l'on veut élucider les mécanismes de régulation de la biosynthèse des flavonoïdes, il est indispensable de les inclure dans une approche globale prenant en compte des facteurs physiologiques et environnementaux majeurs comme la réponse à des stress.

Chez les Lamiaceae et particulièrement chez les *Teucrium*, les deux faces des feuilles, les calices et les jeunes tiges sont recouverts de trichomes glandulaires et de poils, formant ce qu'on appelle un indumentum à leur surface (Puech, 1984; Navarro and El Oualidi, 2000; Jurisic Grubestic et *al.*, 2007). La présence presque universelle du trichome doublée d'une grande facilité d'étude, fait de lui un outil très important dans la nouvelle taxonomie des Lamiaceae (Maleci Bini and Servettaz, 1991; Navarro, 1995 et Mráz, 1998).

Toutefois, en dépit de ses intérêts biochimique et écophysio-logique, et si la plupart des travaux ont porté sur des aspects phytochimique et biologique, *Teucrium polium* L. *Capitatum* reste jusqu'à présent peu connue, en particulier en Algérie.

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail est d'évaluer les variabilités morphologique, biochimique et physiologique de quelques populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* et

d'étudier les activités biologiques de leurs extraits sur les propriétés antioxydantes, antibactériennes et diurétiques.

Ce manuscrit se compose de quatre chapitres :

- ✚ Dans une première partie, on a réalisé une synthèse bibliographique qui contient les éléments nécessaires pour aborder la problématique et mieux appréhender les différents résultats et arguments qui seront développés tout le long du manuscrit. Elle est structurée en trois grandes parties: (i) Aspects généraux dans la morphologie, et l'intérêt pharmacologique de *Teucrium polium* L. *Capitatum*; (ii) Rôle, structure et localisation spatio-temporelle des trichomes; (iii) Description détaillée et analyse des données issues de la littérature sur la biosynthèse et la régulation des flavonoïdes et des anthocyanines.
- ✚ Le deuxième chapitre décrit le matériel végétal, objet de l'étude, et les différentes techniques d'analyse utilisées.
- ✚ Ensuite, les différents résultats obtenus et leur discussion seront présentés dans le troisième chapitre en 3 parties distinctes:
  - Première partie, «Etude morphologique et biochimique de dix populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* dans l'Est algérien »
  - Deuxième partie, «Evaluation de la diversité physio-biochimique de la population de *Teucrium polium* L. *Capitatum* dans la région d'Oum El Bouaghi»
  - Troisième partie, « Analyses biologiques de quelques populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum*».
- ✚ Finaliser par une conclusion générale de l'ensemble des travaux réalisés.

# **Chapitre 1:**

## **Etude bibliographique**

## I. Etude ethnobotanique de la plante *Teucrium polium* ssp. *Capitatum*

### Introduction

L'espèce *Teucrium polium* ssp. *Capitatum* est une dicotylédone appartenant à la famille des Lamiacées qui comprend environ 233 à 263 genres et entre 6900 à 7200 espèces (Heywood et *al.*, 2007), dont 28 genres et 146 espèces se trouvent en Algérie (Quezel et Santa, 1963). La plupart des plantes de cette famille sont partiellement ligneuses ou vivaces par le rhizome, formant des arbustes (très rarement des arbres). Il s'agit d'une vaste famille aromatique, très typique du monde végétal, répandue dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes. Elle possède une importance économique due à la production des huiles essentielles et de miel (Cas des miels de lavande et du romarin) (Guignard et *al.*, 2001).

La famille des Lamiacées ou Labiées est l'une des premières à être distinguées par les botanistes (Pistric, 2002) par la particularité de ses caractères: Ce sont généralement des plantes herbacées odorantes, à tiges quadrangulaires, les feuilles sont dentées, glanduleuses et velues, généralement opposées sans stipules. Les fleurs sont hermaphrodites zygomorphes et pentamères, réunies en cymes axillaires plus ou moins contractées formant souvent des verticilles, ou encore condensées au sommet des tiges, et formant des épis. Le fruit est constitué par 4 akènes plus ou moins soudés par leur face interne (Messaili, 1995). La formule florale est:  $(5S) + [(5P) + 4E] + (2C)$ .

### 1. Caractères morphologiques de *Teucrium polium* ssp. *Capitatum*

C'est un arbrisseau nain, de 20-40 cm de haut, à odeur aromatique, au total plus ou moins feutré, à poils blancs, verts ou jaunâtres. Les tiges sont nombreuses, ligneuses, grêles, élancées, blanches et leurs rameaux sont couverts par des poils cotonneux. Les feuilles sont petites, linéaires ou linéaires lancéolées, opposées ou en touffes, à très court pétiole, entières ou faiblement crénelées au sommet, de 7 à 27mm de long, au bord à 2-5 (9) encoches, plates ou enroulées, brièvement tomenteuses, d'un vert cendré en dessus, blanchâtres en dessous. Fleurs blanches rarement purpurines, globuleuses, pédonculées, capitules de 1cm au plus, nombreuses au sommet des tiges, disposées en panicule, brièvement tomenteuses, s'épanouissent de juin à août. Le calice est blanc-tomenteux, atteignant jusqu'à 5mm de long, à 5 dents courtes, concaves, obtuses. La corolle à lobes supérieurs pubescents, environ 5mm de long. La lèvre supérieure est absente et l'inférieure a 5 lobes. Les étamines à filets roulés

en spirale après la floraison, insérées sur le tube de la corolle, sont accompagnées parfois de 2 autres étamines stériles et réduites; soit 4 en 2 paires souvent inégales (Quezel et Santa, 1963; Coste et Flahault, 1980; Bayer et *al.*, 1990). Le fruit est constitué de 4 parties brunes et orné en réseau à sa surface (Puech, 1984).



**A**



**B**

**Figure 1:** *Teucrium polium* L. ssp. *Capitatum* . **A** : inflorescences, **B** : feuilles

## 2. Taxonomie et systématique

Selon Quezel et Santa (1963), Autore et *al.* (1984) et Caddick et *al.* (2002), *Teucrium polium* ssp. *Capitatum* est classé comme suit :

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Embranchement : Phanérogames
- sous Emb : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones/Magnoliopsida
- Sous-classe : Gamopétales /Asteridae
- Ordre : Tubiflorales/Lamiales
- Famille : Labiées /Lamiaceae
- Genre : *Teucrium*
- Espèce : *Teucrium polium* L., 1753 ssp. *Capitatum*

### 3. Habitat et répartition géographique

La plante est commune dans les régions méditerranéennes et l'Europe, l'Asie du Sud, et l'Afrique du Nord, dans les endroits secs, prairies et garrigues (Bayer et *al.*, 1990). Une vingtaine de cette espèce pousse spontanément, en Algérie et prédomine dans la région du Tell, les Hauts plateaux et l'Atlas saharien (Quezel et Santa, 1963).

### 4. Noms vernaculaires

Différents noms sont donnés à l'espèce en fonction de la population et du lieu où on la trouve. Les plus connus sont ; khayata, hamzoucha, hamria, djertil, j'ada, Mezouqach, Takmazzut (targui ou berbère), Jeadà (Jordan), germandrée tomenteuse (Français), Germander (Anglais), poliot (Italien) (Autore et *al.*, 1984; Tariq et *al.*, 1989; Wamidh et Adel, 2010).

### 5. Données phytochimiques de la plante

Les études préliminaires réalisées sur les feuilles et les fleurs de *Teucrium polium* ssp. *Capitatum* ont révélé la présence de composés polyphénoliques tels que des flavonoïdes et des tanins, ainsi que d'autres composés, des saponines, des stéroïdes et des huiles essentielles.

Les composés phytochimiques thérapeutiques trouvés dans *Teucrium polium* L. comprennent: les polyphénols (Proestos et *al.*, 2006; Stefkov et *al.*, 2009; Djabou et *al.*, 2012), les diterpénoïdes avec un squelette neoclerodane, avec plus de 220 diterpènes (Piozzi et *al.*, 2005), les huiles essentielles principalement monoterpéniques/ sesquiterpènes hydrocarbures et sesquiterpènes oxygénés (Cozzani et *al.*, 2005; Kabouche et *al.*, 2007; Saroglou et *al.*, 2007; Moghtader, 2009; Belmekki et *al.*, 2013; Elmasri et *al.*, 2014; Sadeghi et *al.*, 2014; Khani and Heydarian, 2014), dont le carvacrol et le caryophyllène ont été les éléments les plus abondants dans *Teucrium polium* ssp. *Capitatum* (Menichini, 2009), les glycosides phenylethanoides tels que verbascoside, poliumoside et la vandulifolioside (Oganesyan et *al.*, 1991; Ladjel et *al.*, 1994), les glycosides de flavones avec aglycones très méthylés (Verykokidou - Vitsaropoulou et Vajias, 1986; Rizk et *al.*, 1986; Harborne et *al.*, 1986; Kawashty et *al.*, 1999; Sharififar et *al.*, 2009).

En 2009, Stefkov et *al.*, ont identifié six flavones aglycones: luteoline, apigénine, diosmétine, cirsiol, cirsimaritrine et cirsiléol, par contre les composés stéroïdiens ont été isolés par

Ulubelen *et al.* (1994) et Kisiel *et al.* (1995). L'analyse des principes actifs révèle la présence des saponines (Hassan, 2007), tannins et alcaloïdes (Shakhanbeh et Atrouce, 2001; Parsaee et Shafiee-Nick, 2006).

## 6. Utilisations en médecine traditionnelle

Déjà utilisée comme fébrifuge chez les anciens Egyptiens, *Teucrium polium* L. possède les propriétés communes aux plantes amères et aromatiques, c'est-à-dire qu'elle est tonique, appétitive, fébrifuge, vermifuge et carminatif. Elle combat la paresse de l'ensemble du tube digestif et celle du foie, on l'utilise dans les maladies de l'estomac, les bronchites chroniques, les troubles de digestion et les douleurs abdominales (Rajabalian, 2008).

Depuis longtemps, on utilise la germandrée, en infusion, pour combattre la goutte, les rhumatismes, la fièvre, la bronchite chronique et les mucosités abondantes. En bain de bouche, elle soigne les gingivites, et, en lotion, elle accélère la cicatrisation des blessures (Debuigne, 1972; Gharaibeh *et al.*, 1988).

## 7. Données pharmacologiques

*Teucrium polium* L. possède un large spectre d'effets pharmacologiques, notamment antioxydants (Hasani *et al.*, 2007; Yazdanparast and Ardestani, 2009; Sharififar *et al.*, 2009), anticancéreux (Nématollahi-Mahani *et al.*, 2007; Menichini, 2009; Harleva *et al.*, 2012, Elmasri *et al.*, 2016), anti-inflammatoires (Menichini *et al.*, 2009), hypoglycémiques et insulinothrombotiques (Kasabri *et al.*, 2011; Stefkov *et al.*, 2011), hépatoprotecteurs (Shtukmaster *et al.*, 2010), (comme l'engorgement du foie), hypolipidémiques (Stefkov *et al.*, 2011), antihypertensifs (Niazmand *et al.*, 2011), neuroprotecteurs (Schröder *et al.*, 2013), antipyrétique (Kabouche *et al.*, 2007), antirhumatoïde (Tariq *et al.*, 1989), antibactériens spécifique contre *Bacillus anthracis*, *Bordetella bronchiseptica* et *Salmonella typhus* (Darabpour *et al.*, 2010; Darwish et Aburjai, 2010; Belmekki *et al.*, 2013) et antifongiques (Bahramikia et Yazdanparast, 2012). D'autre part, l'importance de cette espèce dans les industries alimentaires réside aussi dans le fait que de nombreuses espèces montrent des activités antimicrobiennes, antioxydantes et antifongiques, ce qui les rend utiles comme ingrédients de conservation naturelle (Ulubelen *et al.*, 2000; Özkan *et al.*, 2007; Saroglou *et al.*, 2007).



## 8. Données toxicologiques

L'expérimentation chez les souris a montré que l'extrait de *Teucrium polium* L. induit une nécrose hépatique (Shivakumar et Geoffrey, 2008; Fiorentino et al., 2011). Cette nécrose peut également être obtenue par l'administration d'un extrait enrichi en diterpènes (Kabouche et al., 2007). D'autre part, le dosage cytotoxique *in vitro* sur trois lignées de cellules cancéreuses humaines a montré que les huiles les plus antiprolifératives ont été celles de *T. polium* ssp. *Capitatum* ( $DL_{50} = 52,7 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) (Menichini, 2009; Elmasri et al., 2016). L'effet cytotoxique de ces huiles a été évalué aussi par Bigham et al. (2010) sur les stades larvaires de *Musca domestica* pour une  $DL_{50}$  à 80 ppm. Cette étude a indiqué que l'effet larvicide de l'huile essentielle de *Teucrium polium* peut être dû à ses effets néfastes sur les enzymes digestives.

Les travaux de Rafieian-Kopaei et Baradaran (2013) ont montré qu'après 28 jours d'administration d'extrait hydroalcoolique de *Teucrium polium* L. chez des rats, des lésions rénales, y compris la dégénérescence, destruction et vacuolisation des reins, sont apparues en comparaison au groupe témoin.

## II. Les trichomes

### Introduction

Les trichomes (du grec τρίχωμα - trikhoma qui signifie « poil ») sont des fines excroissances ou appendices uni- ou pluricellulaires qui existent à la surface des organes chez un large spectre de variétés végétales. Leur morphologie et leur fonction sont très variées selon les tissus et les espèces (Uphof, 1962). Cependant, nous pouvons distinguer deux catégories fonctionnelles de trichomes. Les trichomes non sécréteurs et les trichomes glandulaires sécréteurs.

La valeur taxonomique des trichomes et leur implication dans la systématique et la phylogénétique sont bien connues chez les lamiacées et d'autres familles apparentées tels que Acanthacées, Bignoniacées, Verbénacées et Plantaginacées (Ahmad, 1974; 1978; Elias et Newcombe, 1979; Mathew et Shan, 1983; Abu-Asab et Cantino, 1987; Cantino, 1990; Rahn, 1992; Gairola et al., 2009).

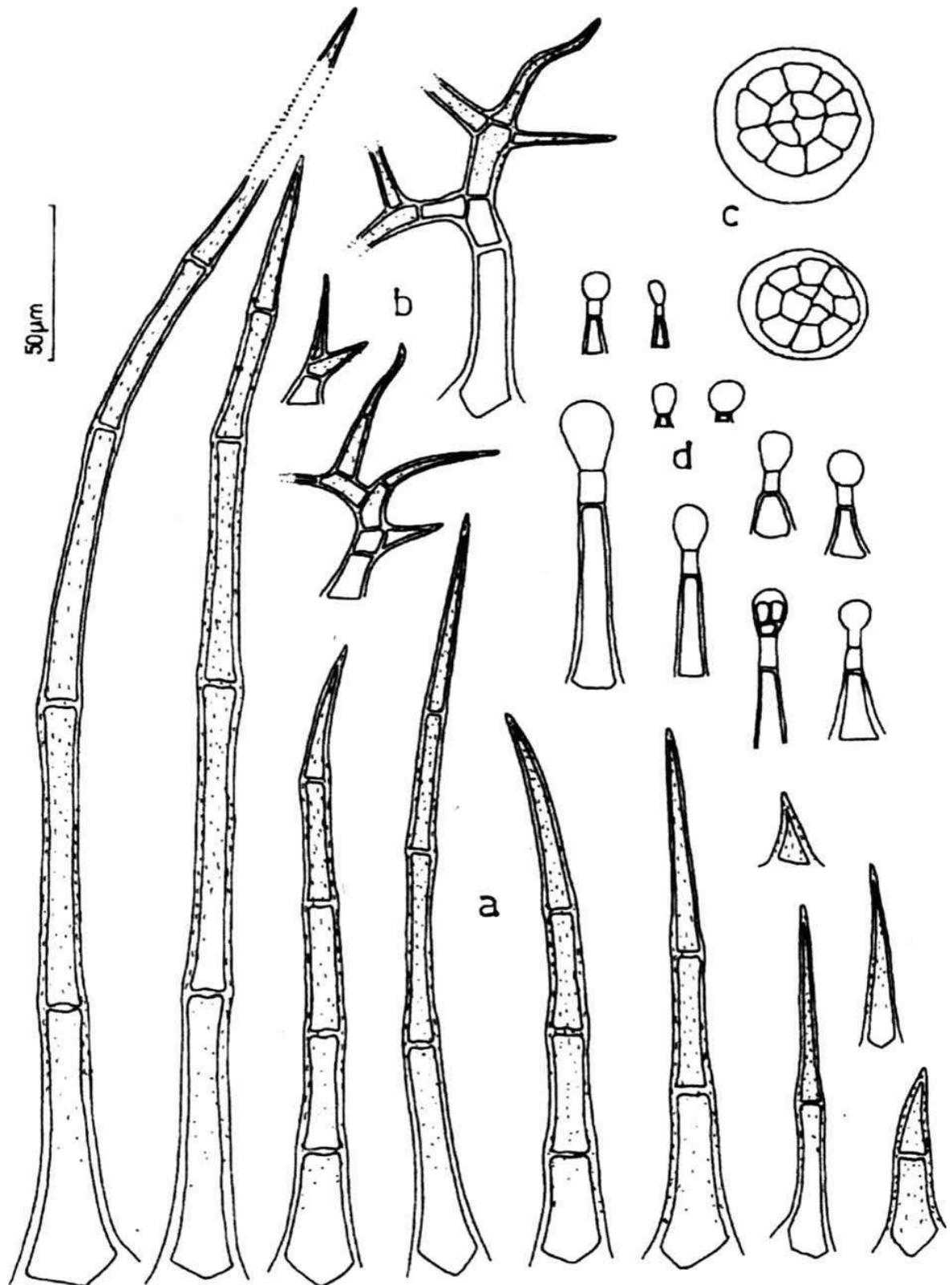
## 1. Données anatomiques

Les trichomes se divisent en trichomes glandulaires et non-glandulaires (Wagner et *al.*, 2004). Chez les Lamiacées, les trichomes non glandulaires sont plus fréquents que les trichomes glandulaires. En se basant sur leur morphologie et le nombre des cellules, Cantino (1990) a divisé les trichomes non glandulaires en quatre types: unicellulaires simples, multicellulaires simples, unicellulaires ramifiés et multicellulaire ramifiés (figure 2).

Les trichomes glandulaires sont des structures sécrétoires spécialisées qui varient selon la taille, la forme, l'emplacement et le fonctionnement dans les différentes espèces végétales (Robbles-Zepeda et *al.*, 2009). Selon Werker (1993) et Lakusic et *al.* (2007), les trichomes glandulaires sont de deux types capités et peltés selon la structure de la tête de sécrétion. Ces trichomes sécréteurs sont typiquement composés de quelques cellules épidermiques basales qui par division donnent une à plusieurs cellule (s) de pied de taille variable, surmontés chacun d'une tête sécrétrice formée d'une ou plusieurs cellules (figure 2).

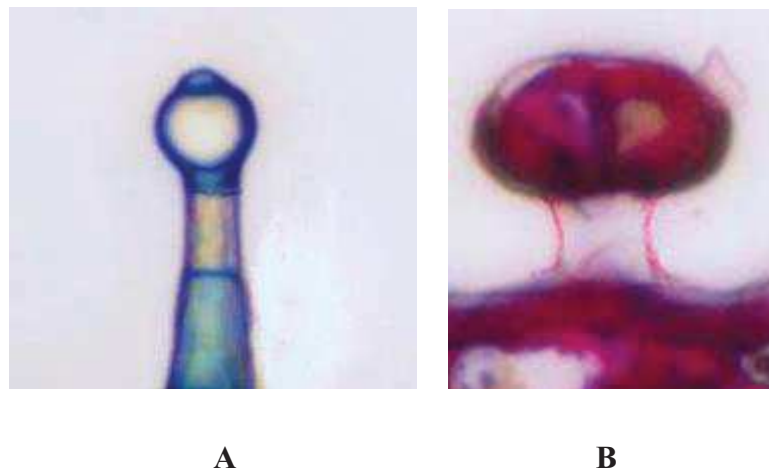
La présence de deux trichomes glandulaires capités et peltés est l'une des caractéristiques qui distingue les lamiacées des autres familles. Les trichomes peltés ont de courtes tiges unicellulaires et grosses têtes aplaties de 60 à 90  $\mu\text{m}$  de diamètre, qui sont formées de quatre à huit cellules disposées en simple disque (Antunes et Sevinato-Pinto, 1991; Serrato-Valenti et *al.*, 1997), ou par 12 à 18 cellules en deux cercles concentriques (Hanlidou et *al.*, 1991). Les trichomes capitaux ont généralement une tige de longueur variable surmontée par une tête en forme de poire arrondie (Ascensào et *al.*, 1999). Selon El Beyrouthy et *al.* (2009), les trichomes capités sont de formes différentes (courte, longue), avec une tête unicellulaire ou pluricellulaire.

Les types les plus populaires probablement présents chez toutes les espèces des Lamiacées sont les trichomes capités courts, qui sont composés d'une cellule basale épidermique, une tige unicellulaire courte et une ou deux cellules de tête. Les trichomes glandulaires peltés des Lamiacées comprennent souvent une large tête de plusieurs cellules sécrétrices (jusqu'à 16), une tige courte et une cellule épidermique basale (Hallahan, 2000; Kahraman et *al.*, 2009; Celep et *al.*, 2011). D'autres espèces Lamiacées telles que *Salvia chamelaeagnea* possèdent le nombre le plus élevé des cellules de tête (Kamatou et *al.*, 2006).



**Figure 2:** Exemples des trichomes non-glandulaires et glandulaires  
(a) non-glandulaires simples, (b) non-glandulaires branchés, (c) glandulaires peltés et (d)  
glandulaires capités (Satil et *al.*, 2011).

*Teucrium polium* L. originaire de la Grèce est une plante saisonnière dimorphe ayant des pousses courtes en hiver, par contre en été les pousses sont longues. Les deux feuilles d'hiver et d'été sont recouvertes de poils glandulaires et non glandulaires. Les feuilles d'hiver portent des poils plus nombreux par rapport aux feuilles d'été. Les poils glandulaires comprennent des poils peltés et capités. Les poils peltés sont composés d'un pied épidermique unicellulaire, une tige également unicellulaire, et une tête tétracellulaire. Les poils capités sont de deux types; longs et courts: les poils longs sont constitués d'un pied épidermique unicellulaire, une tige tricellulaire et une tête unicellulaire. Tandis que, les poils courts sont formés d'un pied unicellulaire, une tige unicellulaire et une tête bicellulaire. Les poils non glandulaires sont pour la plupart dendroïdes multicellulaires, mais il existe aussi les poils multicellulaires unisériés (Bosabalidis, 2013) (figure 3).



**Figure 3:** Trichomes glandulaires capités et peltés de *Teucrium polium* L.  
**A:** trichome pelté avec tête unicellulaire. **B:** trichome capité avec tête bicellulaire  
(Bosabalidis, 2013)

La morphologie des trichomes peltés de *Lavandula pinnata* est différente des autres Lamiacées, car les têtes de sécrétion sont sphériques. Les deux types de trichomes capités et peltés subissent plusieurs divisions cellulaires, épaissement de la cuticule et un élargissement de l'espace sous-cutané où l'huile s'accumule. Les plastes, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les vacuoles participent tous dans la synthèse des produits de la sécrétion qui sont libérés dans l'espace sous-cutané par exocytose (Huang et al., 2008).

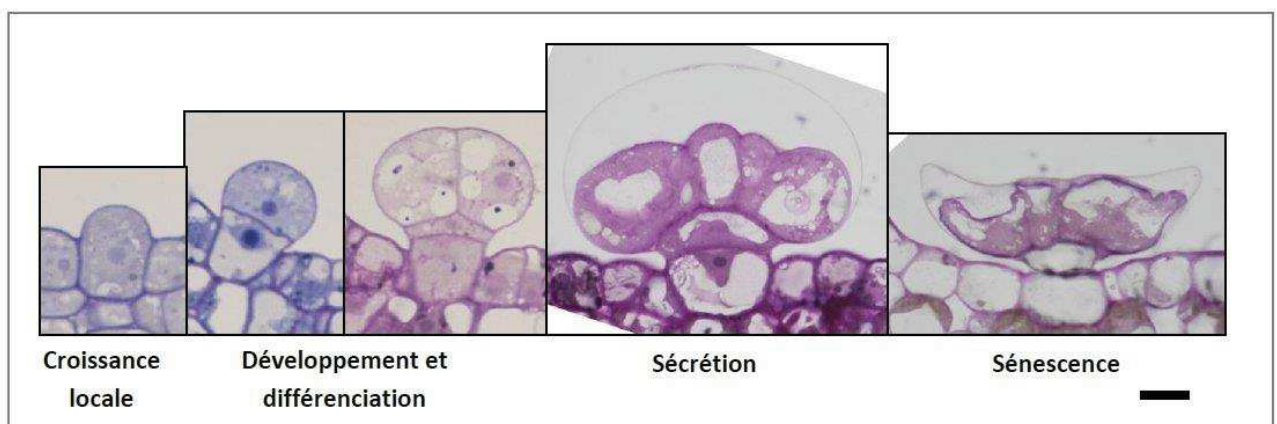
## 2. Développement des trichomes

### 2.1. Initiation et morphogenèse des trichomes

La mise au point des trichomes commence souvent à un stade très précoce du développement de la feuille, et parfois avant même la distinction des primordiums foliaires quand elle atteint une taille d'environ 100µm (Larkin *et al.*, 1996). D'un point de vue spatial, l'initiation débute préférentiellement sur la partie proximale de la feuille (Schnittger *et al.*, 1999).

Chez la plante modèle, *Arabidopsis thaliana*, la formation des trichomes ou des poils absorbants à la surface de l'épiderme des organes aériens (tiges et feuilles) et souterrains (racines) respectivement se fait à partir de la différenciation des cellules protodermiques isodiamétriques (Marks, 1994). A la surface de l'épiderme foliaire, les trichomes sont généralement ramifiés en trois ou quatre branches. Ils se forment précocement sur la face adaxiale, lorsque les cellules de l'épiderme sont en mitose, l'initiation des trichomes s'effectue par l'augmentation de la taille des cellules et de celle des noyaux. Elle est suivie par l'allongement des cellules sur le plan perpendiculaire de la feuille, puis la ramification et la maturation des parois cellulaires des trichomes. L'initiation des trichomes est basipète; elle se produit dans la partie distale des feuilles en développement (Hülkamp *et al.*, 1994; Marks, 1994; Failmezger *et al.*, 2013).

Les étapes développementales sont bien connues chez *Mentha x piperita* (figure 4). La glande peltée de *Mentha x piperita* passe par trois stades de développement: le stade pré-sécrétoire, le stade mature de sécrétion et le stade post-sécrétoire (Turner *et al.*, 2000).



**Figure 4:** Etapes de la différenciation des glandes peltées de *Mentha X Piperita* (Turner *et al.*, 2000)

La distribution spatiale et temporelle des trichomes chez *Arabidopsis thaliana* est déterminée au début de la phase végétative, les trichomes sont répartis uniformément sur le côté abaxiale des feuilles, une fois entrée dans le stade de la reproduction, le nombre de trichomes produit sur le pédoncule est progressivement réduit. Donc, les organes floraux sont presque glabres sauf quelques trichomes envisagés sur la surface abaxiale des sépales (Telfer et *al.*, 1997).

Dans certaines plantes, le nombre final des trichomes est établi tôt au cours de la différenciation des feuilles (Ascensão et Pais, 1987), tandis que dans d'autres plantes de nouveaux trichomes sont formés à tous les stades de développement de la feuille (Maffei et *al.*, 1989; Turner et *al.*, 2000). La densité des trichomes de plusieurs plantes est importante dans les petites feuilles, mais diminue rapidement avec l'expansion foliaire (Maffei et *al.*, 1989; Werker et *al.*, 1993; Perez-Estrada et *al.*, 2000).

A maturité, certains organes des plantes qui ont subi une croissance secondaire ont des trichomes non-glandulaires plus nombreux que les trichomes glandulaires (Mayekiso et *al.*, 2009). Durant les stades tardifs du développement de la feuille, lorsque la formation de l'épiderme est terminée, le rôle fonctionnel des trichomes devient souvent moins important, et ils dégénèrent. Cependant, dans certains cas, ils restent viables et fonctionnels dans les feuilles matures (Werker, 2000). En outre, la composition des exsudats produits par les trichomes glandulaires peut changer avec l'âge des feuilles (Maffei et *al.*, 1989; Werker et *al.*, 1993).

L'initiation des trichomes Chez *Arabidopsis thaliana* est dépendante des hormones. En effet, les gibbérellines et l'acide jasmonique augmentent le nombre et la densité des trichomes, tandis que l'acide salicylique diminue leur nombre (Traw et Bergelson, 2003; Ishida et *al.*, 2008).

## 2.2. Bases moléculaires de la formation des trichomes

Des analyses moléculaires et génétiques ont été effectuées chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et ont révélé la présence d'un réseau de facteurs de transcription qui contrôlent le développement des trichomes (Feenstra, 1978; Haughn et Somerville, 1988; Hülkamp et *al.*, 1994; Marks et Esch, 1994; Szymanski et *al.*, 2000; Schiefelbein, 2003; Pesch et Hülkamp, 2004; Schellmann and Hülkamp, 2005; Schellmann et *al.*, 2007; Wang et *al.*, 2007; Ishida et *al.*, 2008; Pesch et Hülkamp, 2009; Nayidu et *al.*, 2014).

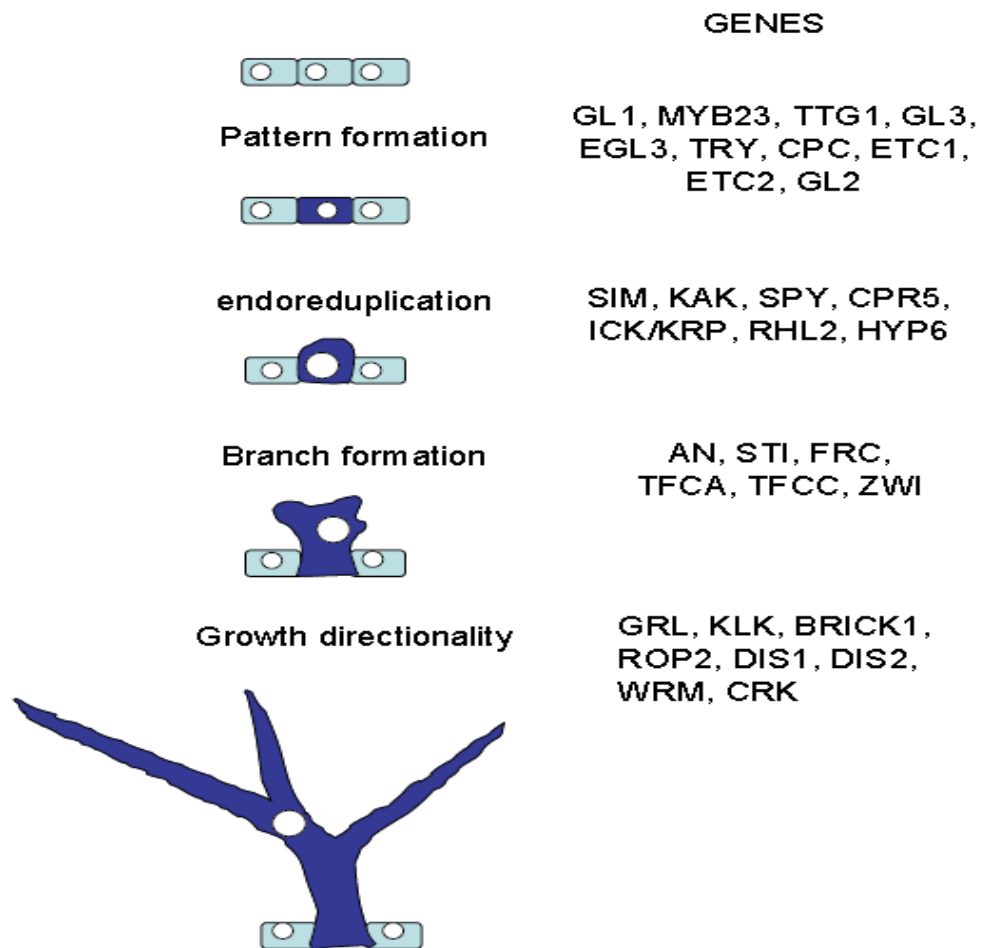
L'initiation des trichomes est déclenchée par un complexe activateur formé de quatre protéines nucléaires: GLABROUS1 (GL1) (Oppenheimer *et al.*, 1991), GLABRA3 (GL3) et ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) (Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003), et TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG) (Koorneef *et al.*, 1982, Walker *et al.*, 1999). Ces protéines appartiennent à trois familles distinctes: les facteurs R2R3-MYB (GL1), des protéines bHLH (basic helix-loop-helix; GL2 et GL3) et des protéines à domaine WD40 (TTG). L'initiation se caractérise par l'induction de trois cycles d'endoréplication conduisant à une ploïdie de 16C. La cellule émerge de l'épiderme et un premier point de branchement apparaît. Ensuite, un quatrième cycle d'endoréplication a lieu parallèlement à une expansion cellulaire et à la formation d'une 3ème branche. Il a été montré que les gènes GL1 et TTG1 jouaient un rôle dans l'initiation alors que GL3 a une action dans l'initiation et le 4ème cycle d'endoréplication (Hulskamp *et al.*, 1994) (figure 5).

D'autres régulateurs interviennent dans la différenciation du trichome au stade de morphogénèse. En effet, les complexes GL1-GL3-TTG ou GL1-EGL3-TTG sont des activateurs directs des gènes GL2 et TTG2 (Ishida *et al.*, 2007; Morohashi *et al.*, 2007; Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008) (figure 5). La protéine GL2 va agir dans l'élongation du trichome hors du plan de la feuille. La protéine TTG2 est indispensable au développement correct du trichome (Johnson *et al.*, 2002). Les composants du cytosquelette notamment l'actine et les microtubules semblent indispensables à la structuration physique du trichome (Mathur et Chua, 2000). De plus, les gènes ZWICHEL (ZWI) codant une protéine de type kinésine et ANGUSTIFOLIA (AN) et SPYKE1 (SPK1) sont également impliqués dans l'organisation du cytosquelette. En effet, la mutation d'un de ces gènes conduit à la formation de trichomes à deux branches essentiellement (Oppenheimer *et al.*, 1997; Folkers *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2002).

Récemment, les facteurs de transcription Glabrous Inflorescence Stems (SIG), GIS2, et Zinc Finger Protein 8 (ZFP8) ont été décrits comme étant impliqués dans la formation des trichomes via l'activation des phytohormones (Gan *et al.*, 2006; 2007; Zhou *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013). Il a été signalé par Gan *et al.* (2006) que SIG agit à travers la voie de signalisation des gibbérellines; le mutant SIG présente une diminution dans l'initiation des trichomes, tandis que sa surexpression conduit à la production de trichomes excessive sur la plupart des organes floraux. Les deux facteurs GIS2 et ZFP8 jouent un rôle important dans le

développement des trichomes avec l'intervention des cytokinines et des gibbérellines (Gan et al., 2007).

Enfin, des études sur *Arabidopsis thaliana* et ses apparentées ont montré que la variation dans certains de ces gènes peut expliquer les différences dans la formation des trichomes dans les populations naturelles (Hauser et al., 2001; Kivimäki et al., 2007).



**Figure 5:** Régulation moléculaire du développement des trichomes (Schellmann et Hülskamp, 2005)

### 3. Rôle

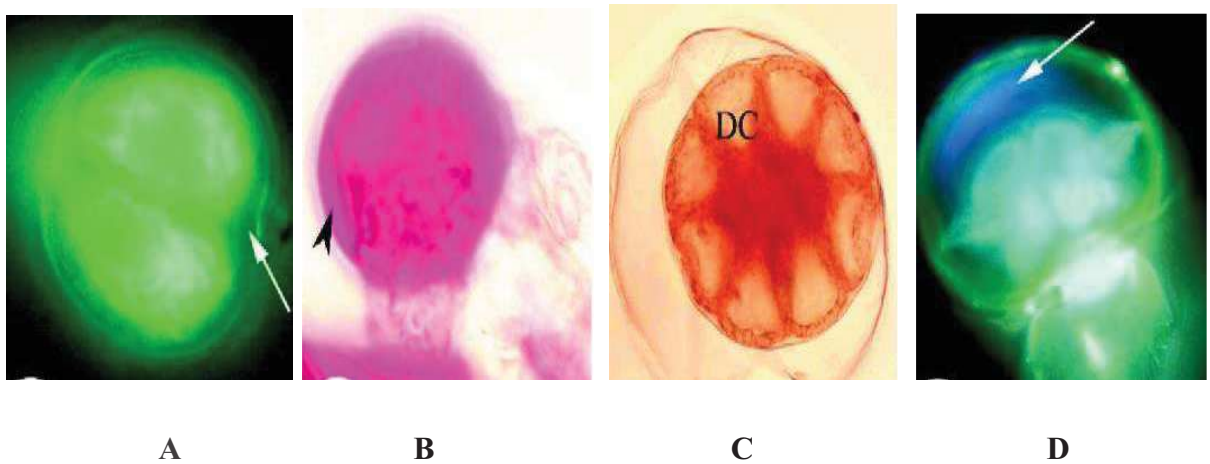
#### 3.1. Trichomes glandulaires

Les trichomes glandulaires capités constituent un caractère taxonomique important, ils entrent dans la formation de la partie florale des lamiacées responsable de la pollinisation (Navarro et El Oualidi, 2000; Kahraman et al., 2009). Comme les trichomes peltés, les types capités sont



très communs chez de nombreuses espèces du genre *Teucrium* (El Oualidi et Puech, 1993; Martin et al., 1994; Navarro et El Oualidi, 2000; Grubešić, 2007; Dinc et al., 2008; Lakušić et al., 2010). Ces structures sécrétrices possèdent des niveaux plus élevés de métabolites secondaires par rapport aux autres tissus de la plante (Macia et al., 2000; Marimoto et Komai, 2005).

Chez les Lamiacées, les trichomes peltés produisent aussi des quantités variables de polysaccharides et des huiles essentielles (Werker, 1993; Bourret et al., 1994; Clark et al., 1997), par contre les trichomes capités produisent quelques composés lipophiles tels que les terpènes, les lipides, les cires et les flavonoïdes aglycones (Ascensào et Pais, 1998; Ascensào et al., 1999; Corsil et Bottega, 1999, Mayekiso et al., 2008) (figure 6).



**Figure 6:** Trichomes glandulaires capités et peltés de *Lavandula pinnata* (Huang et al., 2008)

**A:** cellules du disque émettant une fluorescence verte sous excitation avec UV, ce qui indique la présence des lipides. **B:** la sécrétion des polysaccharides dans l'espace sous-cutané (teinté) des cellules de disque. **C:** lipides colorés en orange dans les huit disques cellulaires apicaux au stade post-sécrétoire. **D:** stade post-sécrétoire. Le produit de sécrétion dans l'espace sous-cutané (flèche) émet une fluorescence bleue sous excitation avec UV, indiquant la présence des composés terpéniques. Les parois latérales et la cuticule émettent une fluorescence jaune, qui indique la présence de la cutine.

En outre, chez de nombreuses espèces de la famille des Lamiacées, les trichomes glandulaires produisent, accumulent et sécrètent des composés terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, etc.). Il a été prouvé expérimentalement que la biosynthèse des terpènes a lieu dans les trichomes glandulaires (Croteau et Johnson, 1984; Hallahan, 2000; Siebert, 2004). Cela est dû au fait que ces derniers possèdent un équipement enzymatique complet de la biosynthèse (figure 7) (Mc Caskill et Croteau, 1995).

Les terpénoïdes sont les principaux composants de mélanges volatiles qui apparaissent après une attaque d'herbivore. Ils sont induits par la blessure causée par l'herbivore et jouent un rôle important dans l'attraction des prédateurs et des parasitoïdes de l'herbivore. Ce phénomène est connu sous le nom de la défense indirecte (Schnee et *al.*, 2006). Les diterpénoïdes peuvent également jouer un rôle dans les défenses directes contre les ravageurs, car ils peuvent avoir un effet dissuasif ou répulsif contre les insectes herbivores (Wagner, 1991; Fernandes et *al.*, 2011) et les champignons phytopathogènes (Allagui et *al.*, 2013) et à des concentrations plus élevées, ils sont souvent toxiques (Rosenthal et Berenbaum, 1991). En plus, ils ont des propriétés antimicrobiennes et allélopathiques (Vokou et Margaris, 1986; Sivropoulou et *al.*, 1995).

Par ailleurs, les terpènes peuvent être accompagnés par d'autres composés comme les esters, les alcools ou des aldéhydes appelés « green leaf volatiles » (Paré et Tumlinson, 1999).

D'autre part, de nombreux terpènes sont produits et émis à la fois par les feuilles et les fleurs, repoussant ou attirant les insectes pollinisateurs. D'une manière générale, le composé volatil émis est spécifique d'un insecte ou d'un groupe d'insectes pollinisateurs. Par exemple, les esters benzéniques, comme le benzylacétate, sont émis par une majorité de fleurs pollinisées par les papillons (Pichersky et Gershenzon, 2002).

Beaucoup de sécrétions des trichomes glandulaires ont un intérêt pour l'industrie cosmétiques (sentalol, enthol...) et l'industrie pharmaceutique (taxol, artémisinine...) (Aliero et *al.*, 2006; Ashafa et *al.*, 2008), mais ils sont aussi utilisés dans le secteur agroalimentaire comme additifs alimentaires ou comme des pesticides et des insecticides dits biologiques (Sharaby, 1988; Konstantopoulou et *al.*, 1992; Duke et *al.*, 2000a; Duke et *al.*, 2000b; Aharoni, 2006; Cantrell et *al.*, 2007).

Parmi les entreprises de biotechnologie, l'utilisation des trichomes sécréteurs comme usine de production de terpènes permet de contourner les problèmes de toxicité rencontrés dans les cultures de microorganismes et d'atteindre des bons niveaux de production qui conduiront à des coûts inférieurs aux coûts des procédés actuels. La stratégie générale consiste à réorienter le métabolisme terpénique de la plante en faveur de la molécule d'intérêts pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires.



Martin, 2006), en facilitant la condensation de l'humidité de l'air sur la surface de la plante (Jeffree, 1986). En outre, ils peuvent protéger les cellules vivantes des dommages causés par les rayonnements solaires UV, la transpiration excessive et les basses températures (Johnson, 1975; Skaltsa et al., 1994; Agrawal et al., 2004). Un autre rôle important a été attribué aux sécrétions des trichomes glandulaires, et leur implication dans la protection des cellules du mésophylle contre le rayonnement UV-B, par le biais des flavonoïdes (Fahn et Shimony, 1996; Bosabalidis et Skoula, 1998; Karabourniotis et al., 1998; Manetas, 1999; Tattini et al., 2000). Les trichomes sont également capables de produire des quantités importantes des protéines ayant des fonctions défensives, comme polyphénols oxydases (PPOs) (Yu et al., 1992) et les inhibiteurs de protéases (PIs) (Liu et al., 2006).

Enfin, des études ont montré que les trichomes glandulaires sont capables d'accumuler et de sécréter des éléments ioniques à la surface des glandes salines (Na, Cl) ou métalliques (Ca, Cd, Zn, Mn, Pb, Ni) (Salt et al., 1995; Kupper et al., 2000; Choi et al., 2001; Broadhurst et al., 2004, Dyubeni et Buwa, 2012 ). L'évacuation de ces molécules se fait généralement sous forme de cristaux. Ainsi des cristaux de cadmium ont été retrouvés à la surface de trichomes glandulaires longs et courts de tabac après son exposition à une forte concentration de cadmium et le zinc (Choi et al., 2001; Sarret et al., 2006) et le *Leontodon hispidus* peut séquestrer le calcium (De Silva et al., 1996).

### **3.1. Trichomes non-glandulaires**

Les trichomes non-glandulaires ont également été associés à la protection des appendices foliaires de la plante en recouvrant la couche de l'épiderme, rendant le limbe peu accessible aux insectes et propagules aériennes des champignons (Harborne, 1990; Afolayan et Meyer, 1995; Aliero et al., 2005; Mayekiso et al., 2008; Mayekiso, 2009) et en assurant la protection mécanique contre les herbivores (Yashodhara et al., 2001). Ils peuvent également protéger les stomates et les huiles des chaleurs intenses pendant les saisons sèche et chaude (Mayekiso et al., 2009).

Les trichomes peuvent donc avoir des fonctions multiples et la densité de ces derniers peut évoluer en réponse aux variations des facteurs environnementaux. En général, les feuilles des plantes à forte densité de trichomes peuvent être répandues dans des environnements qui sont secs ou froids, où les rayonnements UV sont intenses, et dans les zones où le risque d'être endommagé par les insectes et herbivores est élevé (Løe et al., 2007; Glas et al., 2012). De

même, il a été montré que les dommages causés par ces êtres vivants sont négativement liés à la densité des trichomes (Valverde et *al.*, 2001; Hare et Elle, 2002; Handley et *al.*, 2005).

### III. Le métabolisme secondaire

#### Introduction

Dans le monde végétal, les molécules naturellement synthétisées peuvent être classées en deux grandes catégories: les composés produits dans toutes les cellules et qui jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction de ces cellules, tels que les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres. Ils sont connus sous le nom de métabolites primaires et les molécules qui peuvent être parfois caractéristiques de certaines familles et/ou espèces végétales et qui ne sont pas indispensables à la survie de la plante. Ce sont les métabolites secondaires qui peuvent être classés en trois grands groupes: les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes.

La plupart des métabolites primaires exercent leurs effets biologiques au sein de la cellule ou de l'organisme qui est responsable de leur production, tandis que les métabolites secondaires, bio-synthétisés en réponse à un stress biotique et/ou abiotique, ont la particularité d'avoir des effets biologiques sur d'autres organismes, d'où leur intérêt dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et agronomique (West, 2010). Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200.000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

#### 1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux correspondent à un vaste ensemble de molécules qui ont toutes en commun un noyau phényle (benzénique) portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (Macheix et *al.*, 2005). Dans le règne végétal, les composés phénoliques sont présents chez les ptéridophytes (premières plantes vasculaires) et jouent des rôles essentiels pour la survie des végétaux en milieu terrestre en intervenant dans leur port dressé, leur défense, ou encore leur reproduction (Singleton et Esau, 1969).

Ce sont des molécules issues du métabolisme secondaire et qui sont ubiquitaires du règne végétal et notamment des angiospermes. Les composés phénoliques interviennent dans différents aspects de la vie de la plante, et sont impliqués dans la physiologie de la plante (lignification, interactions symbiotiques...), dans les mécanismes de défense de la plante (interactions biotiques et abiotiques) ou encore dans la coloration des fleurs. Par ailleurs, ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain et leur propriété antioxydante (Rösch et *al.*, 2004). D'un point de vue biosynthétique, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques: la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, flavonoïdes et lignines; et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (Livermore et *al.*, 2002).

La figure 8 ci-dessous nous montre quelques composés constituant cette famille. Les polyphénols possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...). Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en non flavonoïdes et flavonoïdes.

La première est représentée par les acides phénoliques, qui comprennent les acides benzoïques (acide gallique).

La seconde classe est constituée d'un noyau phénolique porteur d'une chaîne latérale insaturée en C3 (acide caféique).

La dernière classe est basée sur un squelette en C6-C3-C6 (catéchine), elle comprend plusieurs groupes qui se distinguent par le degré d'oxydation de l'hétérocycle central en C3.

Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...) (Macheix et *al.*, 2005).

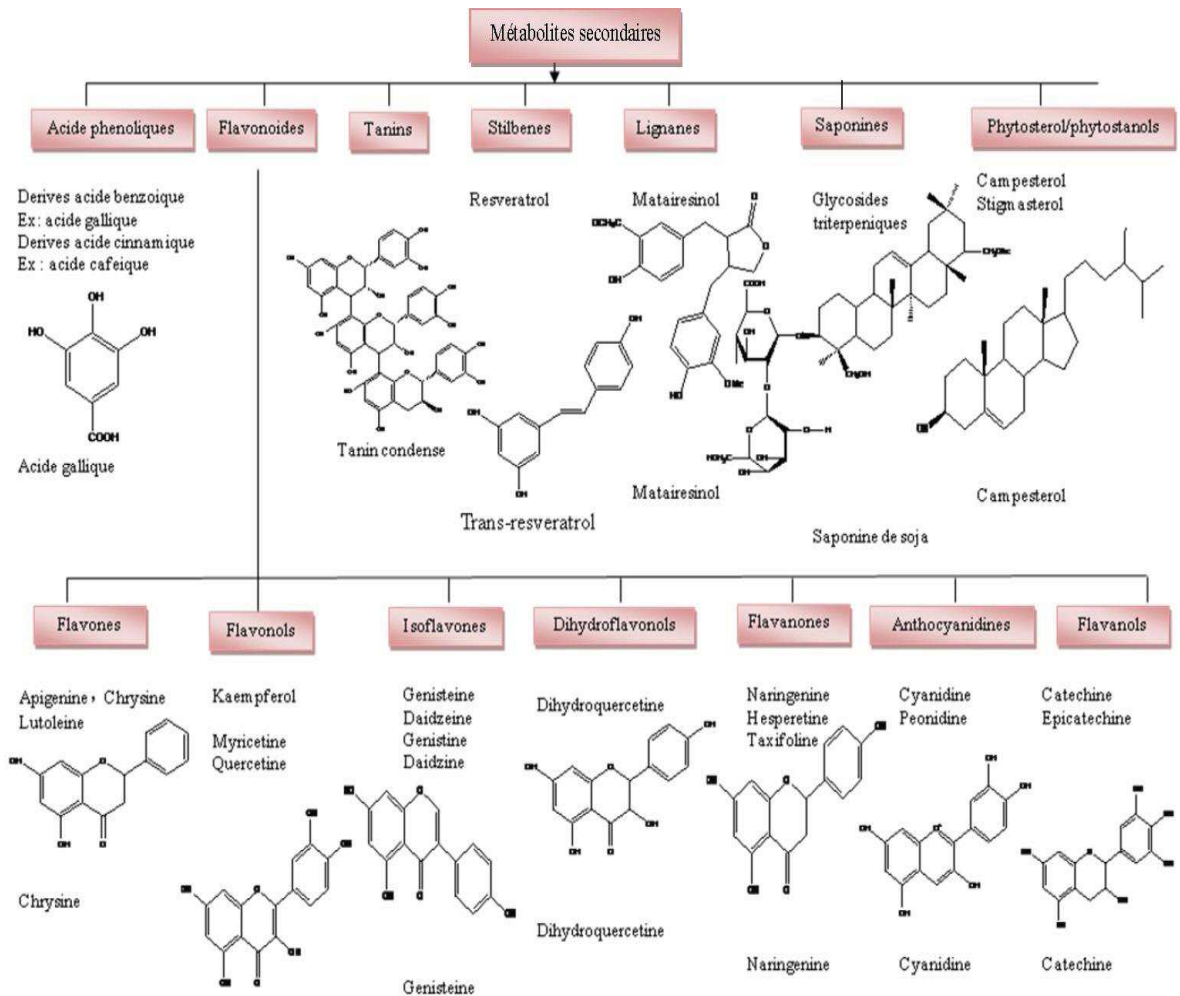


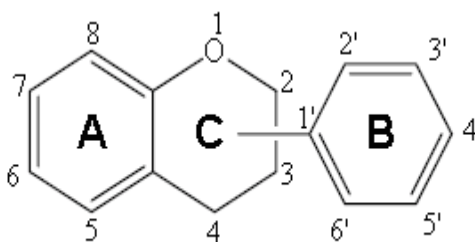
Figure 8: Classification de quelques métabolites secondaires (Muanda, 2010)

## 2. Les flavonoïdes

### 2.1. Généralités sur les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols. Ce sont des molécules aromatiques polysubstituées ayant un rôle de métabolites secondaires chez les plantes. La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes et à ce jour, plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées (Harborne et Baxter, 1999).

L'ensemble des flavonoïdes, qui possèdent une origine biosynthétique commune, ont un élément structural de base en C15 (C6-C3-C6) (sauf exceptions: chalcones, aurones, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (figure 9).

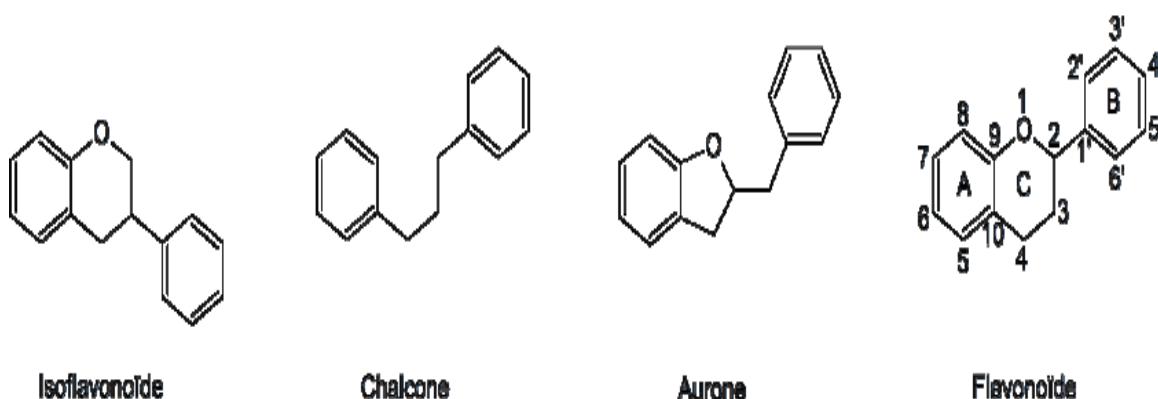


**Figure 9:** Structure générale des flavonoïdes (Cook et Samman, 1996)

## 2.2. Structure et classification

Les flavonoïdes possèdent un squelette en C<sub>15</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) et sont divisés en 4 sous-familles de composés (figure 10):

- Les isoflavonoïdes : 3-phénylchromane
- Les chalcones : le cycle C est ouvert
- Les aurones : le cycle C ne contient que 5 atomes (cycle furane).
- Les flavonoïdes : 2-phénylchromane (noyau flavane) (Fengel et Wegener, 1984).



**Figure 10:** Formule générale des familles de flavonoïdes. Les atomes sont numérotés que pour la famille au squelette 2-phénylchromane (Fengel et Wegener, 1984)

Cette dernière famille est divisée en 9 classes de composés qui diffèrent par le degré d'hydroxylation et d'insaturation du cycle C (figure 11): flavones, flavonols, flavanones, flavan-3-ols, flavan-3,4-diols (ou leucoanthocyanidine), anthocyanes, proanthocyanidines. La nature et le nombre de substituants présents sur les cycles A et B différencient les divers composés constituant chaque classe. Dans la plante, les molécules diffèrent entre elles par le nombre et la position des groupements hydroxyle, la présence de substituant sur la génine (flavonoïde non substitué) et le degré de polymérisation. Les formes les plus rencontrées sont



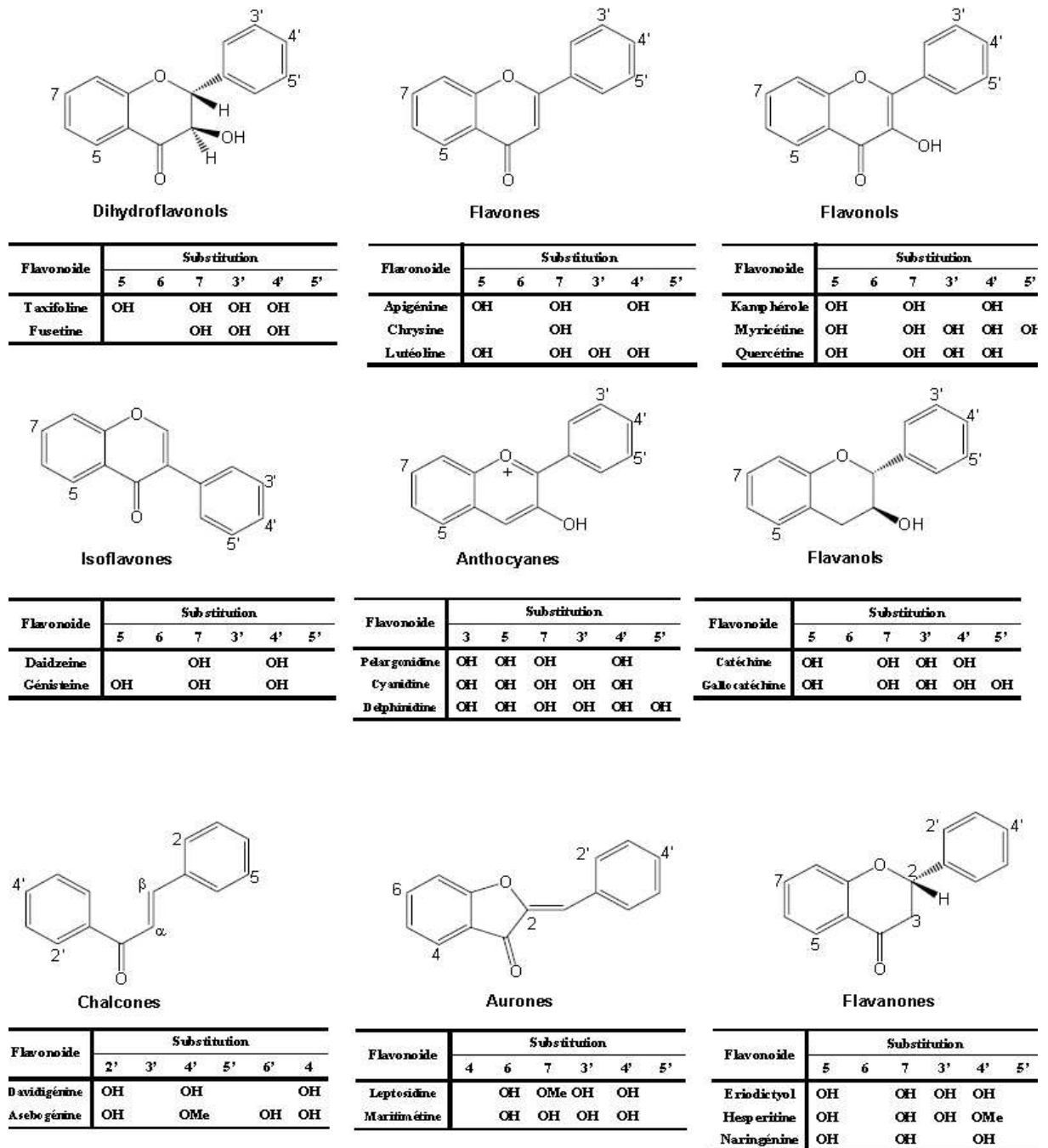
issues d'une hydroxylation, alkylation (méthylation ou prénylation), glycosylation et acylation soit sur la génine, soit sur un groupe hydroxyle d'un ose. Les flavonoïdes sont essentiellement hydroxylés en position 5, 7, 4' et éventuellement en position 3. Ces groupes hydroxyles peuvent être alkylés (Waterhouse, 2002; Livermore, 2002; Rösch et *al.*, 2004; Ferrer et *al.*, 2008).

Les flavonoïdes sont fréquemment rencontrés sous forme glycosylée. La présence d'un sucre modifie les propriétés de la molécule par rapport à son analogue non glycosylée en particulier sa solubilité et son hydrophobicité. La liaison entre l'aglycone et l'ose se fait généralement par l'un des hydroxyles phénoliques, en particulier ceux en position 3 (pour les flavonols) ou en 7 (pour les flavones) et parfois en 6 ou 8 si ces positions sont hydroxylées. La liaison glycosidique pouvant être de type C-O-C ou de type C-C.

Les principaux monosaccharides entrant dans leur composition sont: le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, l'acide D-glucuronique, l'acide D-galacturonique, le L-arabinose, le D-xylose, et occasionnellement le D-allose, l'apiose et le D-mannose. Les sucres les plus couramment rencontrés sont le D-glucose et le L-rhamnose.

Pour les flavonoïdes acylés, la partie acyle est soit un acide aliphatique (acétique, butyrique, isobutyrique, 2-méthylbutyrique, 3-méthylbutyrique, 2-méthylbut-2-énoïque, 2-hydroxypropionique, malonique, succinique, crotonique, 3-hydroxy-3-méthylglutarique, quinique), soit un acide aromatique (gallique, benzoïque, p-hydroxybenzoïque, cinnamique, p-coumarique, caféique, férulique, isoférulique, sinapique), soit les deux à la fois.

Les flavonoïdes sont souvent rencontrés dans les légumes feuilles (salade, chou, épinard, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits (Di Carlo et *al.*, 1999; Debeaujon et *al.*, 2001; Winkel-Shirley, 2002).



**Figure 11:** Différentes classes de flavonoïdes (Di Carlo *et al.*, 1999 and Winkel-Shirley, 2002)

A cette multiplicité de structures, s'associent les différentes propriétés bio-physicochimiques des flavonoïdes. Ce sont des composés très réactifs pour diverses raisons. Tout d'abord, le groupe catéchol ou pyrogallol permet la complexation avec les cations métalliques (Havsteen, 2002). Ils sont ainsi capables d'inhiber ou activer des enzymes métallo-dépendantes ou métallo-sensibles, modulant les réactions biologiques. Ensuite, les flavonoïdes possèdent des

groupements hydroxyles permettant la complexation d'acides nucléiques, d'acides aminés et de sucres par formation de liaisons hydrogènes. Cette propriété de complexation est d'importance pour la compréhension des effets des flavonoïdes en santé humaine détaillés plus loin. Ces groupements hydroxyles leur confèrent également un pouvoir antioxydant. Enfin, les flavonoïdes sont de bons chromophores grâce à leurs électrons délocalisables (certains dans le visible et tous dans les UV proches (380 à 200 nm) (figure 12). Par exemple, les dérivés anthocyaniques, grâce à leur squelette 2-phénylbenzopyrylium, présentent des propriétés de chromophores et sont donc en partie responsables de la couleur des fleurs et des fruits dans le règne végétal (Andersen et Jordheim, 2006).

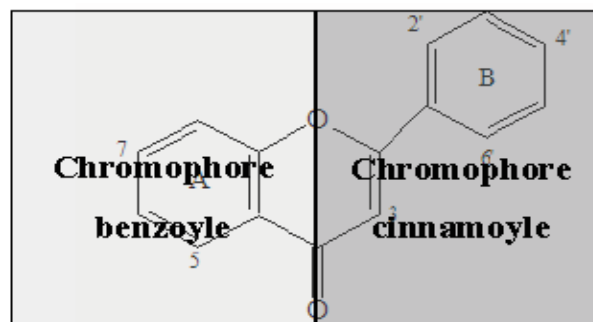


Figure 12: Groupements chromophores des flavonoïdes

## 2.3. Rôle des flavonoïdes

### 2.3.1. Propriétés chez les plantes

Les flavonoïdes sont des molécules primordiales chez les plantes et assurent de nombreuses fonctions. Leur accumulation confère des avantages écologiques et physiologiques majeurs (Harborne et Williams, 2000; Winkel-Shirley, 2002; Dixon et *al.*, 2005). Cette accumulation peut être induite par divers agents biotiques ou abiotiques. Tout d'abord, ils interviennent de manière importante dans la pollinisation et la dispersion des graines (Simmonds, 2003; Downey et *al.*, 2006; Manetas, 2006; Cooley et *al.*, 2008; Rausher, 2008). Ensuite, ils sont impliqués dans la protection de la plante contre les prédateurs (mammifères herbivores, insectes, ...) en donnant un goût très amer et un côté astringent aux plantes (Simmonds, 2001). Leur capacité à complexer les protéines, l'ADN et les sucres peuvent également provoquer des carences nutritionnelles chez les herbivores (Harborne et Williams, 2000). Les isoflavonoïdes, les flavanes et les flavanones sont essentiellement synthétisés comme des phytoalexines en réponse à des attaques microbiennes (Hipskind et *al.*, 1996; Ardi et *al.*,

1998), et présentent également des propriétés antibactériennes, antivirales et pesticides (Stone, 1979; Stevenson and Haware, 1999; Costa-Arbulu *et al.*, 2001). Les flavonoïdes protègent aussi la plante contre les agents pathogènes (bactéries, levures, virus et champignons) (Scalbert, 1991; Malhotra *et al.*, 1996; Stevenson et Haware, 1999). Ils permettent également aux cellules de la plante de lutter contre le stress oxydatif grâce à leur caractère antioxydant (Havsteen, 2002). Certains flavonoïdes sont également synthétisés par les plantes soumises à une carence en minéraux et nutriments (Hodges et Nozzolillo, 1996; Kumar et Sharma, 1999), ou à des températures froides (Christie *et al.*, 1994; Krol *et al.*, 1995; Close *et al.*, 2001; Kasuga *et al.*, 2008). D'autre part, les flavones, les flavonols, de même que les anthocyanes, sont des filtres anti-UV-B des rayons du soleil grâce à leur qualité de chromophores (Ryan et Swinny, 2001), mais ils peuvent aussi agir en se liant directement à l'ADN pour le protéger dans les cellules épidermiques des feuilles et les trichomes (Harborne et Williams, 2000; Dixon *et al.*, 2005; Aron et Kennedy, 2008). Les flavonoïdes peuvent également conditionner la fertilité du pollen et moduler le transport des auxines (Downey *et al.*, 2006; Peer et Murphy, 2007).

### 2.3.2. Propriétés pour la santé humaine et l'industrie

En plus de leurs fonctions biologiques chez la plante, les flavonoïdes possèdent une pléthore de propriétés médicinales régulièrement actualisée. Ces composés sont réputés pour leur caractère antioxydant et de complexation leur confèrent des effets anticancéreux (Harborne et Williams, 2000; Aron et Kennedy, 2008), antimicrobien, antiviral, anti-inflammatoire (De Bruyne *et al.*, 1999), de protection contre les maladies neurodégénératives liées au vieillissement; Alzheimer (Smith, 1996), Parkinson (Bagchi *et al.*, 2000), démence (Orgogozo *et al.*, 1997), et les maladies cardiovasculaires (Rasmussen *et al.*, 2005; Toufektsian *et al.*, 2008). Les flavonoïdes peuvent affecter la stabilité et la fluidité des membranes cellulaires (Yilmaz et Toledo, 2004; Aron et Kennedy, 2008), permettant en outre de lutter contre les maladies cardiaques coronariennes, en inhibant l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL, Low Density Lipoprotein) et la réponse inflammatoire, ils ont une action vasorelaxante et réduisent l'agrégation plaquettaire grâce à leur caractère antioxydant. Beil (1995) les cite pour leur rôle d'inhibiteur des sécrétions acides des cellules pariétales gastriques. En cas d'intoxication aux métaux lourds, leur capacité de complexation des cations métalliques permettrait de les utiliser pour détoxifier les organismes (Havsteen, 2002).

La question de l'absorption et de la biodisponibilité de ces composés a été posée et une partie de la réponse a été apportée (Mc Ghie et Walton, 2007; Passamonti et *al.*, 2009). Il semble que les flavan-3-ols et les anthocyanes passent la barrière de la muqueuse stomacale pour rejoindre la circulation systémique alors que les proanthocyanidines seraient responsables de la protection du tractus intestinal.

De par leurs nombreuses propriétés médicinales, les composés phénoliques naturellement présents dans les végétaux et leurs dérivés présentent donc un intérêt certain et grandissant pour la nutrition humaine, les industries pharmacologiques et cosmétiques. Les flavonoïdes sont également utilisés en tant que colorants pour les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

### 2.4. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos* = fleur et *kyanos* = bleu), sont des formes glucosylées des anthocyanidines. Les anthocyanes sont des pigments solubles dans l'eau qui, du fait de leur instabilité, n'existent pratiquement que sous leur forme glycosylée (liaison 3-glucoside). L'aglycone de l'anthocyane est appelé anthocyanidine. Ces composés sont retrouvés dans les feuilles, les tiges, les pépins et les tissus des racines (Crozier et *al.*, 2009). Cependant, elles ne sont pas présentes dans certains fruits (tomates, piment rouge) dans lesquels les caroténoïdes sont responsables de la pigmentation (Macheix et *al.*, 1990).

Les anthocyanes constituent le plus grand et probablement le groupe le plus important de pigments naturels hydrosolubles. Ils appartiennent au groupe de composés polyphénoliques nommé flavonoïdes. À ce jour, il y a eu plus de 635 anthocyanes identifiés dans la nature, et un tel groupe hétérogène permet d'obtenir des couleurs du rose au rouge et du violet au bleu foncé dans une grande variété de légumes, céréales, fleurs et fruits, comme les baies (Giusti et Jing, 2007). Outre ses propriétés en tant que colorant, les anthocyanes ont récemment attiré l'attention grâce à leurs bénéfices potentiels pour la santé. Basé sur de nombreuses études cellulaires, en modèles animaux, et des essais cliniques chez les humains, il a été suggéré que les anthocyanes présentent des propriétés anti-inflammatoires, anti-cancérigènes, de prévention des maladies cardiovasculaires (Basu et *al.*, 2010), et de contrôle de l'obésité et de réduction du diabète. Ces propriétés sont probablement toutes associées plus ou moins avec leurs propriétés antioxydantes élevées (He et Giusti, 2010).

La coloration des anthocyanes a pour fonction essentielle d'attirer les pollinisateurs par signal visuel. Cependant, les insectes et les oiseaux ne perçoivent pas les couleurs de la même manière que l'homme: par exemple, les abeilles sont très sensibles aux couleurs jaune et bleu, ainsi qu'aux UV proches mais ne repèrent pas la couleur rouge. Elles vont donc préférentiellement se diriger vers les fleurs riches en delphinidine, mais aussi en flavones et flavonols qui ont une teinte blanc crème et dont l'absorption UV est importante. La sélection naturelle a contribué à la distribution des anthocyanes chez les angiospermes (Macheix et *al.*, 2005).

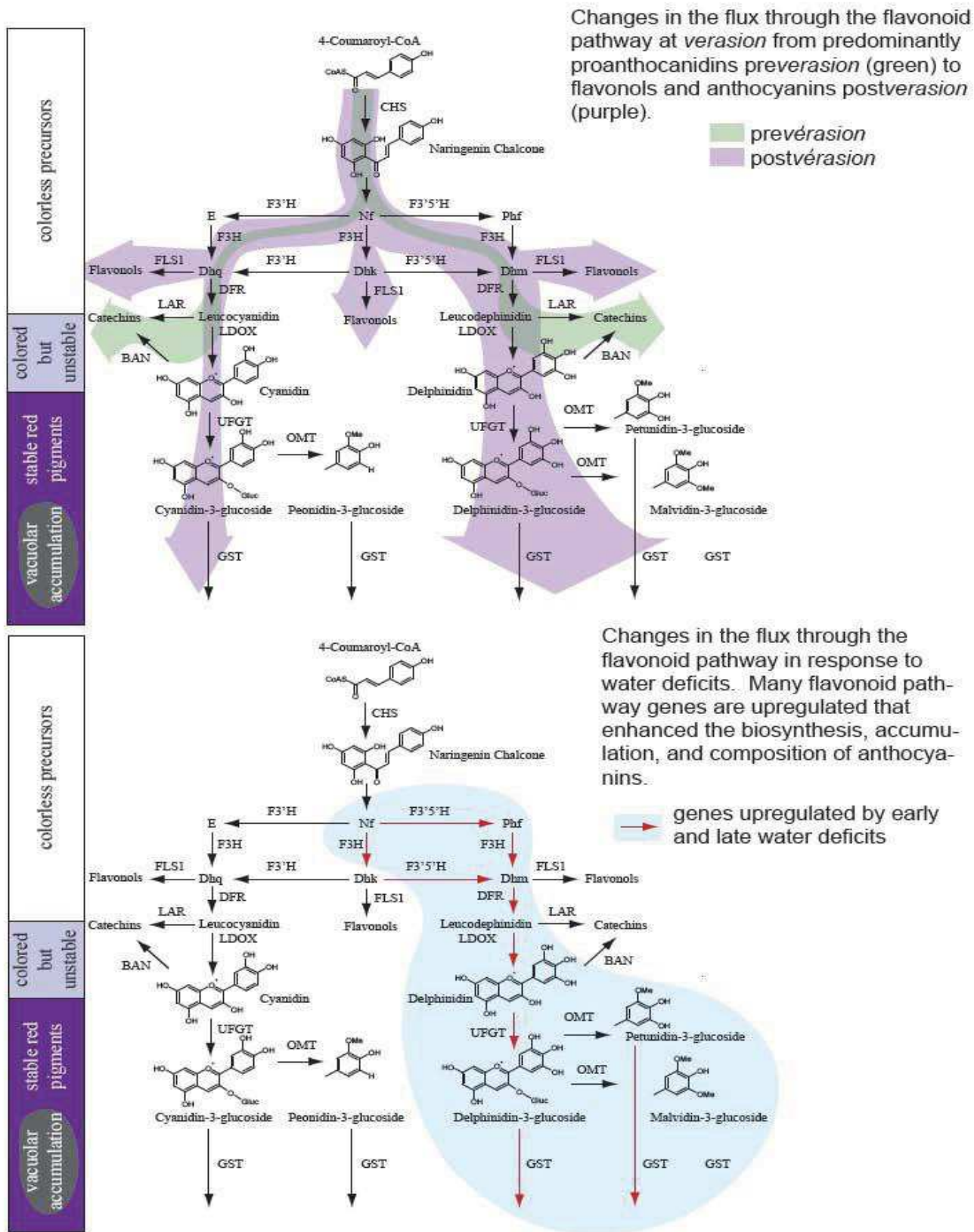
#### 2.4.1. La biosynthèse des anthocyanes

Les différentes étapes de la voie de biosynthèse des anthocyanes ne sont pas encore toutes parfaitement connues. De nombreux travaux viennent régulièrement compléter la connaissance de cette voie métabolique en interaction avec les conditions du milieu (Castellarin et *al.*, 2007) (figure 13).

La phénylalanine est le précurseur de la majorité des composés phénoliques, notamment des anthocyanes, par l'intermédiaire du métabolisme des phénylpropanoïdes (Strack, 1997). La phénylalanine ammonialyase (PAL) est la première enzyme impliquée dans cette biosynthèse. Elle catalyse la production d'acide cinnamique à partir de la phénylalanine. L'acide cinnamique est ensuite converti en acide *p*-coumarique par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H). L'enzyme 4-coumarate CoA ligase (4CL) conduit à la synthèse de l'ester *p*-coumaroyl CoA par liaison de CoA à l'acide *p*-coumarique. La chalcone est le premier flavonoïde synthétisé par condensation du *p*-coumaroyl CoA avec 3 molécules de malonyl CoA par la chalcone synthase (CHS). La chalcone isomerase (CHI) convertit ensuite la chalcone en flavonones, puis la flavonone 3-hydroxylase (F3H) conduit à la formation de dihydroflavonols par hydroxylation des flavonones. Les flavonones ou les dihydroflavonones pourraient subir des hydroxylations sur leur cycle B sous l'action de flavonoïde 3'-hydroxylases (F3'H) et de flavonoïde 3'5'-hydroxylases (F3'5'H). Ces enzymes détermineraient ainsi le type d'anthocyanes produites. L'activité de la F3'H conduirait à l'accumulation d'anthocyanes de type cyanidine dans les plantes alors que celle de la F3'5'H conduirait aux anthocyanes de type delphinidine (Boss et Davies, 2001).

La dihydroflavonol réductase (DFR) catalyse la première étape de la conversion des dihydroflavonols en anthocyanes. Cette enzyme est la cause d'une réduction en position 4 du

cycle C des dihydroflavonols qui conduit à la formation de leucoanthocyanidines. L'anthocyanidine synthase (ANS), la F3H et la flavonol synthase (FLS) sont des membres de la famille des dioxygénases-2-oxoglutarate-dépendante, capable de catalyser l'oxydation des leucoanthocyanidines incolores en précurseurs d'anthocyanidines colorées (Grotewold, 2006). La caractérisation fonctionnelle de l'ANS dans la synthèse des anthocyanes, a été réalisée pour la première fois chez le maïs. L'expression ectopique du gène A2 dans un mutant déficient en activité ANS restaurait la synthèse d'anthocyanes (Yu et *al.*, 2006). Les anthocyanidines, dont la structure flavylium est labile aux pH physiologiques, sont ensuite stabilisées par des glycosylations en position 3 et 5 du cycle C. La stabilisation des anthocyanidines impliquant l'ajout d'un groupement glucose par l'UDP-glucose: flavonoïde 3-O-glucosyltransferase (UFGT ou 3GT) a été beaucoup étudiée (Grotewold, 2006). La delphinidine-3-glucoside et la cyanidine-3-glucoside sont les premières anthocyanes synthétisées et sont considérées comme des précurseurs des autres formes (Boss et Davies, 2001). Des anthocyanes contiennent des sucres autres que le glucose et mettent en jeu des enzymes de types 5GT, 7GT et RT (rhamnolyse transférase) (Yu et *al.*, 2006). A leur tour, les sucres peuvent être acylés par des acides organiques via des acétyltransférases (ACT) ou méthylées (cyanidine et delphinidine) *via* des O-méthyl transférases (OMT).



**Figure 13:** Voie de biosynthèse des anthocyanes à partir de la phénylalanine (Castellarin et al., 2007)



CHS: Chalcone Synthase; CHI: Chalcone Isomérase; FS: Flavone Synthase; IFS: Isoflavone Synthase; FNR: Flavanone réductase; F3H: Flavanone-3-Hydroxylase; FLS: Flavonol Synthase; DFR: Dihydroflavonol Réductase; ANS: Anthocyanidine Synthase; GT: Glucosyl-Transférase.

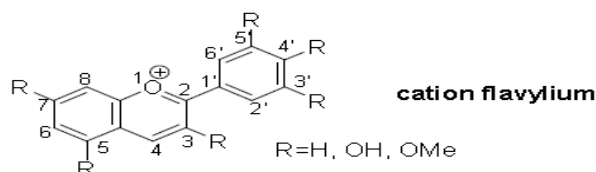
### 2.4.2. Types d'anthocyanes

Ces composés possèdent tous comme squelette de base le cation flavylum (2-phénylbenzopyrylium). Chez les plantes, Harborne et Williams (2001) ont rapporté au moins 400 molécules différentes dérivant de 18 structures d'anthocyanidines, présentant ainsi une palette de couleurs différentes allant du orange-rouge en pH acide au mauve-bleue en pH basique (Waterhouse, 2002; Kong et *al.*, 2003a; Grotewold, 2006, Tanaka et *al.*, 2008). Leurs structures se différencient par le nombre et la position de groupes hydroxyles et méthyles sur le noyau B (tableau 1).

Les anthocyanidines sont le plus souvent glycosylées en position 3 et 5 avec le plus fréquemment des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose) et des di- et tri-saccharides formés par la combinaison des monosaccharides précédents (Brouillard, 1993). La glycosylation et la méthylation de ces aglycones participent à la stabilisation des anthocyanes en les protégeant de l'oxydation. Les sucres peuvent aussi être acylés par les acides cinnamique, *p*-coumarique, acétique, caféique, ferulique, sinapique et malonique, augmentant ainsi la diversité de ces molécules (Brouillard, 1993).

Dans le tableau 1 suivant sont répertoriées quelques anthocyanidines dont sont dérivées les anthocyanes:

Tableau 1: Quelques anthocyanidines naturelles (Kong et al., 2003a)



| Anthocyanidines | Position de substitution |     |    |     |     |    |     |
|-----------------|--------------------------|-----|----|-----|-----|----|-----|
|                 | 3                        | 5   | 6  | 7   | 3'  | 4' | 5'  |
| apigéninidine   | H                        | OH  | H  | OH  | H   | OH | H   |
| aurantinidine   | OH                       | OH  | OH | OH  | H   | OH | H   |
| capensinidine   | OH                       | OMe | H  | OH  | OMe | OH | OMe |
| europinidine    | OH                       | OMe | H  | OH  | OMe | OH | OH  |
| hirsutidine     | OH                       | OH  | H  | OMe | OMe | OH | OMe |
| lutéolidine     | H                        | OH  | H  | OH  | OH  | OH | H   |
| pélagonidine    | OH                       | OH  | H  | OH  | H   | OH | H   |
| pulchellidine   | OH                       | OMe | H  | OH  | OH  | OH | OH  |
| rosinidine      | OH                       | OH  | H  | OMe | OMe | OH | H   |
| tricétinidine   | H                        | OH  | H  | OH  | OH  | OH | OH  |

De nombreux travaux portent sur les anthocyanes, en particuliers chez les fleurs (Macheix et al., 1990). Leur diversité s'explique par les nombreuses possibilités de substitution des cycles A, B et la nature du sucre en position 3. Elles diffèrent par le nombre de fonctions hydroxyles et leur degré de méthylation. Leur complexité augmente avec le nombre, la nature, la position des sucres conjugués, ainsi que ceux des acides aliphatiques ou aromatiques associés (Mazza et Miniati, 1993). Par exemple, en 1998, Tatsuzawa et al. ont entre autres, isolé et caractérisé cinq anthocyanes acylés des fleurs de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae), dont l'anthocyane. C'est un dérivé de la cyanidine qui porte trois glycosides conjugués avec un acyle aliphatique ou aromatique (figure 14) et montre la richesse de la substitution de ces molécules.

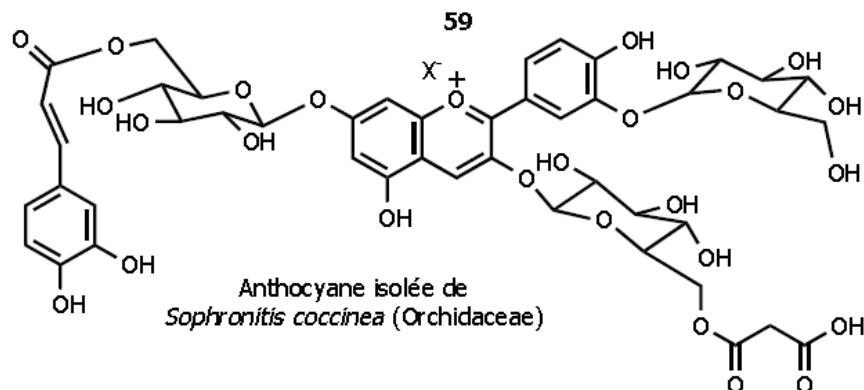


Figure 14: Un dérivé de la cyanidine de trois glycosides conjugués (Tatsuzawa et al., 1998)

### 2.4.3. Changements de structure

La sélection naturelle a contribué à la distribution des anthocyanes chez les angiospermes. La couleur dépend de plusieurs facteurs:

#### A. pH du milieu

Ces composés sont des pigments qui se présentent au départ sous forme d'un cation à hétérocycle central oxydé, le cation flavylum (2-phénylbenzopyrylium). Ce cation arbore plusieurs couleurs selon les modifications qu'il subit ensuite (hydroxylation, méthylation, acylation, ...), et selon le pH ou le solvant dans lequel il se trouve (Macheix et *al.*, 2005; Grotewold, 2006).

La forme flavylum, de couleur rouge, est stable en milieu acide et se transforme, en milieu basique, soit en base carabinol (incolore), en chalcone (jaune) ou base quinonique (bleue) (Brouillard et Dubois, 1977) (figure 15). Toutefois, le cation flavylum est en quantité suffisante pour que sa couleur rouge prédomine.

Ces pigments anthocyaniques sont, au sein de la plante, solubilisés dans les vacuoles des cellules épidermiques dont le pH est proche de 5. Il est donc étonnant d'observer une forte coloration de ces solutions à pH physiologique. Ce paradoxe est expliqué par des interactions électroniques des anthocyanes avec des dérivés hydroxycinnamiques ou d'autres flavonoïdes, qui sont des copigments présents dans la vacuole. Des études physicochimiques ont montré que la copigmentation s'observe à des pH allant de 1 à la neutralité. En général, le maximum d'effet est à pH 3,5 mais peut varier selon le complexe pigment-copigment (Mazza et Brouillard, 1990).

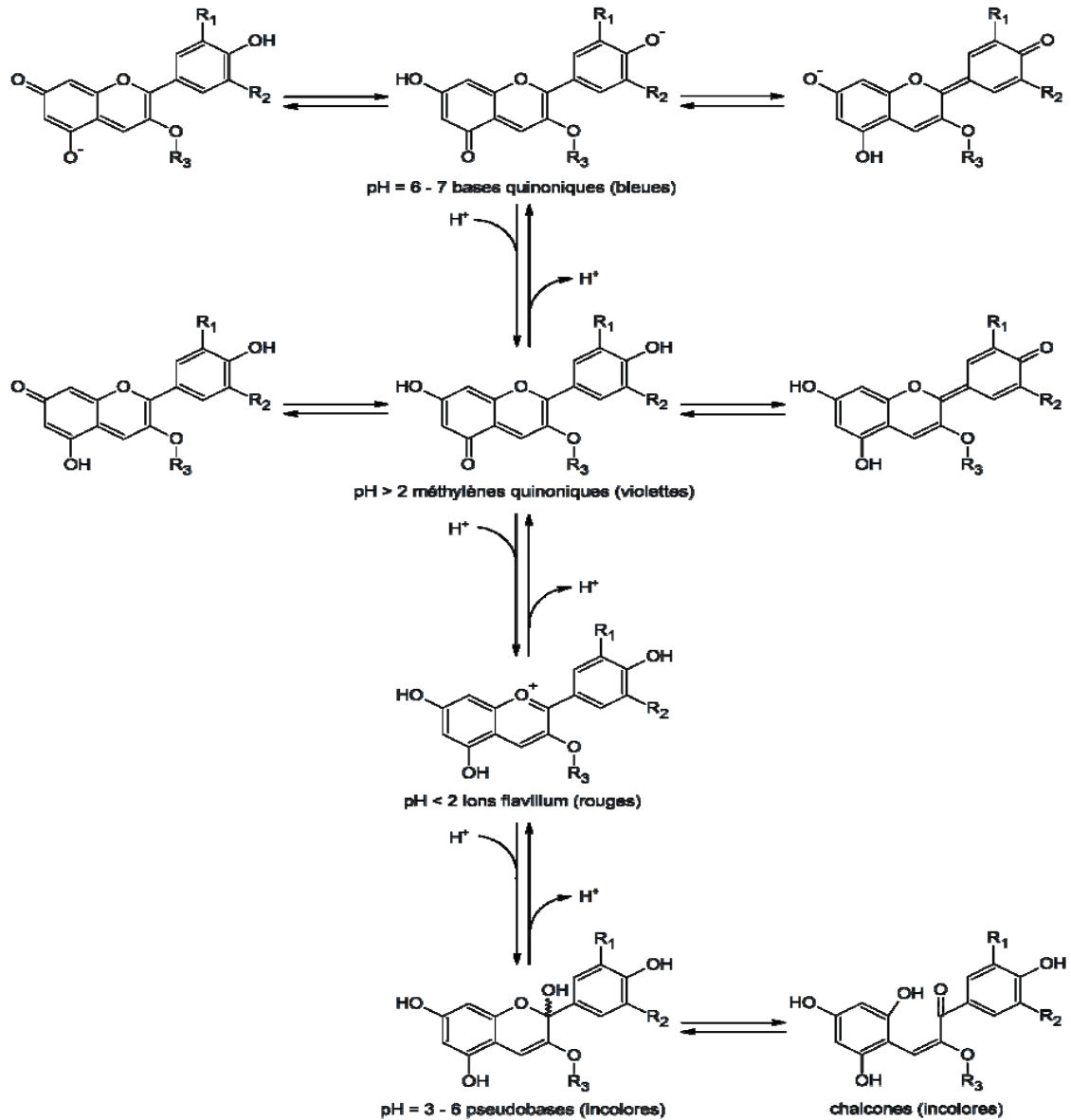
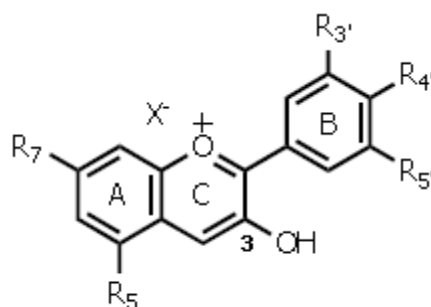


Figure 15: Forme des anthocyanes en fonction du pH (Brouillard and Delaporte, 1977)

R1, R2 = H, OH, OCH<sub>3</sub>; R3 = H, sucre

## B. Le degré de substitution

Le degré de substitution des anthocyanes intervient dans la coloration de ces molécules. Par exemple, quand le nombre de groupements hydroxyles sur le cycle B augmente, l'absorbance maximale des anthocyanes dans le visible est déplacée vers les grandes longueurs d'onde et la couleur passe du rouge-orangé vers le violet (Macheix et *al.*, 2005).



**Figure 16:** Squelette flavylum (Andersen et Jordheim, 2006)

Il est important de noter qu'un hydroxyle en position 3 entraîne un déplacement du jaune (3-déoxyanthocyanidine) vers le rouge orangé et déstabilise le pigment: les 3-déoxyanthocyanidines et les anthocyanes sont plus stables que les anthocyanidines (Keppler and Humpf, 2005). Un hydroxyle en position 5 et un substituant en position 4 stabilisent les formes colorées gênant des réactions d'hydratation en positions 2 et 4 (Kueny-Stotz et *al.*, 2007).

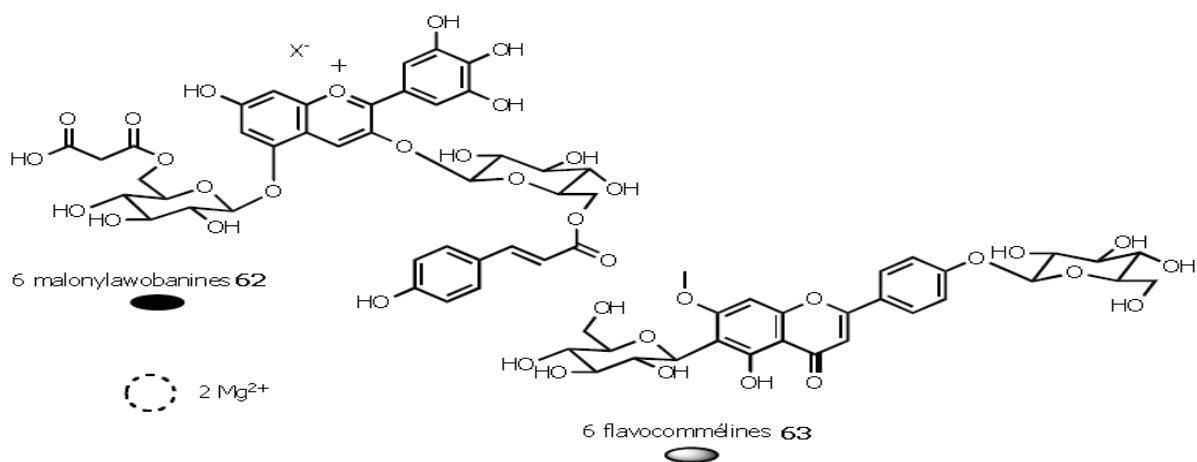
Les glycosides jouent un rôle dans l'intensité de la couleur: les 3-O-glycosideanthocyanidines sont plus colorées que les 3,5- et 5-O-glycosides correspondants, avec 50% d'intensité en plus. L'hydrolyse des glycosides en milieu acide est lente et contribue à la stabilité des anthocyanes à bas pH. Enfin, des esters phénoliques ont une tendance à maintenir stables les pigments à pH neutre et à pH acide grâce à des liaisons hydrogène et du  $\pi$ -stacking intramoléculaire (Macheix et *al.*, 2005).

### C. Interactions avec les ions métalliques

Des sels minéraux se trouvent en solution dans les vacuoles des cellules épidermiques et représentent une source disponible de métaux sous forme cationique. Par exemple, si une anthocyane possède un groupement catéchol (odiphénol), comme la cyanidine ou la delphinidine, elle peut se complexer à ce niveau avec des métaux, tels que  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$  (Keppler et Humpf, 2005).

Il est possible d'avoir simultanément l'association anthocyanes-métal et une copigmentation intermoléculaire avec d'autres flavonoïdes. Cet ensemble complexe va alors modifier la couleur initiale de la fleur, généralement vers le bleu. Kondo et *al.* (1992) ont caractérisé la structure de la commélinine par rayons X. C'est une molécule extraite de *Commelina*

*communis* (Commelinaceae), une plante utilisée dans la pharmacopée traditionnelle en Amérique du Sud: sa couleur bleue caractéristique est due à l'exceptionnel pigment. Et ce phénomène est un exemple rare de complexe supramoléculaire métallo-anthocyanique, associé à des flavones par copigmentation intermoléculaire. Il correspond à une structure organisée de six anthocyanes malonylawobanine, reliées par deux atomes de magnésium  $Mg^{2+}$  et associées à six flavones flavocomméline (figure 17).



**Figure 17:** Protagonistes du pigment supramoléculaire comméline (Kondo et *al.*, 1992 )

$X^-$  est souvent  $Cl^-$

#### 2.4.4. Accumulation d'anthocyanes suite à un stress biotique ou abiotique

La plupart des études concernant l'effet de facteurs biotiques ou abiotiques sur la biosynthèse des flavonoïdes concerne l'effet sur la biosynthèse des anthocyanes. Une conséquence des stress environnementaux, comprenant le stress hydrique, est l'apparition d'un stress oxydatif, c'est-à-dire l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui endommagent les structures cellulaires (Appel et Hirt, 2004). La déficience naturelle en électron des anthocyanes en fait de bons candidats comme pièges de radicaux libres. En dépit de leur instabilité à un pH physiologique, les anthocyanes sont considérées comme des molécules présentant un fort pouvoir antioxydant (Satue Garcia et *al.*, 1997; Wang et *al.*, 1997). Leurs potentialités antioxydantes sont modulées par la variabilité de leurs structures chimiques et notamment de la variabilité électronique de leurs noyaux aromatiques qui jouera un rôle clé dans l'acceptation des électrons libres des molécules radicalaires (Wang et *al.*, 1997).

Un autre effet des anthocyanes concerne leurs propriétés inhérentes à leurs structures physico-chimiques. Ainsi, elles sont capables de protéger des dommages causés par les émissions de lumières UV. Tsuda et *al.*, (1996) ont démontré le rôle des anthocyanes extrait des téguments graines de *Phaseo vulgaris* dans la protection des liposomes suite à une émission de lumières UV.

Certaines études montrent que l'accumulation d'anthocyanes a été observée *in vitro* suite à des expériences d'élicitations. Des traitements UV sur des cellules de carotte, *daucus carotta*, ainsi que des élicitations de type fongique par *Pythium aphanidermatum* semblent aussi augmenter fortement la production d'anthocyanes, en parallèle à une augmentation de l'expression des gènes structuraux associés à la biosynthèse des anthocyanes (Glassgen et *al.*, 1998).

# **Chapitre 2:**

## **Matériel et méthodes**



## I. Études morphologique et biochimique

### 1. Matériel végétal

Les études morphologique et biochimique ont été réalisées sur 10 populations spontanées appartenant à la sous espèce *Teucrium polium* L. *Capitatum*. Les plantes ont été récoltées des régions de Batna, Biskra, Constantine, Khenchla, Mila, Oum El Bouaghi, Sétif, Skikda, Souk Ahras et Tébessa. Ces régions de l'Est algérien se caractérisent globalement par, un climat sec et tempéré ; hiver très froid, avec une pluviométrie modérée à faible, et un été très chaud, qui débute tôt (dès le mois de Mai) et se termine tard (les grandes chaleurs peuvent aller jusqu'au mois de Octobre (Djebaili, 1984) (figure 18, tableau 2).

**Tableau 2:** Données bioclimatiques des sites de récolte de *Teucrium polium* L. *Capitatum*  
D'après l'office national de la météorologie (O.N.M.) (2011)

| Régions         | Latitude     | Longitude   | Altitude (m) | Pluviométrie (mm) | Température (°C) |
|-----------------|--------------|-------------|--------------|-------------------|------------------|
| -Skikda         | 36°52' 34" N | 6°54' 33" E | 1000         | 614.90            | 21.50            |
| -Constantine    | 36°20' 40" N | 6°39' 11" E | 650          | 497.20            | 15.55            |
| -Mila           | 36°27' 01" N | 6°15' 51" E | 347          | 500.00            | 14.90            |
| -Sétif          | 36°30' 06" N | 5°28' 27" E | 2000         | 399.00            | 07.00            |
| -Oum El Bouaghi | 35°52' 31" N | 7°06' 49" E | 1 635        | 477.23            | 17.28            |
| -Khenchla       | 35°27' 49"N  | 7°04' 57" E | 1158         | 460.57            | 09.26            |
| -Batna          | 35°33' 21" N | 6°10' 26" E | 1058         | 390.00            | 15.00            |
| -Souk Ahras     | 36°17' 11" N | 7°57' 03" E | 1000         | 840.74            | 16.70            |
| -Tébessa        | 35°22' 20" N | 8°14' 32" E | 866          | 404.75            | 16.52            |
| -Biskra         | 34°25' 44" N | 5°03' 51" E | 196          | 135.00            | 22.59            |

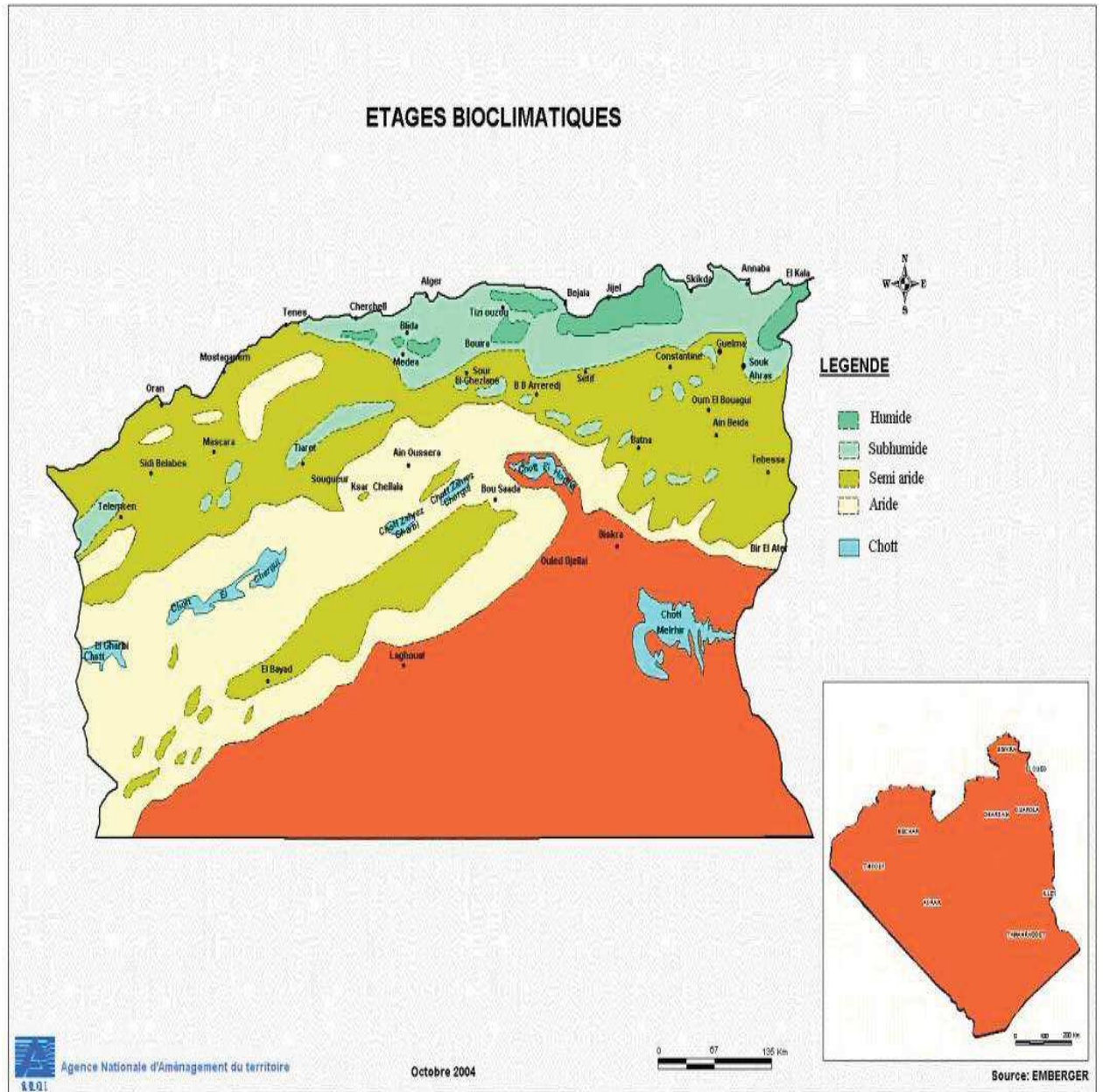


Figure 18: Carte bioclimatique de l'Algérie (Nedjraoui et Bédrani, 2008)

## 2. Etude des trichomes

### 2.1. Méthodologie utilisée pour décrire et classifier les trichomes

L'étude des trichomes des 10 populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* (tableau 2) a été réalisée au laboratoire de biologie végétale de l'université de Tébessa, en Algérie, d'avril 2007 à mai 2008.

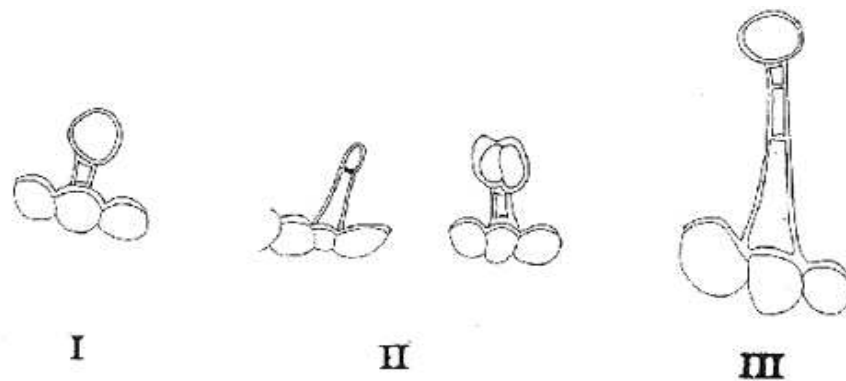
Pour cette étude afin d'avoir le plus grand nombre de poils possible, les échantillons de ces populations ont été fraîchement récoltés en pleine floraison. Chaque spécimen récolté est mis en herbier et un autre spécimen de la même plante fraîche est déposé dans une boîte hermétique et conservé à 4°C pour être examiné le lendemain. L'observation des coupes végétales préparées des faces abaxiale et adaxiale des feuilles et des fleurs des plantes, ainsi que la surface de leurs noix est faite au moyen du microscope optique Olympus, surmonté d'un appareil photographique. Les grossissements utilisés sont: 10, 40 et 100.

Pour différencier les poils non glanduleux, on s'est basé sur leur morphologie. Dans un souci d'homogénéisation, on a adopté pour cette étude la terminologie définie par Cantino (1990). Tandis que, pour les poils glanduleux, on a suivi la classification morphologique de Fahn (1979) complétée par celle de Werker et *al.* (1985 a ; b).

#### ✓ *Poils capités*

Les poils sécréteurs capités observés y étaient classés selon trois types (figure 19):

- le type I caractérisé de poils petits et trapus, pourvus d'un court stipe unicellulaire et d'une tête sécrétrice unicellulaire arrondie.
- le type II caractérisé de poils pourvus d'un stipe unicellulaire ou plus fréquemment bicellulaire et d'une tête sécrétrice unicellulaire allongée; la partie apicale de la tête est surmontée de la chambre sous-cuticulaire dans laquelle se dépose le produit de sécrétion.
- le type III caractérisé par des poils fins et allongés, pourvus d'un stipe de 2 à 5 cellules, parfois plus long, et d'une tête sécrétrice unicellulaire ou bicellulaire arrondie.

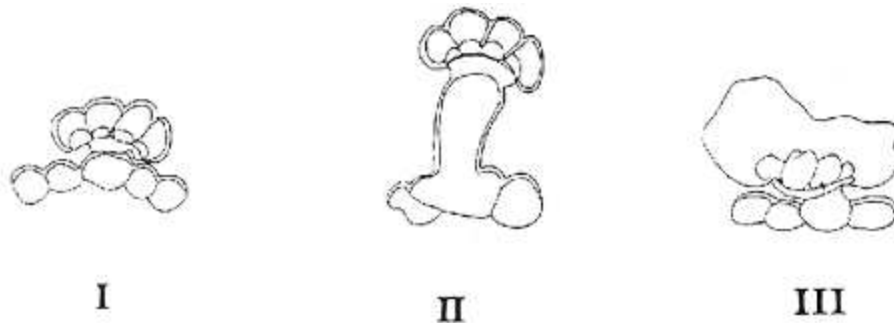


**Figure 19:** Poils sécréteurs capités des Lamiaceae (Arnold and Bellomaria, 1993)

✓ **Poils peltés**

Les poils sécréteurs peltés observés appartiennent aussi à trois types (figure 20):

- le type I caractérisé par des poils pourvus d'un stipe court, unicellulaire, et d'une tête sécrétrice formée de 12 cellules dont l'aspect est régulier;
- le type II caractérisé de poils pourvus d'un stipe unicellulaire très allongé et d'une tête sécrétrice formée de 8 à 12 cellules;
- le type III caractérisé par des poils pourvus d'un stipe très réduit et d'une tête sécrétrice formée de 8 à 12 cellules d'aspect régulier, toutes disposées en éventail autour du stipe.



**Figure 20:** Poils sécréteurs peltés des Lamiaceae (Arnold and Bellomaria, 1993)

## 2.2. Détermination de la longueur des trichomes

Les échantillons ont été pris au hasard à partir des plantes qui ont été prélevées de plusieurs régions de l'Est algérien (figure 18) en Juin 2007 (tableau 2). Quatre plantes de chaque région ont été prises et cinq spécimens des feuilles, ont été préparés à partir de chaque plante (nombre d'analyses indépendantes,  $n = 20$ ). Les feuilles et les calices ont été trempés dans l'eau pour adoucir la cuticule et faciliter le traitement ultérieur, par une goutte de glycérine et un léger échauffement.

La longueur des trichomes longs et courts des différents échantillons est mesurée par un micromètre oculaire graduée, préalablement étalonnée sur une lame micrométrique au microscope optique (x100) (Maleci Bini and Servettaz, 1991).

### **3. Etude des grains de pollen**

#### **3.1. Extraction des grains de pollen**

L'extraction des grains de pollen a été faite par le biais de la méthode d'Erdtman (1960) ou méthode d'acétolyse. Les fleurs de chaque échantillon sont mises dans un boîtier pour éviter le mélange et leur traitement commence comme suit :

- Avec une baguette en verre, le mélange d'acétolyse est remué (9V :1V d'acide anhydrique ( $\text{CH}_3\text{CO}$ )  $\text{O}_2$  et acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ))
- Une quantité de ce mélange est versée dans un tube à essai jusqu'à recouvrement de l'échantillon végétal (fleur)
- Les tubes à essai sont mis dans un bain marie à  $100^\circ\text{C}$  pendant 5 min
- L'opération de chauffage des échantillons est arrêtée par l'acide acétique. Les tubes sont mis à centrifuger pendant 5 min à 2500 tours/min
- La partie supérieure (surnageant) est jetée et remplacée par l'acide acétique
- Les tubes coniques sont remis en centrifugation à la même vitesse et même durée
- A la partie supérieure de l'alcool est ajouté, puis filtré, et une nouvelle centrifugation à la vitesse de 2500 tous/min pendant 5 min est effectuée.
- La partie supérieure est jetée, est on rajoute une autre fois de l'alcool, le contenu est transvasé du tube dans des tubes à hémolyse et une nouvelle centrifugation à la vitesse de 2500 tous/min pendant 5 min est effectuée. Le surnageant est jeté et on ajoute cette fois de la glycérine.

#### **3.2. Préparation des lames**

Pour chaque échantillon, on a prélevé du tube à hémolyse, 50  $\mu\text{l}$  du mélange, placer entre lame et lamelle. Chaque préparation est numérotée et luttée en utilisant le baume de canada ou du vernis à ongle transparent, pour mieux conserver l'échantillon et éviter les inclusions d'air.

### **3.3. Observation microscopique**

Les observations microscopiques ont été faites avec un microscope optique de la marque Olympus. Les dimensions des grains de pollen ont été mesurées par un objectif oculaire, le micromètre (10/1 mm) aux grossissements 40 et 100.

### **3.4. Paramètres étudiés**

Pour chaque échantillon de grain de pollen, trois répétitions ont été effectuées.

#### **a- Identification du type pollinique**

Selon l'aperture, absence ou présence de pores et sillons

#### **b- Mesures des axes**

On mesure l'axe équatorial (E) et l'axe polaire (P) :

- $P=E$  : le grain de pollen est sphérique
- $P>E$  : le grain de pollen est longiaxe
- $P<E$  : le grain de pollen est bréviaxe.

### **3.5. Vérification de l'identification**

Après identification du type pollinique et prise des mesures de chaque échantillon, ces notations ont été vérifiées au niveau de l'atlas pollinique (Reille, 1992; 1995; 1999).

### **3.6. Prises des photos**

Les photos des plantes, des trichomes et des grains de pollen ont été prises par le biais d'un appareil numérique de marque Sony modèle DSC-W55.

## 4. Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE

### 4.1. Principe

Toutes les techniques d'électrophorèse sont basées sur le principe de la mobilité séquentielle des molécules protéiques dans un support soumis à un courant électrique. Cette mobilité est fonction de: (1) La charge électrostatique fournie par les cinq acides aminés acides ou basiques; (2) La dimension et la forme des protéines; (3) L'intensité du champ électrique (tension aux électrodes et conductibilité de support); (4) La taille des mailles du support; (5) La température de l'électrolyte.

La technique d'électrophorèse utilisée est celle proposée par Laemli (1970) modifiée par Payne and Corfield (1979) et Singh *et al.*, (1991). La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu, en présence d'un détergent ionisé, le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).

En effet le Mercapto-éthanol dénature les protéines en rompant les ponts disulfures entre les chaînes peptidiques de la protéine, et le SDS détruisant les liaisons faibles. Ceci aboutit à la formation d'un complexe SDS-protéines dénaturé avec une charge négative qui masque la charge nette intrinsèque des protéines et annule ainsi la différence de migration due à la charge électrique. Il permet donc une séparation selon la taille, la conformation et la masse moléculaire. La vitesse de migration des protéines dépend surtout de la taille des mailles du gel et de la température de l'électrolyte.

### 4.2. Extraction des protéines

Les protéines de réserve sont extraites selon la méthode de Payne and Corfield (1979) à partir de farine de graines préalablement pesées, puis écrasées au mortier. Elle est réalisée avec une solution stock d'extraction à 42.5% (annexe 1), constituée de SDS (Sodium Dodecyl-Sulfate), de glycérol qui a pour effet d'alourdir la protéine, de Tris 1M qui confère le pH 6.8 et un agent colorant le bleu de Bromophénol.

Cette méthode est réalisée pour l'étude des protéines de haut poids moléculaire comme les gluténines. Elle s'opère après réduction des sous-unités protéiques avec le mercapto-éthanol à 2.5%.

Le mélange est agité pendant 30 minutes et ensuite incubé à 65°C pendant 30 minutes, puis centrifugé pendant 5 minutes à 10000 tours/min. les échantillons sont prêts pour une révélation des protéines par SDS-PAGE. Le protocole est détaillé en annexe 1.

### **4.3. Lecture des diagrammes**

La mobilité relative est calculée, à partir de la mobilité réelle (la distance parcourue par la bande entre le point d'application de l'échantillon et la position de la bande correspondante dans le gel). A cet effet, une bande de référence (bande 50) commune à toutes les populations analysées a été choisie pour tenir compte des variations de mobilités observées entre les gels. La mobilité relative de chaque bande est déterminée par rapport à la bande 50, par l'application de la formule :

$$\text{Mobilité relative (Mr)} = (\text{Mobilité en mm d'une bande particulière} / \text{Mobilité en mm de la bande de référence}) \times 50$$

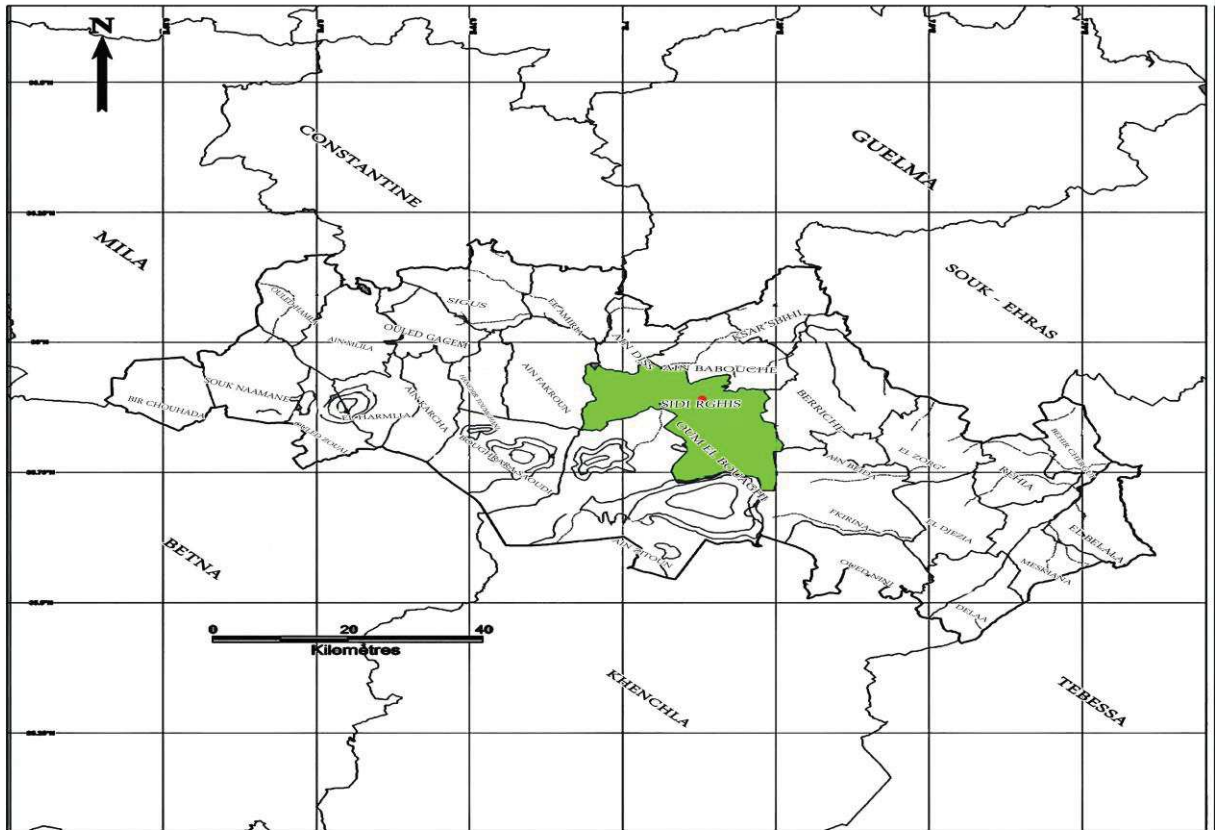
Le calcul des indices de ressemblances (IRS) a été utilisé pour l'appréciation du polymorphisme des protéines totales. Le dendrogramme est établi grâce au logiciel SPSS version 20.0 qui utilise la distance moyenne entre classes comme méthode d'agrégation par le calcul de la distance euclidienne.

## **II. Etude physio-biochimique**

### **1. Situation géographique de site d'étude**

La wilaya d'Oum El Bouaghi appelé autrefois Canrobert est implantée aux confins méridionaux de l'Atlas tellien, occupant ainsi une position médiane dans la partie « hauts plateaux » Est du pays. Elle se situe à une altitude variant de 700 à 1000 mètres. Elle est limitée par sept wilayas: Constantine et Mila au Nord, Guelma et Souk Ahras au Nord-est, Khenchela au Sud, Batna au Sud-ouest et Tébessa au Sud-est (figure 21) (35°52'31" N, 7°06'49" E).





**Figure 21:** Carte de localisation de la zone d'étude « montagne de Sidi Rghiss » à la wilaya d'Oum El Bouaghi

## 2. Données climatiques d' Oum El Bouaghi

Les données climatiques concernant les précipitations et les températures de la période d'étude ont été ramenées de la station météorologique d'Oum El Bouaghi, il est de même pour les relevés de 2001 à 2011 à pour d'éventuelles comparaisons.

L'indice de l'aridité est un indicateur quantitatif du degré du manque d'eau présente à un endroit donné (Oliver, 2006). Cet indice d'aridité a été calculé selon la formule De Martonne:

$$I = P / (T + 10)$$

Avec :

**I** : indice d'aridité

**P** : précipitations annuelles (mm)

**T** : températures moyenne et annuelle ( $^{\circ}\text{C}$ )

**I = 5** : climat hyper aride

**5 < I < 7.5**: climat désertique

**7.5 < I < 10** : climat steppique

**10 < I < 20** : climat semi aride

**20 < I < 30** : climat tempéré.

### 3. Méthodes d'analyse du sol

Pour les analyses pédologiques, environ un (01) kg de sol par échantillon est prélevé du site d'étude Sidi Rghiss de wilaya d'Oum El Bouaghi au printemps 2011. Les échantillons de sol sont séchés à l'air, tamisés à 2 mm et conservés dans des sachets. Les paramètres suivants sont mesurés et ont fait l'objet de 5 répétitions:

- La granulométrie est déterminée par tamisage humide (AFNOR, 1990),
- Le pH et la conductivité électrique (CE) sur une suspension sol- eau (1/5),
- L'humidité est déterminée selon la méthode de Mathieu et Pieltain (2003),
- Les teneurs en calcaire total sont déterminées par calcimétrie volumétrique (Dermech et *al.*, 1982) dont le principe consiste à décomposer les carbonates de calcium sous l'action d'un acide fort (HCl) dilué au 1/3 et à mesurer le volume du  $\text{CO}_2$  dégagé,
- Le calcaire actif est déterminé par la méthode de Drouineau (Mathieu and Pieltain, 2003). Il est dosé en se basant sur la propriété du calcium de se combiner aux oxalates pour donner l'oxalate de calcium insoluble. L'excès de solution d'oxalate est ensuite dosé par une solution de permanganate de potassium en milieu sulfurique,
- Le carbone organique est dosé par la méthode d'Anne (Bonneau and Souchier, 1994) par oxydation du carbone avec le bichromate de potassium en excès ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) en milieu acide et dosage de la quantité de bichromate non consommée en retour par le sel de Mohr. Le

pourcentage de la matière organique est estimé en multipliant le taux de carbone par 1.72 (Mathieu et Pieltain, 2003),

- L'azote total (N%) a été déterminé par la méthode de Keldjahl décrite par Bonneau et Souchier (1994). Elle consiste à une minéralisation de la matière organique azotée par l'acide sulfurique concentré à chaud. L'azote transformé en ammoniac est fixé par l'acide sulfurique à l'état de sulfate d'ammonium,

- Les nitrates sont déterminé par la méthode au salicylate de sodium (Rodier et *al.*, 1996). Les nitrates donnent du paranitrosalicylate de sodium coloré en jaune.

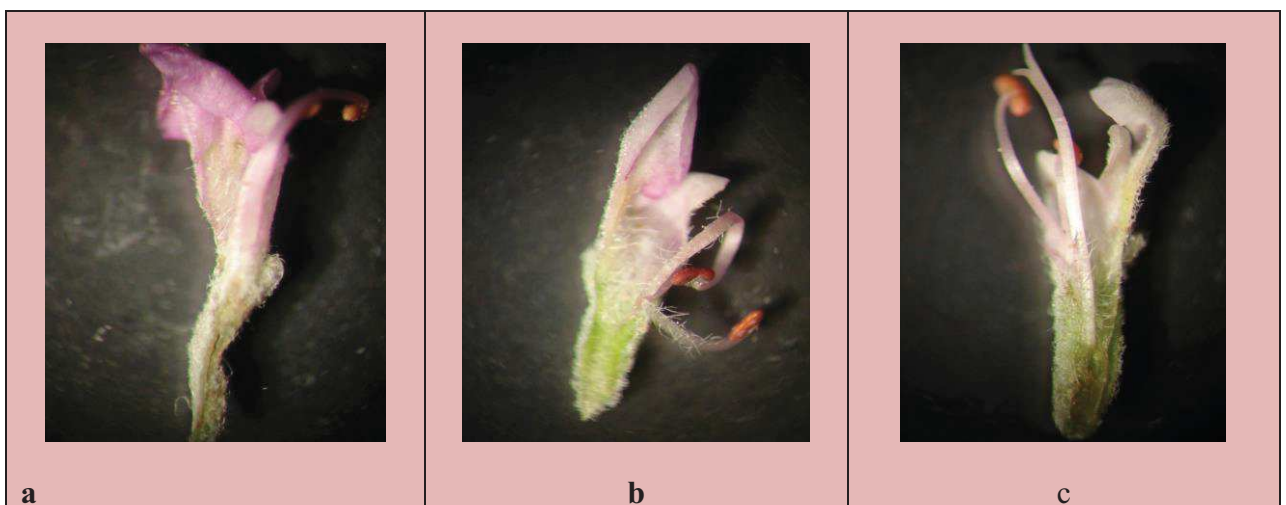
- Le phosphore total est déterminé suite à une attaque par l'acide perchlorique à 60% (Gherroucha, 1995),

- Et le phosphore assimilable est déterminé par la méthode d'Olsen (Mathieu et Pieltain, 2003) suite à une extraction avec une solution de bicarbonate de sodium à 0.5 M,

#### 4. Analyses physio-biochimiques

##### 4.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de trois phénotypes de la plante *Teucrium polium* L. *Capitatum* de la wilaya d'Oum El Bouaghi (montagne de Sidi Rghiss). Ces phénotypes ont été récoltés au mois de Juin 2011, en se basant sur la couleur des fleurs; mauve, rose et blanche.



**Planche 1** : Fiche descriptive des trois phénotypes étudiés de *Teucrium polium* L. *Capitatum*  
a: phénotype mauve, b: phénotype rose, c: phénotype blanc

#### 4.2. Dosage des anthocyanines

0.1g de la matière fraîche est mélangé avec 1ml d'un réactif formé de: 18% de 1-propanol, 1% HCl et 81% d'eau distillée, les tubes sont incubés au bain marie à 100°C pendant 3mn, puis l'ensemble est gardé toute la nuit à la température ambiante.

Les absorbances sont ensuite successivement déterminées à 535 et 650 nm. La quantité des anthocyanes est estimée selon l'équation:  $A^{0} 535 - A^{0} 650/g$  de la matière fraîche (Deikman and Hammer, 1995).

Quatre échantillons par traitement sont utilisés.

#### 4.3. Dosage des pigments photosynthétiques

Les feuilles de la plante sont broyées à sec, puis à 0.1g de la matière sèche sont ajoutées 10ml d'acétone (80%), puis gardés dans des conditions de faible éclairage et à froid pendant 48h.

Le broyat est filtré au travers du papier filtre et son absorbance est lue au spectrophotomètre UV à différentes longueurs d'ondes.

A 663.2, A 646.8 et A 470 nm avec un blanc constitué d'acétone à 80%.

Les teneurs en pigments photosynthétiques et caroténoïdes sont données par le solvant acétone (80%) par les équations de Lichtenthaler (1987) suivantes:

$$\text{Chlorophylles (a)} = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$\text{Chlorophylles (b)} = 21.50 A_{646.8} - 5.10 A_{663.2}$$

$$\text{Chlorophylles (a) + (b)} = 7.15 A_{663.2} - 18.71 A_{646.8}$$

$$\text{Caroténoïdes} = 1000 A_{470} - 1.82 \text{ Chl (a)} - 85.02 \text{ Chl (b)} / 198$$

Les résultats sont exprimés en µg de pigments/100mg matière végétale sèche.

Cinq échantillons par traitement sont utilisés.

#### 4.4. Dosage des sucres totaux (méthode au phénol-sulfurique)

Les oses totaux sont dosés selon Dubois *et al.* (1956): l'extraction des sucres se fait après évaporation de 100 mg de la matière fraîche dans 2ml de l'éthanol à 80% dans un bain marie

à 80°C pendant 10 mn. On ajoute 10 ml d'eau. Les tubes à essai sont placés à l'obscurité. 2 ml de la solution à doser sont mis dans un tube à essai avec 1 ml de phénol (à 5% dans l'eau). 5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sont ajoutés et le mélange est agité immédiatement. Une coloration jaune se développe, stable durant plusieurs heures. Les tubes sont incubés au bain-marie à 25-30°C pendant 20 minutes, puis refroidis sous eau à 20°C. L'absorbance est mesurée à 485 nm. Les teneurs sont déterminées en référence à une gamme étalon de glucose (annexe 5.1).

Cinq échantillons par traitement sont utilisés.

## 5. Identification spectrale des produits isolés

### 5.1. Spectroscopie infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique d'analyse qui sert principalement à déterminer la présence de groupements fonctionnels dans les molécules organiques et les structures dans certaines molécules simples. Elle est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans l'échantillon (Peter et *al.*, 2004).

#### ✓ Principe

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchi ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm<sup>-1</sup> et 400 cm<sup>-1</sup> (2.5 – 25 µm) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption.

#### ✓ Mode opératoire

Les spectres infrarouges ont été effectués après avoir mélangé les produits purifiés dans des plaques de NaCl, par un spectrophotomètre de type Génisis Séries FTIR de Mattson.

## 5.2. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance

La technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique est la chromatographie liquide à haute performance (pression), abrégée CLHP (HPLC en anglais).

### ✓ *Principe*

La méthode de séparation qu'elle utilise fait appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire, mais avec un appareillage plus sophistiqué. La grande différence par rapport à la chromatographie classique réside dans la durée d'élution. Cette vitesse est obtenue par l'application d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient constant le débit de l'éluent, elle se distingue également de la chromatographie classique par l'utilisation d'un détecteur dont le message est enregistré, puis exploité par un détecteur relié au système (Braithwaite et Smith, 1999).

### ✓ *Mode opératoire*

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe HPLC-RP-C18, équipé d'éléments suivants:

- Une colonne (d'une longueur de 125 mm et d'un diamètre interne de 4,6 mm) contenant la phase stationnaire apolaire (phase inverse), cette dernière est constituée de silice modifiée chimiquement par greffage de résidus (C-18), ces colonnes en phase inverse permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques
- Un système de pompage, pompe: VARIAN 9010, pour déplacer la phase mobile à haute pression (plusieurs dizaines de bars);
- Un injecteur: VARIAN 9100, pour introduire l'échantillon, dans le système à haute pression;
- Un détecteur monochrome: VARIAN 9065;
- Un logiciel informatique permettant de visualiser les signaux enregistrés par le détecteur.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Débit: 0,5 ml/min ;

- Pression de travail : 100-150 bars ;
- Volume d'injection: 30 µl ;
- Longueur d'onde: 254 nm ;
- Concentration de l'échantillon: 1–5 mg/ml ;
- Temps d'analyse : 15 min ;

Phase mobile est de composition constante (mode isocratique), elle est composée d'un mélange méthanol - eau (60 : 40 V/V) (Kuntie et *al.*, 2007).

### 5.3. Analyse spectrophotométrique UV-visible

#### ✓ Principe

La spectrophotométrie est une méthode quantitative ainsi qualitative, sensible, et permet d'analyser les échantillons à faible concentration. Les spectres sont caractéristiques aux molécules, et procurent des informations sur le squelette moléculaire et les différentes substitutions.

Le spectre UV-visible des composés flavonoïques solubilisés dans le méthanol présente deux pics; qui se situent respectivement entre 320 nm – 380 nm correspond au cycle B et 240 nm – 270 nm correspond au cycle A. Ce spectre est susceptible d'être modifié en présence des réactifs, dont les changements du spectre apportent des indications sur la position des groupements hydroxyles de la molécule.

#### ✓ Protocole de la série spectrale

Cette technique d'analyse se base sur les différentes propriétés chélatantes des réactifs utilisés, permet principalement de préciser la présence ou l'absence des substitutions sur le squelette flavonique de base (Harborne, 1980).

#### 1<sup>ère</sup> série

Enregistrement du spectre méthanolique de produit analysé.

Enregistrement du spectre suite à l'ajout de 3 gouttes d'une base forte NaOH.

Enregistrement du même spectre d' NaOH après 5 minutes.

**2<sup>ème</sup> série**

Enregistrement du même spectre méthanolique.

Enregistrement du spectre suite à l'ajout de 5 gouttes d'AlCl<sub>3</sub> à 5%.

Enregistrement du spectre suite à l'ajout de HCl (2N) à la même solution d'AlCl<sub>3</sub>.

**3<sup>ème</sup> série**

Enregistrement du même spectre méthanolique.

Enregistrement du spectre suite à l'ajout de deux pincées de NaOAc à la solution méthanolique.

Enregistrement du spectre suite à l'ajout d'une pincée d'acide borique H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

Les flavonoïdes, comme la majorité des composés aromatiques sont chargés de différents groupements chromophores qui lorsqu'ils se conjuguent aux réactifs de la série spectrale causent des déplacements spectraux bathochromiques, hyperchromiques, ou hypsochromiques de la bande I et II en comparant le spectre du réactif avec le spectre méthanolique.

Le tableau suivant donne les changements possibles suite à l'ajout des différents réactifs, et leurs interprétations.



**Tableau 3:** Interprétation des déplacements de BI et BII (Markham, 1982)

| Réactif  | Déplacement en nm  |           | Interprétation                 |
|--|--|-----------|--------------------------------|
|  | BI   | BII       |                                |
| MeOH   | 310 – 350  | 250 – 280 | Flavone                        |
|  | 330 – 360  | 250 – 280 | Flavonol 3 – substitué         |
|  | 350 – 380  | 250 - 280 | Flavonol 3 – OH                |
| NaOH (BI)  | + 45 nm à 60 nm avec stabilité d'intensité.                                    |           | 4' – OH                        |
|  | + 50 nm à 60 nm avec diminution d'intensité.                                   |           | 3, 4' di – OH                  |
|  | Faible déplacement avec diminution d'intensité.                                |           | 4' – O Me                      |
|  | Absence de pic entre 320 nm et 335 nm.   |           | 7 – OR                         |
|  | Apparition d'un pic entre BI et BII.<br>Transformation de Bi en une inflexion. |           | 7 – OH<br>5 – OH               |
| AlCl <sub>3</sub> / MeOH                         | + 20 nm à 45 nm  |           | 5 – OH                         |
|  | + 60 nm  |           | 3 – OH                         |
| AlCl <sub>3</sub> + HCl /<br>AlCl <sub>3</sub>   | - 30 nm à 45 nm (hypsochromique)   |           | 3', 4' di – OH                 |
|  | - 10 nm  |           | 3', 4'- OH, O Me               |
|  | - 20 nm  |           | 3', 4', 5' tri – OH            |
| AlCl <sub>3</sub> + HCl /<br>MeOH                | + 17 nm à 55 nm  |           | 5 – OH                         |
| NaOAc / MeOH                                     | + 20 nm à 80 nm  |           | 7 – OH                         |
|  | Déplacement très faible  |           | 7 – OR ; 7 – OH et 6-OR        |
|  | Diminution d'intensité avec le temps   |           | 6,7 ; 7, 8 ou 3', 4' di-OH     |
|  | Spectre se décompose avec le temps   |           | 5,6,7 ; 5,7,8 ; 3,3',4' tri-OH |
| NaOAc +<br>H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / MeOH | + 12 nm à 36 nm  |           | 3', 4' di – OH                 |
|  | + 5 nm à 10 nm   |           | 6,7 ; 7, 8 di – OH             |

### III. Les activités biologiques

#### 1. Matériel végétal

La plante de *Teucrium polium* L. *Capitatum* a été récoltée au mois de juin 2011 des wilayas de Sétif (Babour) et Biskra (Ouled Djallel). La partie aérienne est nettoyée, séchée à l'ombre et à température ambiante, puis stockée à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

## 2. Screening phytochimique

Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques dans un organe végétal. La présence de ces derniers est attestée par la formation d'un précipité, le changement de coloration du milieu.

Les différents groupes de composés: les alcaloïdes, les polyphenols, flavonoïdes, anthocyanes, tannins, les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes, les hétérosides cardiotoniques, les huiles essentielles, les sucres réducteurs (oses-holosides et mucilages) contenus dans les extraits de *Teucrium polium* L. *Capitatum* ont été mis en évidence selon les méthodes décrites par Ronchetti et Russo (1971); Harborne (1985); Wagner et Bladt (2001) et Békro et al. (2007).

### ✓ *Les Alcaloïdes*

#### - **Macération**

1mg du lyophilisat est pesé puis mélangé à 5 ml d'une solution H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%). Le mélange obtenu est mis sous agitation et macéré pendant 3 heures. Ce mélange est ensuite filtré et le volume complété avec de l'eau distillée à 5 ml. 1 ml de filtrat obtenu est placé dans deux tubes différents, puis 5 gouttes du réactif de Dragendorff sont ajoutées dans l'un et 5 gouttes de réactif de Mayer dans l'autre. L'apparition de précipités rouges orangés et blancs jaunâtres respectivement dans ces tubes, indiquent la présence des alcaloïdes.

### ✓ *Dosages des polyphénols*

Une infusion aqueuse (5%) est préparée, puis laissée à macérer pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite filtré et le volume ajusté à 10 ml.

- **Flavonoïdes** : A 1 ml de l'infusion obtenue ci-dessus, on a ajouté 1 ml d'alcool-chlorhydrique, 1ml d'alcool isoamylique puis quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration:
  - Rose orangé indique la présence de flavones;
  - Rose violacé indique la présence de flavanones;
  - Rouge indique la présence de flavonols, flavanonols.

- **Anthocyanines (leucoanthocyanes)** : A 1 ml de l'infusion ci-dessus est ajouté 1 ml d'alcool-chlorhydrique, 1ml d'alcool iso amylique puis le mélange est chauffé à reflux au bain-marie pendant 20 minutes. L'apparition d'une coloration:
  - Rouge-cerise violacé indique la présence de leucoanthocyane;
  - Brun-rouge indique la présence des catéchols
- **Tanins**

A 1 ml de l'infusion ci-dessus est ajouté 200 µl de FeCl<sub>3</sub> (1%). En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu - noir.

La différenciation entre les tanins galliques et catéchiques se fait par le réactif de Stiasny (méthanal-acide chlorhydrique concentré 2 : 1 v/ v).

- **Tanins catéchiques:** A 1 ml de l'infusion, on ajoute 0,5 ml de réactif de Stiasny; le mélange obtenu est chauffé au bain-marie à 90 °C pendant 15 minutes. L'apparition d'un précipité montre la présence des tanins catéchiques.

- **Tanins galliques:** Pour révéler les tanins galliques, on a filtré le mélange précédemment chauffé et prélevé 0,5 ml du filtrat. Le filtrat est ensuite saturé avec de l'acétate de sodium, à ce mélange il est ajouté 100 µl d'une solution de FeCl<sub>3</sub> à 1%. Le développement d'une teinte bleu-noire indique la présence des tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

#### ✓ **Saponosides**

0,5 g de la poudre de l'extrait est mélangé à 10 ml d'eau distillée, puis porter à l'ébullition pendant 5 minutes. Il est ensuite refroidi et agité vigoureusement pendant 2 minutes. L'apparition d'une mousse plus ou moins importante témoigne la présence des saponines:

- absence de la mousse = test négatif.
- l'épaisseur de la mousse inférieur à 1 cm = test plus ou moins positif.
- l'épaisseur de la mousse entre 1 - 2 cm = test positif.
- l'épaisseur de la mousse supérieur à 2 cm = test très positif.

### ✓ *Les Coumarines*

La solution à analyser est obtenue après une macération durant 24 heures de 0,5 g du lyophilisat dans 10 ml d'éther éthylique. Le mélange est ensuite filtré et le volume est complété à 10 ml. On a prélevé, 1ml du filtrat ci-dessus puis évaporé à sec le solvant et ajouté au résidu 400 µl d'eau chaude. Le mélange obtenu est ensuite partagé dans deux tubes à essais.

Au contenu de l'un, on ajoute 100 µl de NH<sub>4</sub>OH (25 %). Après agitation, on observe la fluorescence sous UV à 366 nm. La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence dans le tube.

### ✓ *Terpènes*

0.3 à 0.4g de la matière sèche a été macérée dans 15ml de méthanol à 70%, puis le filtrat est évaporé à sec. Le résidu obtenu est dissous dans le chloroforme. On ajoute ensuite quelques gouttes d'acide sulfurique concentré au fond du tube sans agiter. La formation d'une coloration jaune qui passe au bout de deux minutes au rouge, révèle la présence des terpènes.

### ✓ *Huiles essentielles*

On prend 10g du produit sec broyé, et on l'introduit dans un hydrodistillateur, on chauffe doucement pendant 4 à 5 heures. L'apparition d'une couche d'huile sur le distillat indique la présence des huiles essentielles.

### ✓ *Les Dérivés Anthracéniques:* y compris les quinones et les anthraquinones

- **Extrait chloroformique:** A 1 g de drogue en poudre, ajouter 10 ml de chloroforme et chauffer au bain-marie pendant 3 mn, filtrer à chaud et compléter à 10 ml.

- **Hydrolysât:** A une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, ajouter 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Maintenir le tube à essai dans le bain marie bouillant pendant 15 mn. Refroidir sous un courant d'eau et filtrer. Compléter à 10 ml avec l'eau distillée.

- **Caractérisation**

- **Dérivés anthracéniques libres:** 1 ml d'extrait chloroformique + 1 ml de NH<sub>4</sub>OH dilué puis agitation; la coloration plus ou moins rouge indique la présence d'antraquinones libres.
  
- **Dérivés anthracéniques combinés**
  - ***O-hétérosides (antraquinones): O-hétérosides à génines réduites C-hétérosides :*** Prélever 5 ml d'hydrolysât et agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai, ajouter 1 ml de NH<sub>4</sub>OH dilué. Agiter, la présence d'antraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.
  
  - ***O-hétérosides à génines réduites:*** Chauffer 5 ml d'hydrolysât + 3 à 4 gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 10 %, pendant 5 mn au bain-marie. Refroidir, agiter avec 5 ml de chloroforme. Soutirer la phase chloroformique et l'introduire dans un tube à essai, ajouter 1 ml de NH<sub>4</sub>OH dilué et agiter. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou anthrones, la coloration rouge est plus intense.
  
  - ***C-hétérosides:*** Reprendre la phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des *O*-hérosides par 10 ml d'eau distillée et ajouter 1 ml de FeCl<sub>3</sub> à 10%. Maintenir le tube à essai dans un bain-marie bouillant pendant 30 mn, refroidir et agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase chloroformique dans un tube à essai. Ajouter 1 ml de NH<sub>4</sub>OH dilué et agiter. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de *C*-hétérosides.
  
- ✓ ***Test des glycosides***

A 5g de plante, mise en poudre, on y ajoute 50 ml d'une solution de l'acide tartrique 2 % dans l'éthanol, on chauffe à reflux durant 2 h, après filtration et lavage par l'éthanol, on met le filtrat dans l'eau chaude. Dans un tube à essai, on ajoute à 2 ml du filtrat 2 gouttes de la liqueur de Fehling, on chauffe, la réduction de la liqueur de Fehling montre la présence des glycosides.

✓ *Dosage des mucilages*

Une décoction de la poudre végétale dans l'éthanol 10 %. Au bout de 15 minutes, la solution à analyser est obtenue après filtration. A 1ml de la solution à analyser sont ajoutés 5 ml d'éthanol absolu. L'apparition d'un précipité floconneux indique la présence du mucilage.

**3. Protocole d'extraction des flavonoïdes**

Suivant le protocole d'extraction décrit par Upson et *al.* (2000), le matériel végétal broyé (5 g) est soumis à une extraction par macération dans le mélange éthanol / eau (30/70: v/v) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps. Les macéras sont réunis, puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif.

✓ *Détermination du rendement d'extraction*

Le rendement d'extraction est calculé par la formule donnée par Falleh et *al.* (2008):

$$R (\%) = M_{\text{ext}} / M_{\text{éch.}} * 100$$

Où : R est le rendement en %;  $M_{\text{ext}}$  est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg et  $M_{\text{éch.}}$  est la masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

**4. Etude quantitative**

**4.1. Dosage des polyphénols totaux**

✓ *Principe*

Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est la plus utilisée. Le réactif est formé d'acide phosphotungestique  $H_3PW_{12}O_{40}$  et d'acide phosphomolybdique  $H_3PMO_{12}O_4$ , qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_3$ ), ce qui nous aide à doser les phénols dans le visible à une longueur d'onde de l'ordre 760 nm.

✓ *Procédure expérimentale*

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Makkar et *al.* (2000) avec le réactif de Folin Ciocalteu. 25 µl de chaque solution a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 475 µl d'eau distillée, 250 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau distillée). Après 10 min 1,25 ml de carbonates de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2%) ont été ajoutées, les solutions ainsi obtenues ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 40 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 725 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS contre le blanc de la réaction ne contenant pas de polyphénols.

Toutes les mesures sont répétées 3 fois. La quantité des phénols totaux extraite directement de la courbe d'étalonnage. Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations à partir d'une solution mère (100µg/ml). Le total des composés phénoliques est déterminé selon l'équation suivante:

$$T=C.V/M$$

**T** : Représente le total des composés phénoliques (mg EAT / g d'extrait sec de la plante)

**C** : Concentration d'extrait ethanologique équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml)

**V** : le volume d'extrait ethanologique (ml)

**M** : poids sec d'extrait ethanologique de la plante (g).

#### 4.2. Dosage des flavonoïdes

✓ *Principe*

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits sont de couleur jaune absorbent dans le visible à 415 nm.

✓ *Procédure expérimentale*

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub> (Ayoola et *al.*, 2008).

Des volumes égaux de l'extrait et une solution  $\text{AlCl}_3$  (2%) sont mélangés. Après l'incubation à 30 minutes à la température ambiante, la lecture est effectuée à 420 nm. La quercétine est utilisée comme un standard, la quantité des flavonoïdes est estimée en mg EQ/g d'extrait sec de la plante selon l'équation suivante :

$$X = (A \cdot m_0) / (A_0 \cdot m)$$

**X** : quantité des flavonoïdes (mg EQ quercétine /g d'extrait plante).

**A** : l'absorbance de l'extrait.

**A<sub>0</sub>** : l'absorbance de la solution de quercétine

**m** : masse de l'extrait de plante (mg).

**m<sub>0</sub>** : masse de la quercétine dans la solution

## 5. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de la plante

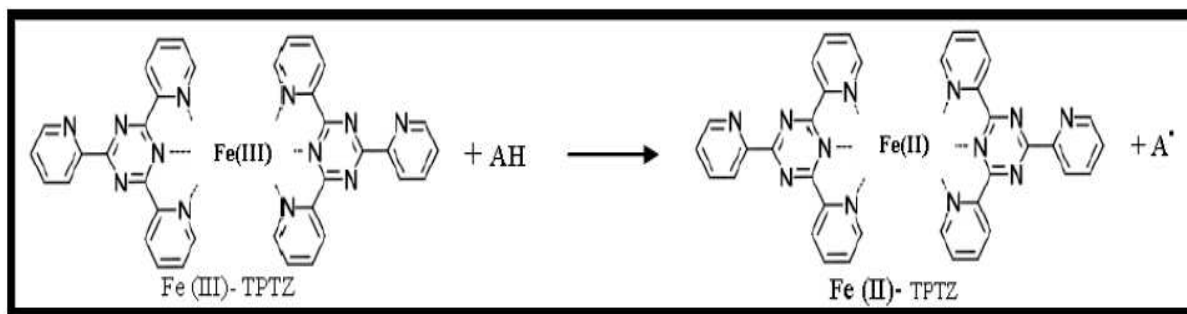
Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits des composés phénoliques a été réalisée par deux techniques chimiques à savoir: la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH.

### 5.1. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

#### ✓ *Principe*

La méthode est basée sur la réaction de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en  $\text{Fe}^{2+}$ , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en couleur bleu vert du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), l'intensité de cette coloration est mesuré par spectrophotométrie à 700 nm.





**Figure 22:** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH)

✓ **Procédure expérimentale**

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique de Yildirim et *al.* (2001). Les différentes concentrations des extraits (0.5 ml) sont mélangées avec 1.25 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 1.25 ml de ferricyanure de potassium [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné pour stopper la réaction. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min.

A la fin, 1.25 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 1.25 ml de l'eau distillée et 250 µl de Fe Cl<sub>3</sub>, 6 H<sub>2</sub>O (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous:

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [1 - \text{Abs échantillon} / \text{Abs control}] \times 100$$

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

La concentration IC<sub>50</sub> qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactive.



Les pourcentages du DPPH● en fonction des concentrations des échantillons, nous permettent d'obtenir la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration DPPH● initiale à 50%. Cette valeur est appelée la concentration efficace EC<sub>50</sub> et parfois notée IC<sub>50</sub>. Elle est exprimée en milligramme d'extrait par rapport au gramme DPPH● dans le milieu réactionnel.

## 6. Test d'activité antibactérienne

D'après la littérature, les composés phénoliques sont doués d'un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Pour mettre en évidence et évaluer cette propriété, on a testé nos extraits des populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* de Biskra et Sétif sur des différentes souches bactériennes pathogènes.

### 6.1. La méthode de diffusion

#### a. Définition de l'antibiogramme

L'antibiogramme est un examen de laboratoire permettant d'apprécier la sensibilité d'une bactérie prélevée chez un malade vis-à-vis de divers antibiotiques (Dabena, 1997). L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé standardisée par (N.C.L.L.S.) (National Committee for Clinical Laboratory Standard) (Celiktas et al., 2007). Cette méthode diffère selon que la bactérie soit exigeante ou non. Dans notre étude les souches bactériennes utilisées sont des bactéries non exigeantes.

#### ✓ Les souches testées

On a choisi de travailler sur 4 espèces pathogènes qui sont: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus megaterium* (ATCC 14581), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) qui ont été fournis par le laboratoire de microbiologie, faculté des sciences, université de Tébessa.

#### ▪ *Staphylococcus epidermidis*

Les staphylocoques sont, en général, petites, blanches ou beiges, et ont un diamètre d'environ 1-2 mm. Ce microorganisme est responsable d'infections cutanées, d'infections nasales comme des sinusites, d'infections urinaires chez la femme et l'homme (Chambers, 1997).

- ***Escherichia coli***

Bacille à Gram négatif, commensal du tube digestif (espèce aérobie dominante). Les colibacilles ne provoquent normalement pas de maladie. Cependant ils possèdent un potentiel pathogène qu'ils expriment dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes): infection urinaire, infection intestinale, infection néonatale (Nataro et Kaper, 1998; Leclerc, 1999; Perry, 2004).

- ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à gram négatif, mobile à ciliature polaire monotriche, caractérisée par la production de deux pigments la pyocyanine (pigment bleu), et la pyoverdine ou fluorescéine (verte), sporule, température optimale: 30 à 43°C, pH optimal 6,5 - 8, aérobie strict, chimioorganotrophe (Avril et *al.*, 1992).

Un certain nombre de bacilles de l'environnement se comportent comme des bactéries opportunistes et sont souvent à l'origine des infections urinaires, bronchiques, cutanées, (impétigo, furoncles), d'infection de la sphère ORL (sinusites, otites...) et d'infection divers. Il s'agit souvent de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques (Avril et *al.*, 1992, Philippon, 1995).

- ***Bacillus megaterium***

*Bacillus megaterium* est une espèce bactérienne Gram positive en forme de bâtonnet, capable de produire des endospores. Cette bactérie peut se trouver sous forme de Streptobacilles. Elle est considérée comme la plus grande bactérie du sol (environ 5 microns) (Patricia et *al.*, 2007).

Selon la santé humaine, *Bacillus megaterium* est considéré comme non pathogène, mais les endospores peuvent contaminer n'importe quoi qui n'est pas maintenu dans un environnement stérile. Elle peut jouer un grand rôle dans tout ce qu'elles contaminent, et ils peuvent être des agents de décomposition non désirée (Slimani et *al.*, 1987).

## **b. Méthode**

### ✓ **Préparation de l'inoculum bactérien**

Chaque souche a été ensemencée en stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies isolées. Après incubation pendant 18 heures à 37 °C, on a choisi 4 à 5 colonies bien isolées avec une anse de platine et les transférer dans un tube de solution d'eau distillée stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de Mc Farland 0,5 (106 UFC/ml) ou à des DO de 0,08 à 0,1 lue à 625nm. L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum (Ericsson et Sherris, 1971).

### ✓ **Préparation du milieu Mueller Hinton (M.H)**

Environ 26 g d'agar nutritif sont pesés puis dissous dans 1L d'eau distillée, la solution obtenue est ensuite stérilisée à l'autoclave. Le milieu est refroidi, ensuite coulé (environ 25 ml du milieu préparé dans chaque boîte de Pétri jusqu'à la solidification), les boîtes sont séchées sous hotte à flux laminaire (flux à air stérile).

### ✓ **Préparation des disques**

Des disques de 6 mm de diamètre préparés en papier wattman n°3. Les disques, une fois préparés, sont placés dans un tube à essai contenant 10ml d'eau distillée et autoclavé 20 min à 120°C (Le Minor et Veron, 1989).

### ✓ **Ensemencement**

- On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- On l'essore en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées, répéter l'opération, deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de pétri, on recharge l'écouvillon à chaque fois.
- On numérote la base de chaque boîte de pétri avec des numérotations convenant au nombre de dilution;

- On place les disques de papier Wattman aseptiquement (avec une pince stérilisée à chaque fois dans le bec bunsen) dans les boîtes de pétri ;
- A l'aide d'une micropipette, on prélève 20µl de chaque dilution de chaque extrait et mettre sur les disques de papier Wattman (Ericsson et Sherris, 1971).
- Le screening antimicrobien a été effectué avec 4 types de concentrations pour chaque extrait (2, 1, 0.5, 0.25 mg/ml) (Pibiri, 2005).
- Des témoins imbibés seulement par le méthanol ont été réalisés et trois boîtes sont utilisées pour chaque souche.

✓ **Pré-incubation**

Les boîtes sont laissées pendant 15 min à température ambiante (sur la paillasse) (Ericsson et Sherris, 1971).

✓ **Incubation**

Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18 heures. Après incubation, la présence autour des disques d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'y a pas de croissance de micro-organismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible.

**c. La lecture**

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

**6. 2. Détermination des CMI (*Concentration Minimale Inhibitrice*)**

✓ **Définition**

On peut définir la CMI par la concentration minimale inhibitrice ou bien la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber dans un milieu (soit milieu liquide, soit milieu solide), toute culture visible de la souche étudiée (Ferron, 1976; Le Minor et Veron, 1989).

✓ **Préparation des dilutions**

La solution mère a été préparée en solubilisant 20mg de chaque extrait de l'espèce *Teucrium polium* L. *Capitatum* dans une solution de 10ml de méthanol dilué à 60%, à partir de la solution mère on réalise une série de dilutions (tableau 4).

**Tableau 4:** Les différentes dilutions de la solution mère (Carbonelle et *al.*, 1987; Courvalin et *al.*, 1988)

| Concentration initiale en µg/ml | Volume en ml | Volume d'eau distillée en ml | Concentration finale en µg/ml |
|---------------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|
| 2000                            | 6.4          | 3.6                          | 1280                          |
| 1280                            | 2            | 2                            | 640                           |
|                                 | 1            | 3                            | 320                           |
|                                 | 0.5          | 3.5                          | 160                           |
|                                 | 0.5          | 7.5                          | 80                            |
| 80                              | 2            | 2                            | 40                            |
|                                 | 1            | 3                            | 20                            |
|                                 | 0.5          | 3.5                          | 10                            |
|                                 | 0.5          | 7.5                          | 5                             |
| 5                               | 2            | 2                            | 2.5                           |
|                                 | 1            | 3                            | 1.25                          |
|                                 | 0.5          | 3.5                          | 0.63                          |
|                                 | 0.5          | 7.5                          | 0.32                          |

✓ **Procédé**

- On prépare une culture en phase exponentielle en milieu liquide de la bactérie à étudier.
- Les suspensions bactériennes de la culture de 18 heures ont été diluées dans 10ml de bouillon M-H.
- On met à l'étuve à 37°C pendant 3 à 5 heures, jusqu'à l'apparition d'une légère opalescence.
- On ajoute 1 ml de ce bouillon à 10 ml de bouillon M-H, préalablement chauffé à 37°C.
- On met 2ml de chaque dilution de la gamme de l'extrait déjà préparé dans une boîte de pétri, en allant de la concentration la plus forte vers la concentration la plus faible.
- On ajoute 18ml de la gélose M-H chauffé à 45°C, bien mélangée aux boîtes de pétri.

- On laisse les boîtes de pétris quelques minutes sur la paillasse pour que la gélose se solidifie.
- On sèche les boîtes pendant 30 minutes à l'étuve à 37°C.
- On ensemence en strie, à l'aide d'une anse de platine ou à la pipette rodée, sur toutes les boîtes contenant l'extrait sans oublier la boîte témoin.
- On incube les boîtes pendant 18 à 37°C (Carbonelle et *al.*, 1987; Courvalin et *al.*, 1988).

#### ✓ Lecture

On lit les concentrations minimales inhibitrices (CMI): concentration pour laquelle il n'y a pas de culture bactérienne visible (Carbonelle et *al.*, 1987; Courvalin et *al.*, 1988).

### 6.3. Détermination des CMB (*Concentration Minimale bactéricide*)

La CMB représente la plus faible concentration du principe actif inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 18 heures d'incubation à 37°C (Mayachiew and Devahastin, 2008).

Les boîtes de Pétri dont les concentrations ayant montré une absence totale de la croissance bactérienne ont été sélectionnées pour déterminer les concentrations minimales bactéricides et bactériostatiques.

Les suspensions bactériennes correspondantes sont inoculées sur gélose pour déterminer l'activité exercée par les extraits sur les souches testées, où leurs croissances correspondant à l'activité bactériostatique, tandis que l'effet bactéricide est révélé par une gélose claire après incubation (Draman, 2010).

## 7. Détermination de l'activité diurétique

### 7.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de la plante *Teucrium polium* L. *Capitatum* de la région de Biskra (Ouled Djellal), qui a été récolté au mois de Juin 2010. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été pulvérisées et pesées (200g).



✓ **Extraction**

Les parties aériennes pulvérisées de *Teucrium polium* L. *Capitatum* sont mises à macérer dans un mélange Et OH / H<sub>2</sub>O (95:5; v/v) pendant 3 x 24h. Les extraits ont été filtrés et concentrés au rotavapeur et conservé à 4<sup>0</sup>c.

**7.2. Animaux et produits chimiques**

- **Animaux** : Pour la détermination de l'activité diurétique des rats albinos (souche Wistar) ont été fournis par l'institut Pasteur d'Alger. Ces rats sont des mâles adultes pesant entre 200-250g, ceux-ci ont été gardés dans les conditions ambiantes du laboratoire: humidité (65 ± 5%), la température (22 ± 5<sup>0</sup>C), et accès libre à l'eau de robinet et nourriture.
- **Produits chimiques** : Furosémide ou diurétique de l'anse (furozal), eau physiologique (saline).

**7.3. Etude de l'activité diurétique**

Les animaux ont été répartis au hasard en lots de quatre rats chacun:

- Un lot témoin recevant par voie orale de l'eau physiologique 25ml/kg servant de contrôle.
- Un lot traité avec du furosémide (20 mg / Kg).
- Un lot expérimental de quatre rats chacun recevant par voie orale l'extrait éthanolique étudié à la dose de 20mg/kg de *T. polium* L. *Capitatum*
- Un lot expérimental de quatre rats chacun recevant par voie orale l'extrait éthanolique étudié à la dose de 50mg/kg de *T. polium* L. *Capitatum*

**n.b.** on a travaillé avec des doses non létales selon Khleifat et al.(2002).

**7.4. Mode opératoire**

Les traitements ont été administrés par voie orale, un jour sur deux, pendant une durée de 30 jours. L'urine a été recueillie après 8 heures du traitement. Les concentrations des ions sodium, potassium et chlore ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre à flamme et l'activité salidiurétique a été exprimée en valeur de Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>.

#### **IV. Etude statistique**

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide d'un programme STATISTICA version 7. Les données ont été traitées par une analyse de variance aux seuils 5 %, 1 % et 1‰ et une comparaison des groupes homogènes selon le test de Newman et Keuls aux seuils 5 % et 1 % et comparaison des moyennes deux à deux. Une ACP (Analyse en Composantes Principales) a été effectuée afin de dégager les groupes homogènes et d'explorer les liaisons entre les variables et les ressemblances entre populations dans les 10 régions.

# **Chapitre 3:**

## **Résultats et discussion**

## **Première partie: Etude morphologique et biochimique de *Teucrium polium* L. ssp. *Capitatum* dans l'Est algérien**

### **I. Etude morphologique**

#### **1. Détermination des types de trichome**

Dans cette étude, dix types de poils ont été observés:

##### **1.1. Poils glandulaires**

Les cinq types de poils sécréteurs capités et peltés observés dans nos échantillons de *Teucrium polium* L. *Capitatum* sont communs à d'autres genres de Lamiacées (Werker et *al.*, 1985a; Werker, 2000).

1- Les poils sécréteurs capités observés appartiennent à trois types:

- Le type I caractérise des poils petits, pourvus d'un court stipe et d'une tête sécrétrice arrondie. On les trouve dans toutes les parties aériennes de la plante adulte, mais ils sont particulièrement nombreux sur la feuille et le calice.
- Le type II caractérise des poils pourvus d'un stipe court et d'une tête sécrétrice arrondie. La partie apicale de la tête est surmontée d'une chambre sous-cuticulaire dans laquelle se dépose les produits lipophiles qui se libère après la rupture de ces glandes. Ces poils sont présents dans toutes les parties de la plante adulte.
- Le type III caractérise des poils fins et allongés, pourvus d'un stipe long et d'une tête sécrétrice arrondie. Ces poils sont particulièrement fréquents sur la corolle.

2 - Les poils peltés observés appartiennent à deux types:

- Le type II caractérise des poils pourvus d'un stipe allongé et d'une tête sécrétrice formée de plusieurs cellules. Ils sont surtout présents et nombreux sur le calice.
- Le type III caractérise des poils pourvus d'un stipe très réduit et d'une tête sécrétrice pluricellulaires, disposées en éventail autour du stipe. Ils possèdent un large espace sous-cuticulaire où se dépose l'huile essentielle. Ils se trouvent partout sur la plante adulte, mais surtout très fréquents sur le calice, la corolle et la face inférieure des feuilles.

## **1.2. Poils non glandulaires**

**A. Trichomes simples et non-ramifiés:** Plusieurs types ont été observés:

1- Poils tecteurs courts et légèrement conique, de 2 (3) cellules à base épaisse, ces trichomes sont composés d'une cellule apicale plus ou moins longue, droite et effilée ou parfois légèrement courbée. Ils sont surtout nombreux sur la corolle et le calice.

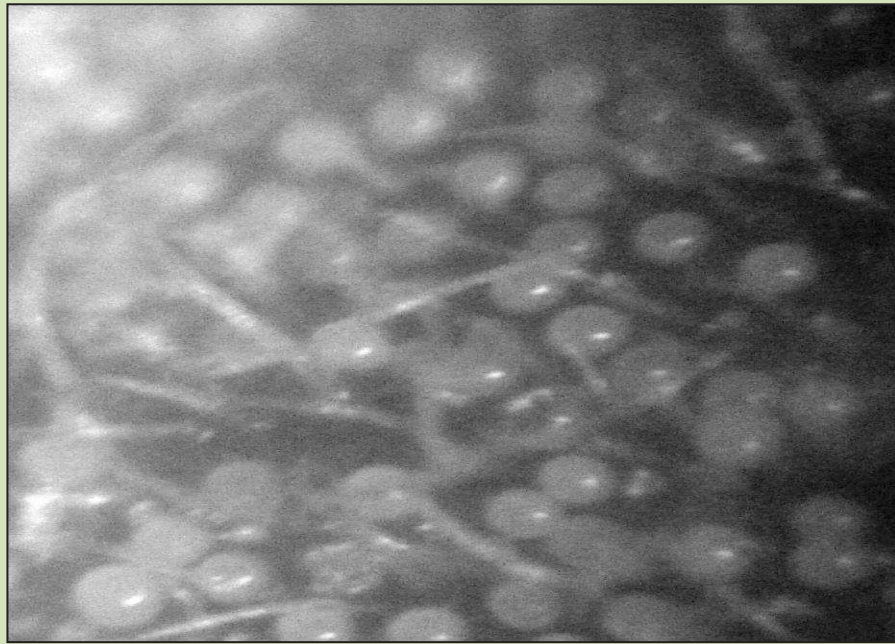
2- Poils tecteurs verrues bicellulaires pliés, à parois épaisse. Ils sont surtout nombreux sur la corolle.

3- Les poils tecteurs de la gorge sont nettement plus gros et plats, le plus souvent pluricellulaires unisériés à base plus élargie et à partie terminale plus étroite, avec des entrenœuds distincts. Ils sont particulièrement fréquents sur le calice et la corolle.

**B. Trichomes embranchés:** deux types ont été observés:

1- Poils tecteurs bifides. On les trouve dans tous les organes étudiés de la plante.

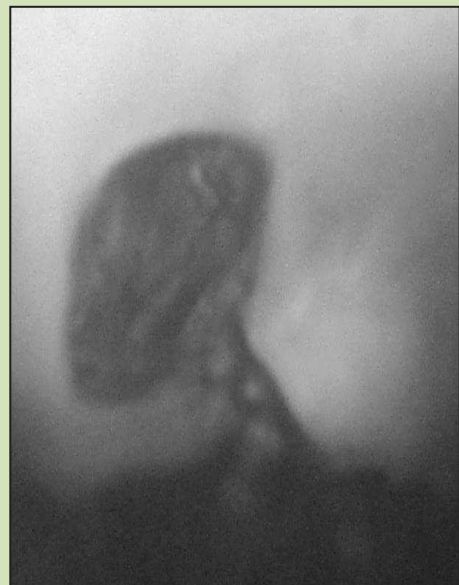
2- Poils tecteurs pluricellulaires, longs et ramifiés à plusieurs niveaux. On les trouve dans tous les organes étudiés de la plante.



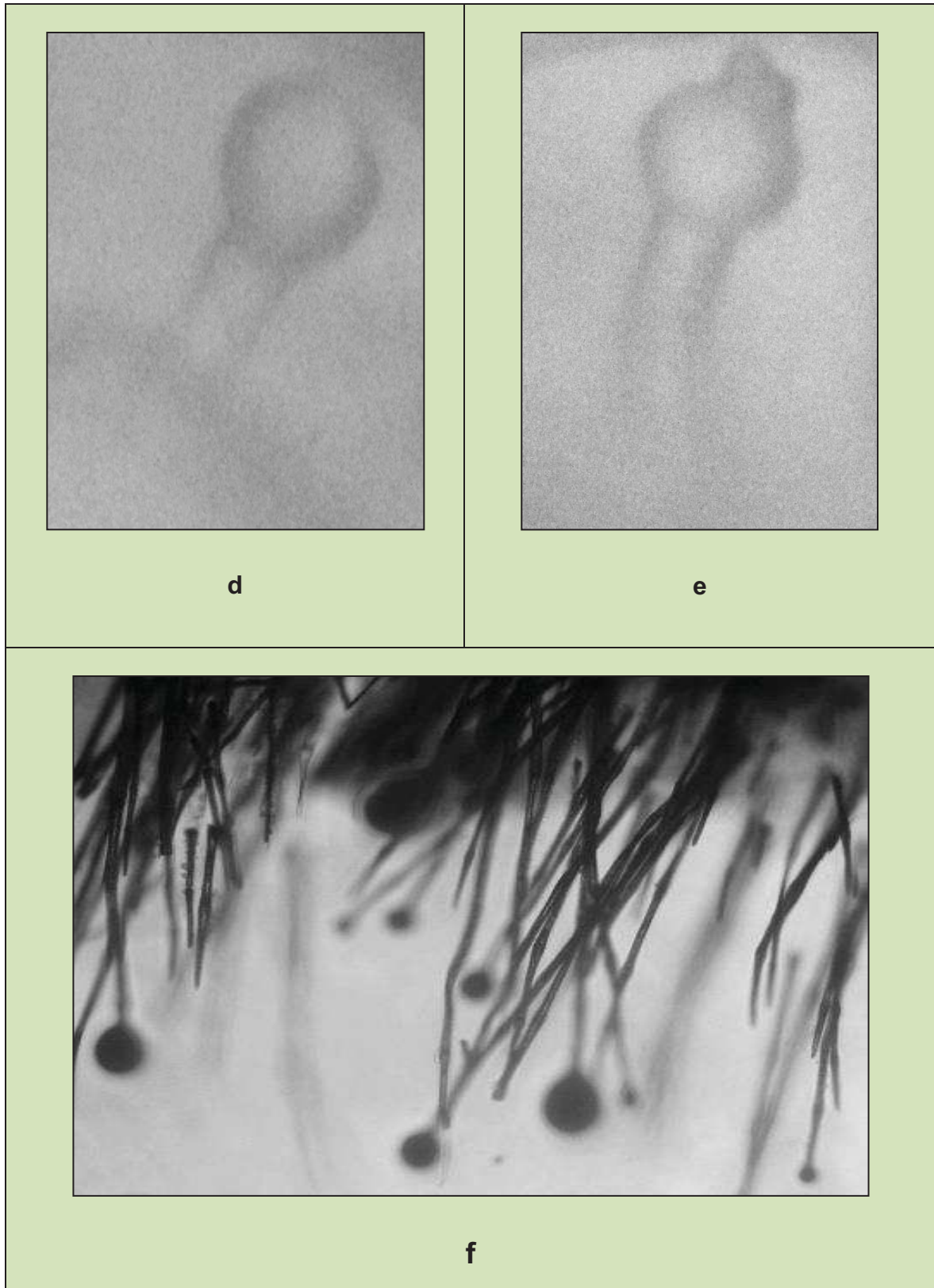
**a**



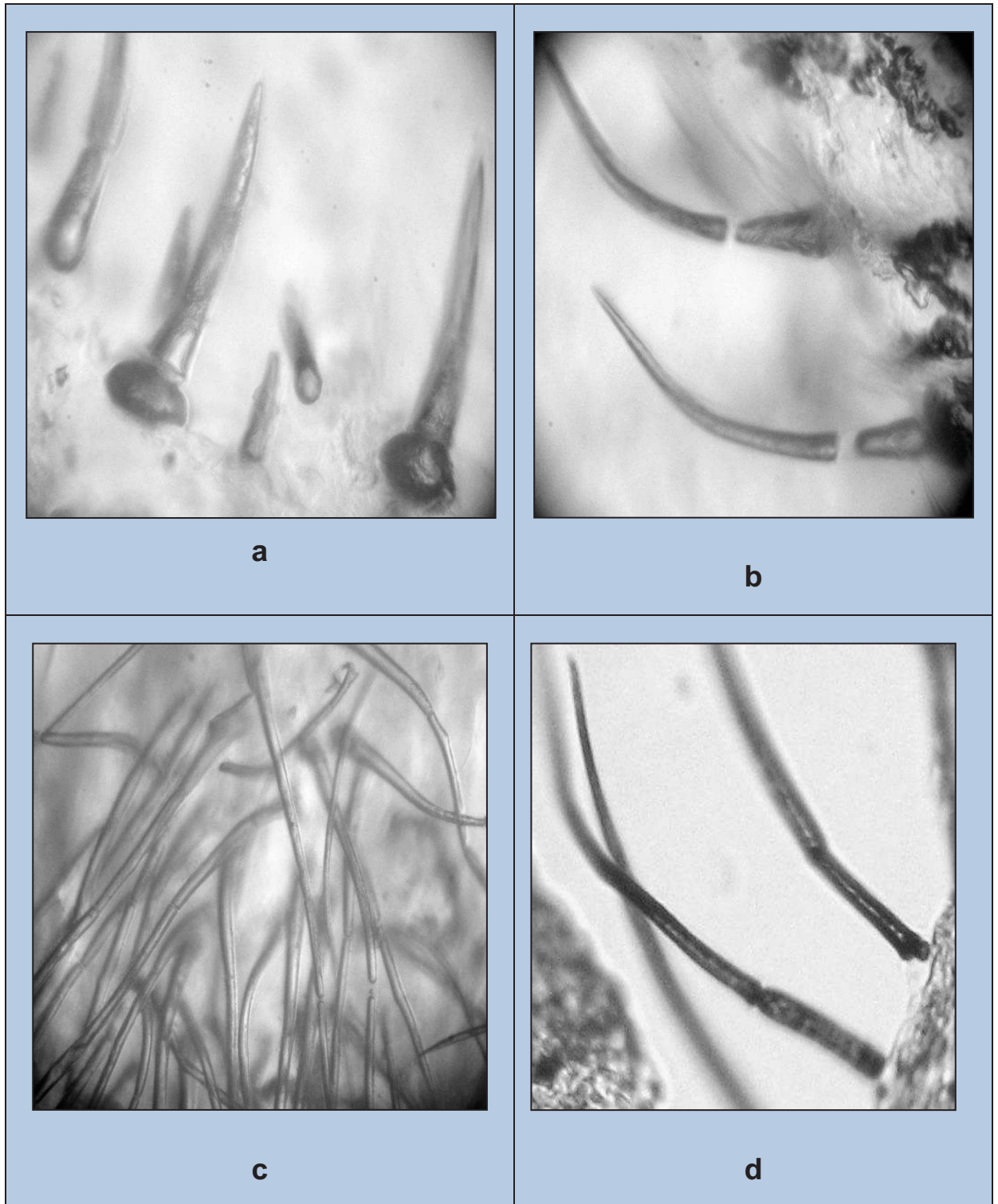
**b**



**c**

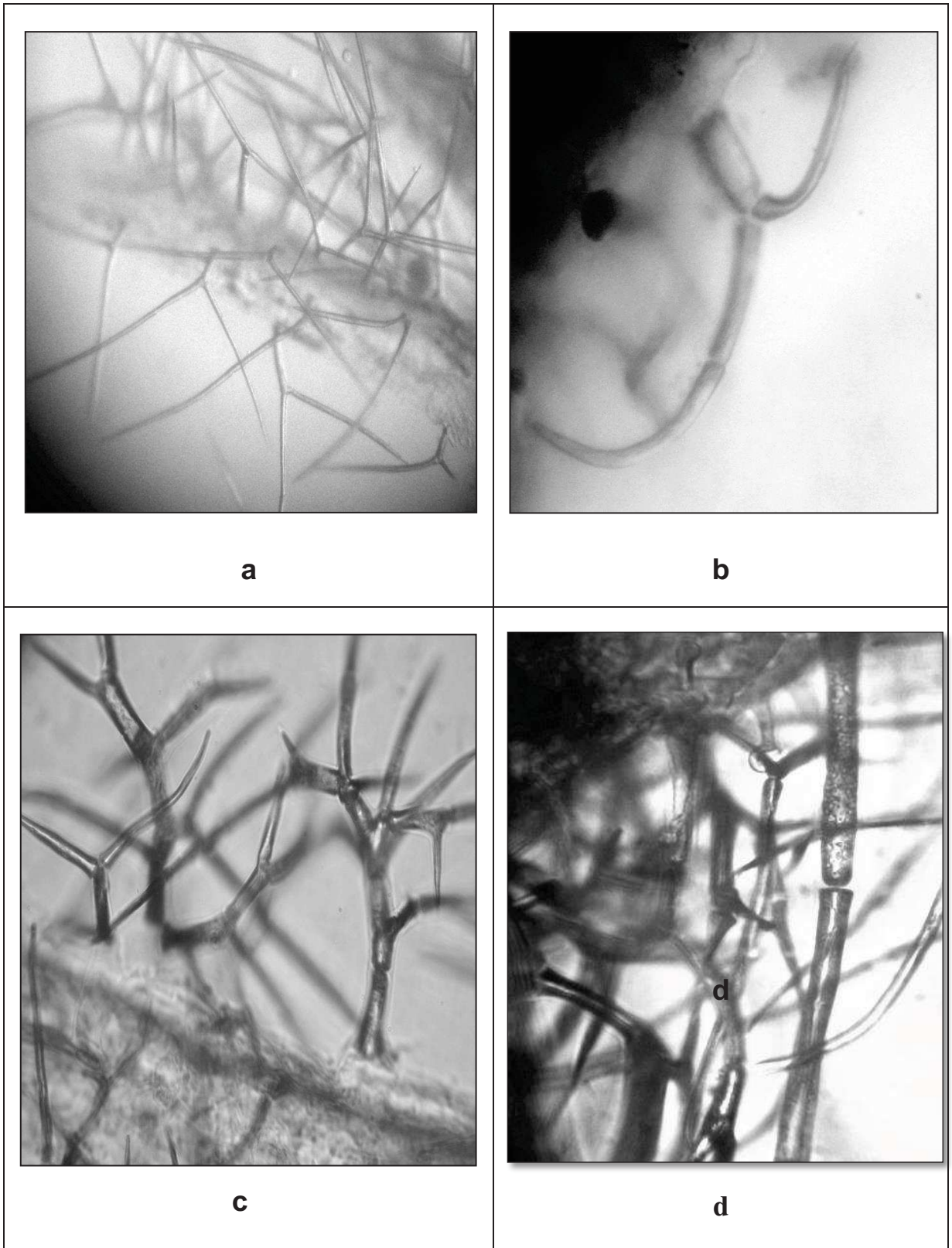


**Planche 2:** Poils glandulaires. a, b et c poils peltés. a et b : poils peltés de type III ( $\times 10$ ,  $\times 40$ ), c : poils peltés de type II ( $\times 40$ ). d, e, f: poils capités. d : poil capité de type I ( $\times 40$ ), e : poil capité de type II ( $\times 40$ ), f : poils capités de type III ( $\times 40$ ).



**Planche 3:** Poils non glandulaires, trichomes simples et non-ramifiés. a : poils tecteurs courts et légèrement coniques ( $\times 100$ ), b : poils tecteurs bicellulaires pliés ( $\times 100$ ), c : poils tecteurs de la gorge ( $\times 40$ ). d : poils tecteurs pluricellulaires ( $\times 100$ ).





**Planche 4:** Poils non glandulaires, trichomes embranchés. a, b : poils tecteurs simples ( $\times 40$ ,  $\times 100$ ), c: poils tecteurs pluricellulaires ( $\times 40$ ), d : trichomes embranchés mélangés avec des poils simples ( $\times 40$ ).

On remarque que les deux types de poils glandulaires capités I et peltés III, ainsi que les trois types aglandulaires (tecteurs de la gorge, embranchés bifides et ramifiés) sont localisés sur tous les organes étudiés de *T. polium* L. *Capitatum*, il est de même pour les deux poils tecteurs courts et bicellulaires pliés, absents chez les feuilles. La partie florale quand à elle est représentée par les deux types glandulaires pelté II et capité II pour le calice et le type capité III spécifiquement pour la corolle (planches 2 et 3).

La présence de différents types de poils avec cinq types au minimum, est notée sur la quasi-totalité de la plante avec un maximum de dix types. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Navarro et El Oualidi (2000), qui ont noté que la section *polium* est la plus hétérogène en ce qui concerne le type et la distribution des trichomes sur les organes de la même espèce.

D'autre part, on a trouvé que les organes étudiés des populations de *T. polium* L. *Capitatum* possèdent deux nouveaux types de trichomes glandulaires non cités dans la littérature (Navarro et El Oualidi, 2000; El Beyrouthy et *al.*, 2013); il s'agit du type pelté II pour le calice et le type capité III pour la corolle. Dans leur étude, Maleci Bini et Giuliani (2006) ont conclu que les types de poils présents chez les Lamiacées sont plus nombreux que ceux cités dans la littérature.

#### ✓ Poils tecteurs

L'étude des dix populations de *T. polium* L. *Capitatum* montre la présence des poils tecteurs simples bi- et pluricellulaires, ainsi que des poils ramifiés quasiment sur tous les organes observés, les feuilles ne portent pas de poils tecteurs simples unicellulaires. Les poils ramifiés sont généralement mélangés avec des poils simples pluricellulaires sur les feuilles et moins fréquemment sur le côté extérieur du calice (planche 4: d).

Les poils tecteurs simples unicellulaire sont universellement présents chez le genre *Teucrium* à l'exception de la section *polium* sous-section *Polium* et la sous-section *Simplicipilosa*, cependant, les poils tecteurs ramifiés sont localisés uniquement dans la sous-section *Polium* (Navarro et El Oualidi, 2000).

Dans une étude récente, Grubestic et *al.* (2007) ont aussi montré que *T. polium* était différencié des autres taxons testés (*T. arduini* L., *T. chamaedrys* L., *T. flavum* L., *T. montanum* L. et *T. scordium* L. subsp. *Scordioides* Schreb.) par la simple présence des poils ramifiés. Nos

résultats corroborent leurs résultats et montrent encore une fois l'importance des poils tecteurs pour la séparation des *Teucrium* en section *polium* sub-section *polium* (Ryding, 1998).

#### ✓ Poils glanduleux

Chez les *Teucrium*, les poils glanduleux peuvent aussi servir à la classification et la séparation entre taxons. Les poils capités de type I et les poils peltés de type III sont abondants chez les populations étudiées; ces résultats vont de paire avec ceux de Grubešić et al. (2007).

Selon Cantino (1990), le type de poils pourrait être un facteur de caractérisation d'un taxon donné, notamment la morphologie des poils glanduleux des corolles et des calices; ceci appuie nos résultats où on a observé trois et quatre types différents de poils respectivement pour les corolles et les calices.

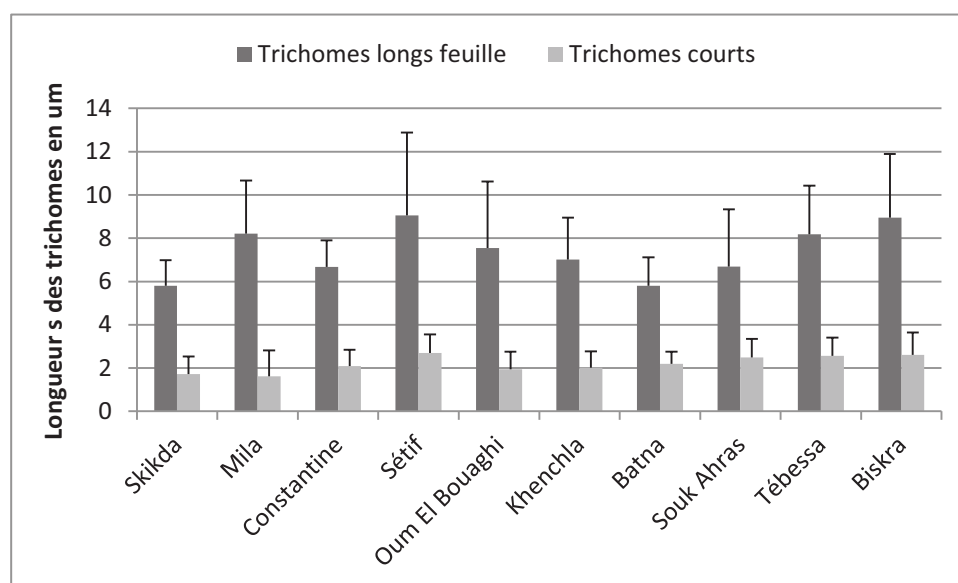
D'après, les travaux de Navarro et El Oualidi (2000), Il s'avère que la distribution des trichomes glanduleux est corrélée avec leur rôle dans la pollinisation, il va donc de même pour nos résultats où le type capité II est localisé uniquement au niveau du calice et de la corolle. La partie apicale de la tête sécrétrice de ces poils est surmontée d'une chambre sous-cuticulaire dans laquelle se dépose les produits lipophiles qui favorisent la pollinisation (Iriti et Colnaghi, 2006).

Tous ces résultats pourraient être renforcés en multipliant les observations et en étalant la saison de récolte. En fait, il est probable que deux poils décrits différemment soient en effet du même type mais à deux stades de développement différents; l'évolution des poils en fonction des stades de développement a été étudiée chez *Origanum dictamnus* L. (Bosabalidis and Tsekos, 1982 a ; b), *Ocimum basilicum* L. (Werker et al., 1993), *Nepeta racemosa* Lam. (Bourett et al., 1994), et *Trichosanthes cucumerina* L. (Adebooye et al., 2012). Certains auteurs ont suggéré que le nombre de poils glanduleux est établi très tôt durant la différenciation des feuilles (Ascensão and Pais, 1987; Valkama et al., 2004), d'autres ont conclu que le nombre de poils augmente avec les stades de développement des feuilles (Maffei et al., 1989; Kofidis and Bosabalidis, 2008). Chez *Ocimum basilicum* (Werker et al., 1993), les poils glanduleux commencent à apparaître très tôt lors du développement et le taux de différenciation est très rapide, variant d'une région à l'autre et selon les régions de nouveaux poils commençant à paraître.

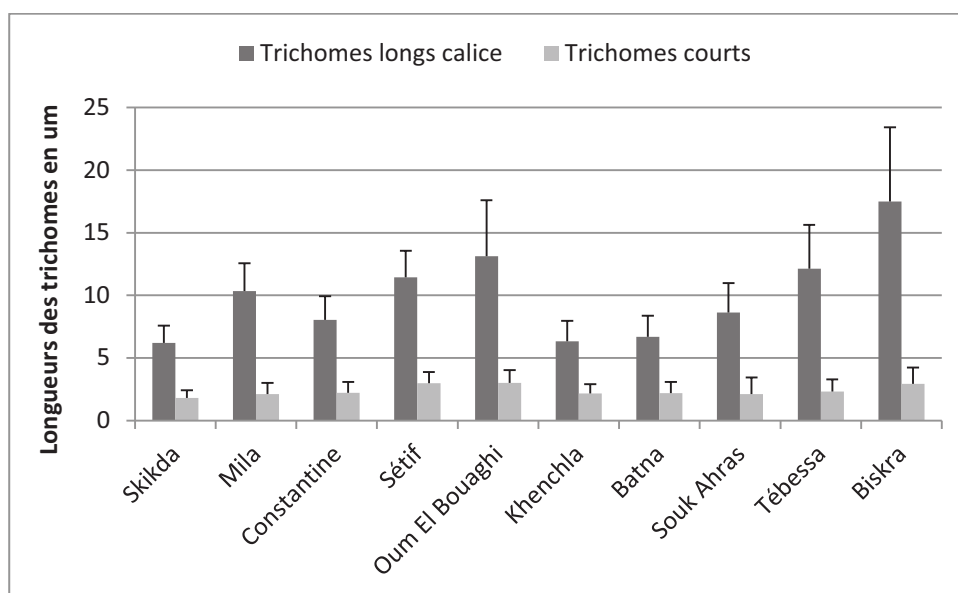
Il existe des poils - glanduleux et tecteurs - qui apparaissent, persistent ou disparaissent à maturité. Les poils tecteurs d'*Artemisia dracunculus* L. et les poils peltés de *Betula pendula* Roth. constituent de bons exemples (Lassányi et Stieber, 1976; Lapinjoki et al., 1991). Des poils tecteurs peuvent rester fonctionnels sur un organe même après sa mort, par exemple sur les feuilles, pour les protéger, et sur les fruits et graines, pour aider à leur dispersion. Dans certains cas, seule une partie des cellules du poil reste vivante comme c'est le cas des poils tecteurs de *Dittrichia viscosa* L. Greuter (Werker et Fahn, 1981).

#### 2. Détermination de la longueur des trichomes

Les dimensions des trichomes longs et courts des feuilles varient de  $5.79 \pm 1.68$  à  $9.04 \pm 12.12$   $\mu\text{m}$  pour les sites de Batna et Sétif respectivement, et de  $1.61 \pm 0.88$  à  $2.60 \pm 1.3$   $\mu\text{m}$  pour les sites de Mila et Sétif respectivement (figure 24). Tandis que les mesures des trichomes longs et courts des calices indiquent des valeurs allant de  $6.19 \pm 1.81$  à  $17.50 \pm 2.94$   $\mu\text{m}$  pour les sites de Skikda et Biskra respectivement, et de  $1.81 \pm 0.81$  à  $2.99 \pm 0.81$   $\mu\text{m}$  pour les sites de Mila et Oum El Bouaghi respectivement (figure 25).



**Figure 24:** Variation de la longueur des trichomes des feuilles chez les 10 populations étudiées



**Figure 25 :** Variation de la longueur des trichomes des calices chez les 10 populations étudiées

L'analyse de variance indique des effets lieux très significatifs pour l'ensemble des caractères analysés, ainsi que pour l'interaction lieu  $\times$  plante pour les mesures des trichomes longs des calices (tableau 5).

La comparaison des moyennes aux seuils 5% et 1% a permis l'émergence de trois groupes homogènes pour la majorité des caractères mesurés; trichomes longs et courts des feuilles et trichomes courts des calices (annexe 4). Cependant, le même test de Newman et Keuls au seuil 1% a révélé la présence de 5 groupes homogènes pour les mesures des trichomes longs des calices et 12 groupes distincts pour l'interaction lieu  $\times$  plante (annexes 4.3 et 4.4).

**Tableau 5:** Carrés moyens de l'analyse de variance de la longueur des trichomes

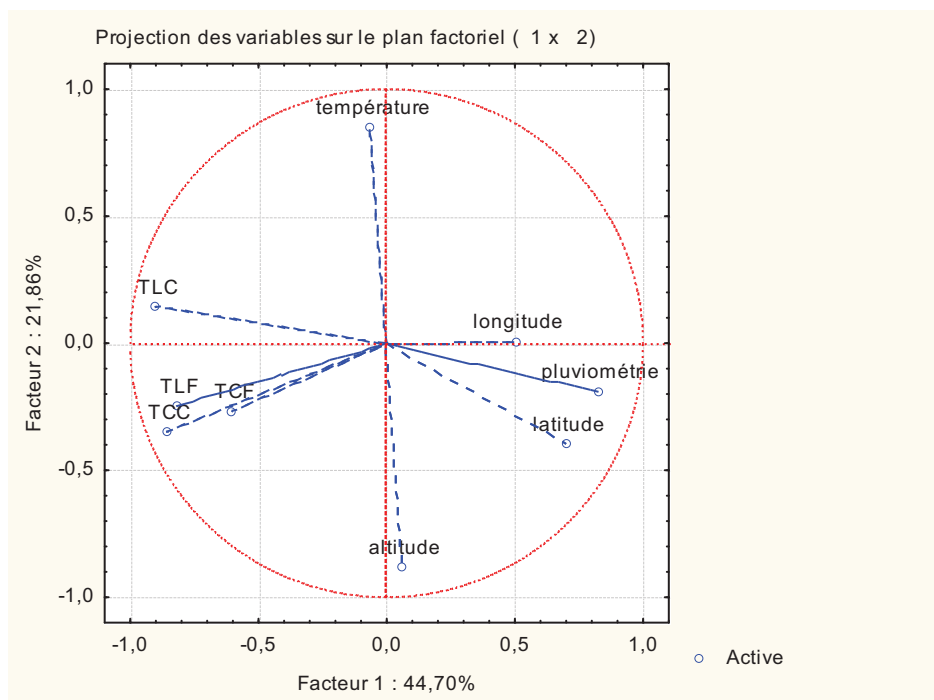
| Source               | Ddl | Feuilles trichomes longs | Feuilles trichomes courts | Calices trichomes longs | Calices trichomes courts |
|----------------------|-----|--------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Total                | 159 | 35,36                    | 4,3                       | 234,39                  | 5,7149                   |
| Lieu                 | 9   | 22,532***                | 2,2929***                 | 208,74***               | 2,8993***                |
| Plante               | 3   | 0,574 ns                 | 0,5837 ns                 | 6,34 ns                 | 0,8417 ns                |
| Lieu $\times$ plante | 27  | 6,398 ns                 | 0,6453 ns                 | 10,08***                | 1,0299 ns                |
| Erreur               | 120 | 5,873                    | 0,7984                    | 9,23                    | 0,9440                   |

ns, \*\*\*: effet non significatif et significatif à 1%o respectivement

### 3. Analyse en composantes principales

#### 3.1. Cercle des corrélations

Le plan (1-2) (figure 26) dont la participation des axes orthogonaux est de 66.6 % fait ressortir la quasi-totalité des variables: trichomes longs et courts des feuilles et des calices, altitude, pluviométrie et température. Il fait apparaître la convergence et la divergence de certaines variables les unes par rapport aux autres.



**Figure 26:** Cercle des corrélations

#### Abréviations:

TLF: trichomes longs des feuilles, TCF: trichomes courts des feuilles, TLC: trichomes longs des calices, TCC: trichomes courts des calices.

Par ailleurs, il fait apparaître la bonne corrélation positive entre: latitude / pluviométrie, trichomes longs des feuilles / trichomes longs des calices, trichomes longs des feuilles / trichomes courts des calices d'une part et entre trichomes longs des calices/ trichomes courts des calices. D'autre part une nette opposition entre: latitude / trichomes longs des calices, pluviométrie / trichomes longs des calices, pluviométrie / trichomes courts des calices, pluviométrie / trichomes longs des feuilles, pluviométrie/altitude, résultats qui trouvent leur confirmation dans la matrice des corrélations (tableau 6) qui illustre les relations entre variables.

### *Chapitre 3 : Résultats et discussion*

**Tableau 6:** Matrice des coefficients de corrélation des différentes variables analysées

|              | Latitude | Longitude | Altitude | Pluviométrie | Température | TLF    | TCF  | TLC    | TCC  |
|--------------|----------|-----------|----------|--------------|-------------|--------|------|--------|------|
| Latitude     | 1,00     |           |          |              |             |        |      |        |      |
| Longitude    | 0,11     | 1,00      |          |              |             |        |      |        |      |
| Altitude     | 0,31     | 0,09      | 1,00     |              |             |        |      |        |      |
| Pluviométrie | 0,72**   | 0,57      | 0,20     | 1,00         |             |        |      |        |      |
| Température  | -0,26    | 0,02      | -0,59    | -0,05        | 1,00        |        |      |        |      |
| TLF          | -0,33    | -0,30     | 0,07     | -0,54        | -0,17       | 1,00   |      |        |      |
| TCF          | -0,39    | -0,13     | 0,10     | -0,28        | -0,16       | 0,47   | 1,00 |        |      |
| TLC          | -0,58    | -0,29     | -0,14    | -0,60        | 0,32        | 0,81** | 0,47 | 1,00   |      |
| TCC          | -0,43    | -0,42     | 0,34     | -0,58        | -0,13       | 0,72** | 0,51 | 0,79** | 1,00 |

Ce sont surtout les trichomes longs et courts des calices, les trichomes longs feuilles, la pluviométrie et latitude qui contribuent à la formation de l'axe 1, donc, à la variation totale. Le pourcentage d'explication est de l'ordre de 44.70 %. Ces variables sont corrélées entre elles et exercent le même effet. Les paramètres altitude et température participent davantage à la formation de l'axe 2 et qui explique seulement (21.86 %) de la variation totale.

De même, pour ce qui est de la qualité de la représentation, toutes les variables sont très bien représentées, surtout en tenant compte des corrélations au carré, les trichomes longs et courts des calices, trichomes longs des feuilles, l'altitude, la température et la pluviométrie semblent très bien représentées ( $r^2 > 0.80$ ), à l'exception de latitude et des trichomes courts des feuilles qui sont bien représentés ( $0.60 < r^2 < 0.80$ ) (tableau 7).

**Tableau 7:** Etude des variations des différentes variables analysées par l'ACP

| variables                     | Facteur 1 | Facteur 2 |
|-------------------------------|-----------|-----------|
| Latitude                      | 0,70      | -0,39     |
| Longitude                     | 0,50      | 0,00      |
| Altitude                      | 0,06      | -0,88     |
| Pluviométrie                  | 0,82      | -0,18     |
| Température                   | -0,06     | 0,85      |
| Trichomes longs des feuilles  | -0,82     | -0,24     |
| Trichomes courts des feuilles | -0,60     | -0,26     |
| Trichomes longs des calices   | -0,90     | 0,14      |
| Trichomes courts des calices  | -0,86     | -0,34     |

### 3.2. Diagramme des individus

Presque la quasi-totalité des individus ont contribué à la formation de l'axe (1), les individus qui ont participé à la formation de l'axe 1 dans le côté positif caractérisent les sites du groupe 1 (G1) (Skikda, Constantine, Mila, Khenchla, Batna, Souk Ahras) ayant des valeurs des trichomes courts et longs des feuilles et des calices plus faibles, proviennent des régions de fortes longitude et latitude et des taux de pluviométrie très élevées (figure 27).

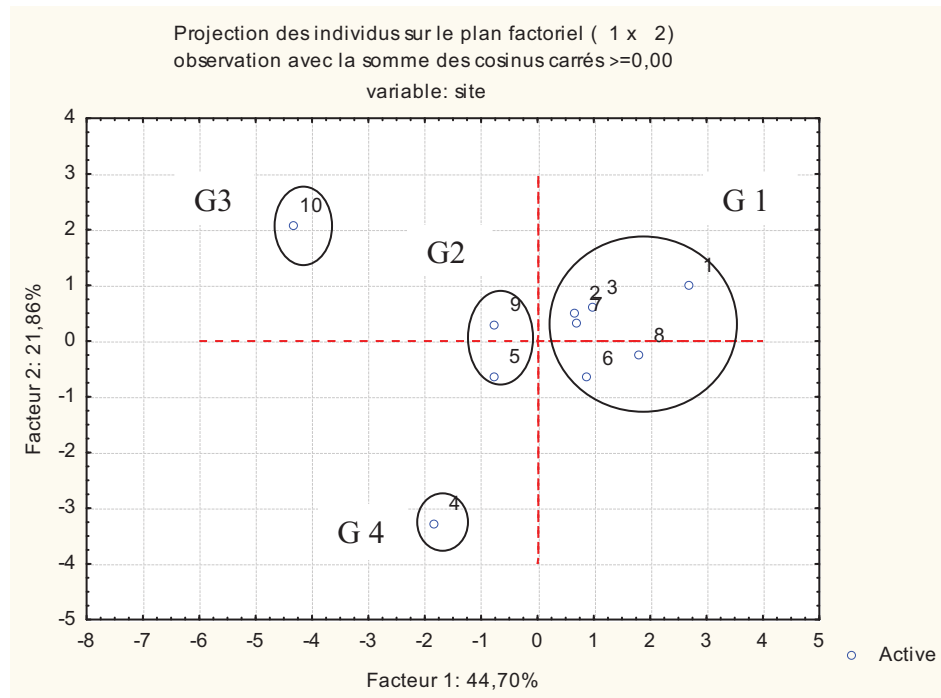
Le groupe 2 (G2) constitué des populations des sites d'Oum El Bouaghi et Tébessa. En effet, ces aires ont enregistré des longueurs des trichomes moyennes, avec des faibles taux de pluviométrie.

Quant au groupe 3, (G3) (Biskra) s'isole pour être caractérisé par des longueurs des trichomes foliaires longs et courts élevées et des valeurs de température plus élevées que ceux enregistrés par les autres sites.

Quant à l'axe 2, c'est surtout le groupe 4 qui a contribué à sa formation.

Le groupe 4, (G4) s'individualise pour regrouper les plantes originaires de la région de forte altitude; Sétif qui se caractérisent nettement par des longueurs des trichomes du calice longs et courts élevées.





**Figure 27:** Diagramme des individus

(1: Skikda , 2: Constantine , 3: Mila, 4: Sétif, 5: Oum El Bouaghi, 6: Khenchla , 7: Batna, 8: Souk Ahras, 9: Tébessa, 10: Biskra).

Les résultats de l'ACP corroborent en grande partie ceux de l'analyse de la variance.

- Sur l'axe1, dans le côté positif, apparaissent les populations des régions Skikda, Constantine, Mila, Khenchla, Batna, Souk Ahras qui se sont distinguées nettement par l'effet conjugué de la pluie avec la réduction de la longueurs des différents types des trichomes chez les plantes.

- Sur l'axe 2, les populations se sont distinguées en fonction des paramètres d'altitude et température. En effet, les trichomes des longueurs importants chez les populations des régions de Sétif et Biskra.

A priori, la variabilité constatée à travers cette étude serait liée à un certain nombre de facteurs du milieu d'origine des populations. La nature de l'évolution du matériel végétal considéré dépendrait, selon les cas, de l'altitude, la longitude, la pluviométrie ou enfin de la latitude des régions de provenances des populations étudiées. Ainsi, les populations ayant présenté un bon développement final en trichome semblent provenir des régions des hauts plateaux et de climat aride. Donc, la diversité des milieux favorise l'isolement et la spéciation

des taxons dont la plupart sont dans les montagnes et les régions désertiques (Tanaka-Oda et al., 2010).

Le climat peut avoir aussi un effet sur la morphologie et le nombre du trichome. En fait chez *Origanum vulgare* L. (Lamiacées), Bosabalidis et Tsekos (1982 a, b) ont constaté que le nombre de poils glanduleux diminue chez les espèces soumises à climat continental. Malec Bini and Servettaz (1991) ont également attribué la présence d'un grand nombre de poils dans *Teucrium marum* L. et *Teucrium* de Pourr. ex Willd. À des conditions d'environnement spécifique tel que l'exposition au vent. Kofidis et al. (2003) ont montré que les poils tecteurs chez *Origanum vulgare* L. augmentent en nombre avec l'altitude, alors que les poils glanduleux diminuent. Gonzales et al. (2008) ont mentionné que la sécheresse induit l'augmentation de la densité des trichomes chez *Madia sativa* Molina (Asteracées). De même, la population de *Nepeta nuda* L. (Lamiacées), poussant à 950 m d'altitude, présente une densité foliaire de poils peltés nettement plus élevée au début d'été que celle qui habite à des altitudes plus élevées (1480 m- 1760 m), et l'inverse a été observé plus tard à la fin d'été (Kofidis and Bosabalidis, 2008). Par contre, Huttunen et al. (2010), ont trouvé que la production de trichomes chez *Arabidopsis lyrata* (Brassicées) n'est pas induite par la défoliation ou la sécheresse.

#### 4. Description des grains de pollens

Après extraction des grains de pollen, une description de ces derniers est faite d'après leur tube pollinique, exine et longueur des sillons polaire et équatorial (tableau 8).

**Tableau 8:** Description des grains de pollen de *Teucrium polium* L. *Capitatum*

| Type pollinique | Exine | Sillons polaire et équatorial        | Forme    |
|-----------------|-------|--------------------------------------|----------|
| Tricolpé        | Lisse | PP'=26.05 ± 0.5µm<br>EE'=22.53 ± 0µm | Longiaxe |

Les grains de pollen de *T. polium* L. *Capitatum* ont une symétrie radiale, avec une taille de 586.90 µm<sup>2</sup> (axe polaire × axe équatorial). Le ratio P/E est égal à 1.15 (forme allongée). Le contour est elliptique en vue équatoriale et circulaire en vue méridienne (figure 28).

Une très grande similitude est remarquée au niveau de la taille et la morphologie des grains de pollen des différents sites étudiés. De même, d'autres études ont trouvé des résultats identiques (Dinc et al., 2008; Dinc et al., 2011).



**Figure 28:** Les grains de pollen de *Teucrium polium* L. *Capitatum* (x40, x100 respectivement) **A:** la forme longiaxe, **B:** le type pollinique tricolpé

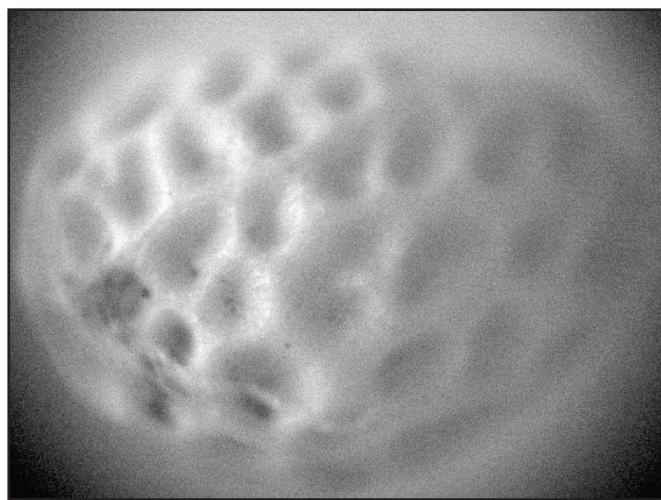
#### 5. La morphologie des noix

Les akènes du *T. polium* L. *Capitatum* sont ellipsoïdes, oblongues à oblongues-ovoïdes, avec 2 mm de longueur et de 1.5 mm de large, avec une sculpture primaire distincte (tableau 9).

**Tableau 9:** Caractères morphologiques des noix et leurs induments

| Taxon                     | Longueur × Largeur (mm) | Forme des noix  | Poils des noix |
|---------------------------|-------------------------|---|----------------|
| <i>Teucrium polium</i> L. | 2,0 × 1,5               | Elliptique-ovale,   | Glabre         |
| <i>Capitatum</i>          |                         | polygonale, alvéoles profonds, sub-régulière, parois très épaisse |                |

La forme des akènes est généralement similaire chez toutes les populations étudiées (figure 29).



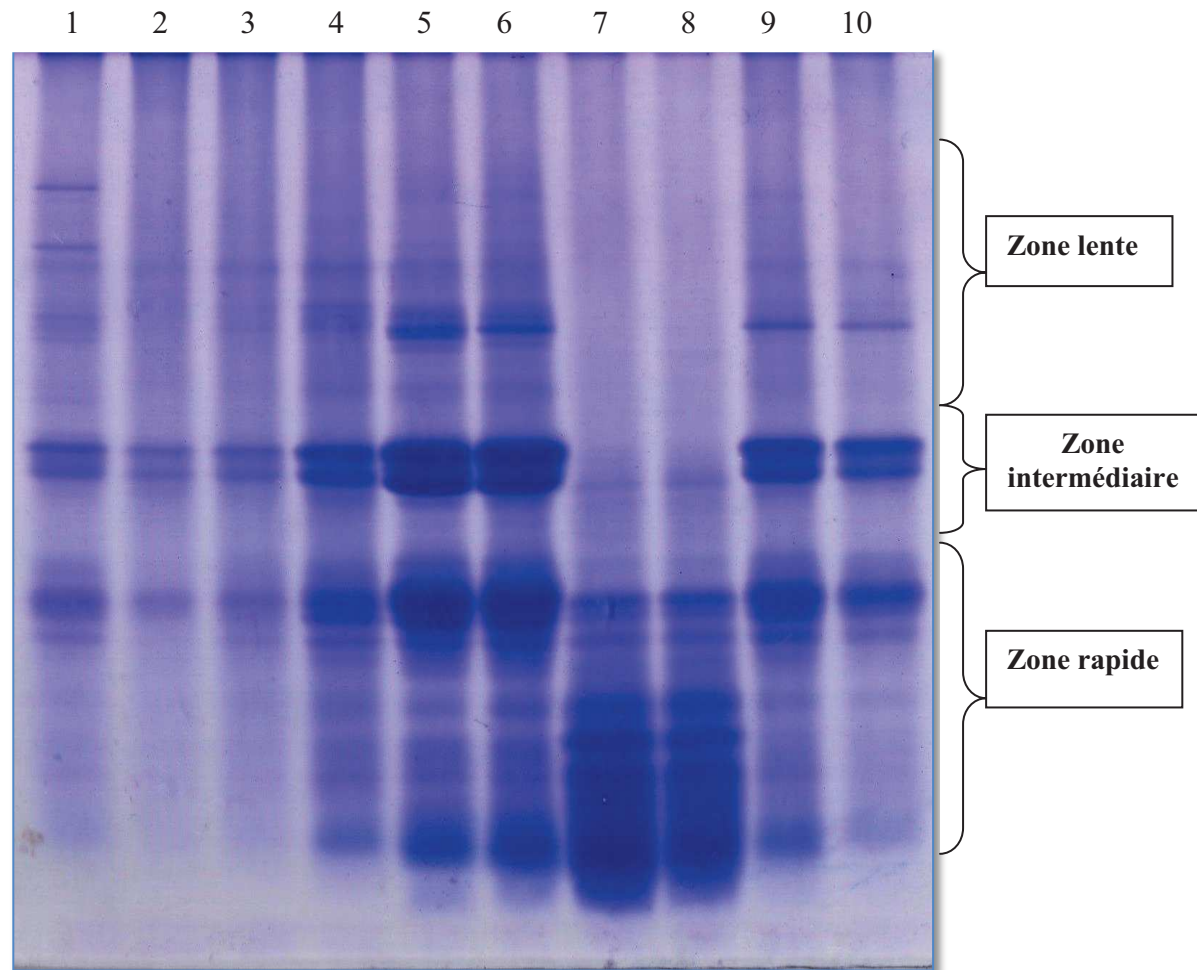
**Figure 29:** Akène de *Teucrium polium* L. *Capitatum* (x5)

Les espèces étudiées ont des akènes sans poils ni glandes. Martin et *al.* (1994) ont suggéré que l'ornementation en surface des akènes (la présence ou l'absence de trichomes et des glandes) apparaît comme un caractère stable, qui peut être utilisé avec succès dans la classification infragénérique. Il est à noter que la relation systématique entre les sections *Chamaedrys* et *Teucrium* a été établie par Martin et *al.* (1994) en se basant sur la présence des akènes poilus.

D'autre part, Chez *Pétunia*, le facteur de transcription bHLH, AN1 intervient non seulement dans la biosynthèse des anthocyanes mais également dans la régulation du pH vacuolaire et la différenciation des cellules épidermiques de la graine (Spelt et *al.*, 2002; Heim et *al.*, 2003). De même, le facteur de régulation de la biosynthèse des proanthocyanidines; TT2, est impliqué dans la différenciation des trichomes (Lepiniec et *al.*, 2006). Actuellement, il est évident que la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes fait partie d'un réseau de régulation des phénomènes physiologiques impliqués dans le développement des trichomes.

## 2. Etude du polymorphisme des protéines de réserve

Les analyses électrophorétiques des populations étudiées par SDS-page ont permis d'établir les diagrammes types de chaque population et de comparer leurs profils protéiques (figure30).



**Figure 30:** Electrophorogrammes des différentes populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* collectées en Algérie : 1. Biskra, 2. Batna, 3. Tébessa, 4. Souk Ahras, 5. Khenshla, 6. Oum El Bouaghi, 7. Sétif, 8. Mila, 9. Constantine, 10. Skikda

Le diagramme consiste à présenter les résultats fondés sur des caractères qualitatifs (absence ou présence d'un allèle ou d'une bande) en utilisant des données binaires (0 pour absence, 1 pour présence). L'ensemble des composants des diagrammes se situe alors dans une zone de mobilité comprise entre 19 et 79% (tableau 10).

### *Chapitre 3 : Résultats et discussion*

**Tableau 10:** Diagrammes types des populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum*

(1. Biskra, 2. Batna, 3. Tébessa, 4. Souk Ahras, 5. Khenshla, 6. Oum El Bouaghi, 7. Sétif, 8. Mila, 9. Constantine, 10. Skikda)

| <b>Bandes</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>Fréquence %</b> |
|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|--------------------|
| 16.34         | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 100                |
| 23.07         | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 100                |
| 25            | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 100                |
| 26.92         | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 100                |
| 27.88         | 0        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 0        | 0        | 0        | 0         | 50                 |
| 29.8          | 0        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 0        | 0        | 1         | 70                 |
| 30.76         | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 0        | 1         | 90                 |
| 33.65         | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 100                |
| 34.61         | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 100                |
| 39.42         | 1        | 0        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 90                 |
| 41.34         | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 1        | 0        | 0        | 0        | 0         | 20                 |
| 50            | 0        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 90                 |
| 53.84         | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 100                |
| 55.76         | 1        | 1        | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 80                 |
| 64.42         | 0        | 1        | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        | 0        | 0        | 1         | 50                 |
| 67.3          | 0        | 1        | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 70                 |
| 69.23         | 0        | 1        | 0        | 0        | 1        | 1        | 0        | 0        | 0        | 1         | 40                 |
| 71.15         | 1        | 1        | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        | 1        | 0        | 1         | 70                 |
| 73.07         | 0        | 1        | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        | 1        | 0        | 1         | 60                 |
| 76.92         | 1        | 1        | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        | 1        | 0        | 1         | 70                 |
| 80.76         | 1        | 1        | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1         | 80                 |
| 83.65         | 0        | 1        | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        | 0        | 0        | 1         | 50                 |
| 85.57         | 0        | 1        | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        | 0        | 0        | 1         | 50                 |

Les diagrammes électrophorétiques des 10 populations analysées renferment de 12 à 23 bandes décelables qui se répartissent entre les trois zones, chacune des populations présente un profil unique qui lui est propre et qui peut ressembler ou pas à une autre population par la présence ou l'absence d'une ou de plusieurs bandes. On constate aussi que les diagrammes des protéines totales présentent de nettes différences à la fois qualitatives et quantitatives.

Cette méthode permet d'obtenir l'ensemble des protéines; on distingue trois groupes de bandes avec des mobilités différentes :

- Groupe des bandes lentes : comprend des protéines possédant une mobilité de l'ordre de 60 à 79%. On note la présence de 9 bandes, avec de faibles intensités.
- Groupe des bandes intermédiaires: comprend des protéines possédant une mobilité qui varie entre 50 à 59%, ces protéines sont les mieux séparées, les bandes peuvent être distinguées sans ambiguïté, leurs nombres est de 4 et leurs intensités varient de moyennement à très concentrée.
- Groupe des bandes rapides: présente une mobilité entre de 19 à 41.5% et on compte 10 bandes. Leurs intensités varient entre très concentrée et peu concentrée.

Un tel ensemble de résultats peut être alors exploité en estimant le degré de différence (ou d'analogie) entre les diagrammes des populations considérés deux à deux.

#### 2.1. Indices de similarité

L'indice de similarité (ou indice de ressemblance) a été calculé pour les 10 populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* selon la méthode de Dedio et *al.* (1969), en rapportant l'indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des bandes présentes dans l'un, au moins, des diagrammes des populations comparées.

L'IAS présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes entre les deux diagrammes. On considère qu'une bande n'est pas significativement différente d'une autre lorsqu'elles sont de même mobilité et / ou qu'elles ne se distinguent pas par au moins deux classes de concentration.

$$\text{IRS} = \text{IAS} / \text{N} \times 100$$

La matrice des IRS (tableau 11) a montré que la collection de *Teucrium polium* L. *Capitatum* étudiée présente de moyenne ressemblance entre les populations. L'IRS est considéré comme significativement élevé de 85 à 100%. Il est considéré comme significativement faible de 0 à 10% (Dedio et *al.*, 1969).

### Chapitre 3 : Résultats et discussion

**Tableau 11:** Indices de similarité des populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* selon les diagrammes électrophorétiques

| Skikda | Constantine | Mila  | Sétif | Oum El Bouaghi | Khenshla | Souk Ahras | Tébessa | Batna | Biskra |                |
|--------|-------------|-------|-------|----------------|----------|------------|---------|-------|--------|----------------|
| 100    | 54.54       | 56.25 | 56.25 | 56.52          | 56.52    | 68.42      | 81.25   | 66.66 | 61.9   | Skikda         |
|        | 100         | 50    | 50    | 91.3           | 91.3     | 81.81      | 68.18   | 52.38 | 61.9   | Constantine    |
|        |             | 100   | 100   | 52.17          | 52.17    | 55         | 55.55   | 69.23 | 50     | Mila           |
|        |             |       | 100   | 52.17          | 52.17    | 55         | 55.55   | 60    | 50     | Sétif          |
|        |             |       |       | 100            | 100      | 82.6       | 69.56   | 52.17 | 91.3   | Oum El Bouaghi |
|        |             |       |       |                | 100      | 82.6       | 73.91   | 52.17 | 91.3   | Khenshla       |
|        |             |       |       |                |          | 100        | 84.21   | 63.15 | 90.47  | Souk Ahras     |
|        |             |       |       |                |          |            | 100     | 75    | 76.19  | Tébessa        |
|        |             |       |       |                |          |            |         | 100   | 57.14  | Batna          |
|        |             |       |       |                |          |            |         |       | 100    | Biskra         |

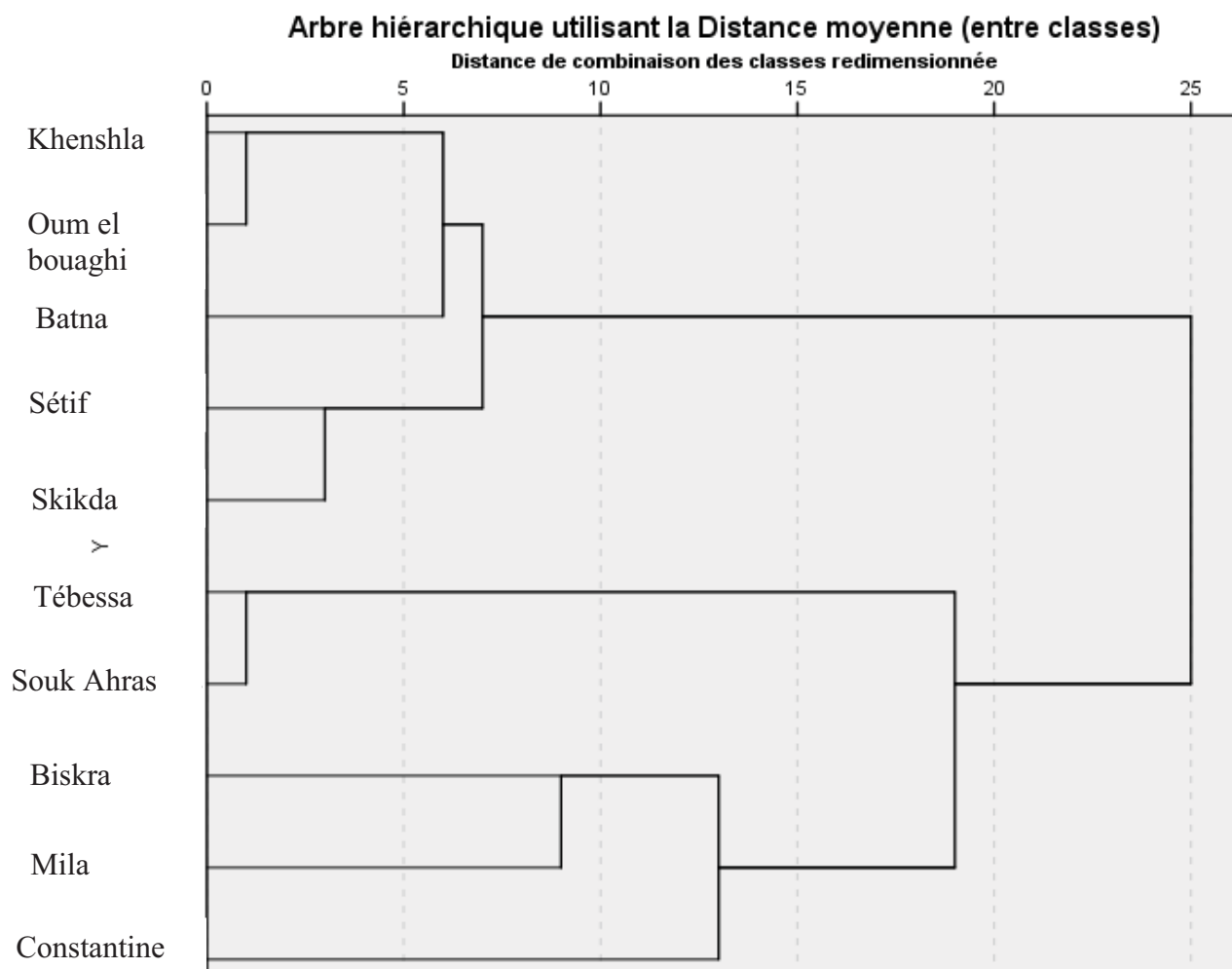
Subséquentement, les valeurs des indices de similarité des populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* montrent que :

- Les valeurs de l'IRS varient entre 50 et 100%.
- Quelques populations ont des indices de 100%, ces populations sont d'Oum El Bouaghi – Khenshla, Mila – Sétif. Ce qui représente une grande similitude entre les populations.
- Des valeurs d'IRS élevées de 90.47 à 91.3%, ont été trouvées pour quelques populations. C'est le cas de Souk Ahras – Biskra, Oum El Bouaghi – Biskra, Khenshla – Biskra, Constantine - Oum El Bouaghi, Constantine – Khenshla.
- Des valeurs moyennes de l'indice de similarité (50- 66.66%) ont été trouvées entre l'ensemble des populations: Constantine – Mila, Sétif – Constantine, Mila – Biskra, Sétif – Biskra, Mila – Khenshla, Mila – Oum El Bouaghi, Sétif – Khenshla, Sétif – Oum El Bouaghi, Batna – Khenshla, Batna – Oum El Bouaghi, Batna – Constantine, Skikda – Constantine, Souk Ahras – Mila, Souk Ahras – Sétif, Tébéssa – Mila, Tébéssa – Sétif, Skikda – Mila, Skikda – Sétif, Skikda – Oum El Bouaghi, Skikda – Khenshla, Batna – Biskra, Batna – Sétif, Souk Ahras – Batna, Skikda – Batna.



Les résultats obtenus par le calcul de l'IRS montrent que l'hétérogénéité électrophorétique des protéines totales peut être considérée comme un marqueur génétique car elle exprime d'une manière directe le degré de parenté entre les populations.

#### 2.2. Classification hiérarchique des populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum*



**Figure 31:** Classification hiérarchique des populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum*

Les relations entre les populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* sont établies à partir de leurs ressemblances génétiques. Pour cela, on a fait appel à une représentation sous forme d'arbre hiérarchique ou dendrogramme qui contribue sans doute la représentation la plus connue.

Les dendrogrammes dans notre cas tiennent compte de la diversité des protéines de réserve par la technique de l'électrophorèse SDS page. La distance entre populations (indice qui mesure combien deux populations différent) est la conséquence de la contribution des bandes

protéiques (par présence ou absence) à la formation de chacun des nœuds. Ces nœuds indiquent donc le degré de ressemblance et facilitent la classification hiérarchique des populations selon leur constitution génétique.

La figure 31, montre que les 10 populations sont classées en deux groupes distincts. Chaque groupe est formé d'individus très proches génétiquement.

Le premier groupe est constitué de cinq populations. A l'intérieur de ce groupe, on constate que les populations semblables forment trois clades avec la même distance génétique ( $d= 5$ ); le premier clade est composé de 2 populations très proches génétiquement (Oum El Bouaghi et Khenshla). La population de Batna forme un deuxième cluster de ce groupe, qui est éloignées génétiquement des populations précédentes. Les populations de Sétif et Skikda forment un troisième cluster de ce groupe.

Le deuxième groupe apparait au-dessous du premier, il est constitué lui aussi de cinq populations. A une distance 10, trois niveaux de ressemblances ont été construites, dont le premier est représenté par deux populations très semblables (Souk Ahras et Tébessa). Le deuxième cluster est constitué les populations Mila et Biskra. La population de Constantine forme un troisième cluster de ce groupe, qui est éloigné génétiquement des populations précédentes.

La connaissance des caractères biochimiques est l'un des moyens les plus utilisés pour l'évaluation des ressources phylogénétiques. Les sous unités protéiques révélées par cette technique constituent des empreintes génétiques permettant de distinguer entre espèces, variétés et même accessions. Selon de nombreux auteurs Cressey et *al.* (1987); Peltonen and Virtanen (1994); Jia et *al.* (1996); Wooding et *al.* (2000); Triboï et *al.* (2003) et Sharaf et *al.* (2013), le degré de polymorphisme intraspécifique observé au niveau des différents électrophorogrammes peut être sous la dépendance des facteurs génétiques et agroclimatiques. De même, Dupont et *al.*, (2006) rapportent que chez le blé tendre (*Triticum aestivum*) par exemple la combinaison entre le stress thermique et la nutrition minérale (NPK) engendre une augmentation dans la quantité et la composition des protéines.

De même, Juan et *al.* (2004) ont mentionné une variabilité dans les teneurs en protéines des populations de *Teucrium* d' Espagne, avec des teneurs qui varient de 4 - 6% et 8 - 43% respectivement pour le *Teucrium dunense* et *Teucrium algarbiense*. Les populations étudiées contiennent aussi des quantités satisfaisantes en leucine, thréonine et valine, alors

### ***Chapitre 3 : Résultats et discussion***

---

qu'elles sont pauvres en lysine. La teneur en protéines totales chez *Teucrium polium* L. *Capitatum* est de l'ordre de  $17.9 \pm 10.9\%$ , avec des quantités satisfaisantes en glutamine, aspartate et arginine et pauvre en histamine et méthionine. D'autre part, aucune corrélation entre la composition des acides aminés et l'habitat n'a été décelée.

## Deuxième partie: Etude physio-biochimique de la plante *Teucrium polium*

### *L. ssp. Capitatum*

#### 1. Données climatiques de la zone d'étude « Sidi Rghiss »

La caractérisation climatique de notre station d'étude a été faite sur les bases de données climatiques fournies par le centre météorologique d'Oum El Bouaghi sur une période s'étendant sur 10 ans de 2001 à 2011 pour les précipitations et les températures.

##### 1.1. Précipitations

L'analyse des variances mensuelles des précipitations sur une période de 10 ans, montre que (tableau 12):

- Le mois le plus pluvieux est le mois de Décembre avec une moyenne mensuelle de 54.36 mm. Cependant, il est constaté que le mois de Février est celui qui présente les jours les plus pluvieux. Un maximum est noté au mois de Janvier 152.2 mm
- Le mois le moins pluvieux est Juillet avec une moyenne de 9.48 mm.

La pluviosité moyenne annuelle est de 477.23 mm. Cette valeur correspond à la fourchette du semi- aride allant de 300 à 600 mm (annexe 2).

**Tableau 12:** Variations mensuelles et moyennes des précipitations (Oum El Bouaghi 2001 à 2011)

| Mois            | J     | F     | M    | A     | M     | J    | J    | A     | S    | O     | N     | D     | AN     |
|-----------------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|--------|
| P. moy.<br>(mm) | 52.24 | 33.85 | 38.3 | 53.82 | 61.93 | 23.2 | 9.48 | 25.93 | 47.1 | 34.98 | 42.04 | 54.36 | 477.23 |

##### 1.2. Températures

Les variations mensuelles des températures de la période des dix ans, montrent que (tableau 13 et annexe 2), les températures maximales sont enregistrées au niveau des mois de Juin, Juillet et Août, alors que les minimales sont observées au niveau des mois de Décembre, Janvier et Février.

**Tableau 13:** Variations mensuelles et moyennes des températures (Oum El Bouaghi 2001 à 2011)

| Mois                           | J     | F     | M     | A     | M     | J     | J     | A     | S     | O     | N     | D     |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| T. moy. jour ( <sup>0</sup> c) | 6.98  | 7.74  | 11.69 | 14.85 | 18.86 | 26.27 | 29.58 | 28.7  | 23.42 | 19.21 | 12.17 | 7.9   |
| T. moy. maximale               | 1.34  | 1.63  | 4.98  | 7.84  | 11.7  | 16.58 | 19.85 | 19.9  | 16.0  | 12.19 | 6.15  | 2.63  |
| T. moy. minimale               | 13.09 | 14.19 | 18.53 | 21.85 | 27.29 | 33.43 | 38.84 | 37.52 | 31.13 | 26.92 | 18.18 | 13.38 |

### 1.3. Indice d'aridité

Le calcul de l'indice d'aridité de la wilaya d'Oum El Bouaghi est de 17.49 compris entre 10 et 20. De Martonne la classe dans la zone semi aride.

### 1.4. Données climatiques de l'année d'étude 2011

#### 1.4.1. Précipitations

Les variations mensuelles des précipitations sur une période de 8 mois, montrent que:

- Le mois le plus pluvieux est le mois de février avec une moyenne mensuelle de 99.9 mm.
- Le mois le moins pluvieux est Juillet avec une moyenne mensuelle de 1.0 mm (tableau 14).

**Tableau 14:** Variations moyennes des précipitations des 8 mois d'étude (Oum El Bouaghi)

| Mois                    | J    | F    | M    | A    | M     | J    | J    | A    | S    | O    | N    | N    |
|-------------------------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| P.moy (mm)              | 16.8 | 99.9 | 38.1 | 63.9 | 110.1 | 18.4 | 1.0  | 4.7  | 60.2 | 69.2 | 3.8  | 33.5 |
| T.moy ( <sup>0</sup> C) | 7.2  | 5.8  | 9.4  | 13.8 | 16.0  | 21.0 | 26.6 | 26.1 | 30.3 | 25.2 | 16.6 | 12.4 |

#### 1.4.2. Température

Les températures maximales sont enregistrées aux mois de juillet avec 26.6 <sup>0</sup>C, alors que les minimales sont observées au mois de février avec 5.8 <sup>0</sup>C (tableau 15).

**Tableau 15:** Variations moyennes des températures des 8 mois d'étude (Oum El Bouaghi)

| Mois          | J   | F   | M   | A    | M    | J    | J    | A    | S    | O    | N    | N    |
|---------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| T.moy<br>(°C) | 7.2 | 5.8 | 9.4 | 13.8 | 16.0 | 21.0 | 26.6 | 26.1 | 30.3 | 25.2 | 16.6 | 12.4 |

#### 1.4.3. Le vent

D'après le tableau 16, on remarque que les vents les plus violents ont soufflés au mois de février avec une vitesse moyenne de 3.6 Km/h, mais froids vu les températures de la saison hivernale.

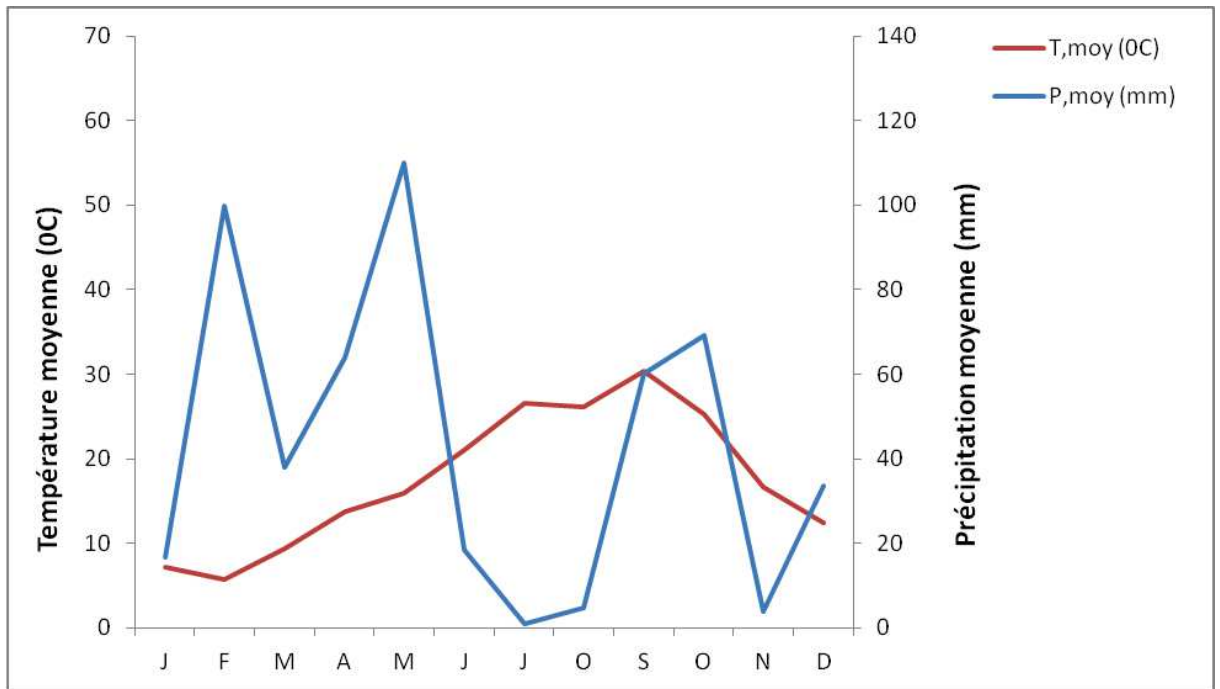
Tandis que, les plus faibles ont soufflés au mois de janvier avec une vitesse moyenne de 2.1 Km/h.

**Tableau 16:** Variations des vents des 8 mois d'étude (Oum El Bouaghi)

| Mois               | J   | F   | M   | A   | M   | J   | J   | A   | S   | O   | N   | N   |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Vent. moy<br>(m/s) | 2.1 | 3.6 | 2.9 | 2.8 | 2.9 | 2.5 | 3.0 | 2.5 | 2.7 | 2.1 | 2.1 | 2.5 |

#### 1.4.4. Diagramme ombrothermique

Le diagramme ombrothermique de la période d'étude illustré par la figure 32 met en évidence deux périodes. La première froide et humide où la courbe de précipitations est au dessus de celle des températures. La seconde est considérée chaude et sèche. La période humide débute de décembre à mai et la période sèche s'étale de juin à septembre.



**Figure 32:** Diagramme ombrothermique pour la période d'étude (Oum El Bouaghi, 2011)

## 2. Caractérisation physio-biochimique du sol de la station de Sidi Rghiss (Oum El Bouaghi)

Les résultats relatifs aux texture, pH, conductivité, taux d'humidité, matière organique, P total et assimilable, N total et assimilable, et le ratio C/N sont représentés dans le tableau 17:

- La granulométrie est une caractéristique héritée de l'histoire géologique et pédologique de la parcelle. Le sable est la fraction granulométrique la plus représentative dans le site (environ 69.46%). L'argile reste la fraction la moins représentée avec 0.60% de terre fine (tableau 17). La classe texturale de l'échantillon analysé y est déterminée en fonction du positionnement des valeurs en argiles et limons totaux, cette terre est donc qualifiée de sable limoneux.

Un sol avec une telle composition a l'avantage de se ressuyer (éliminer l'excédent d'eau) rapidement (le sol est d'une grande perméabilité), facile à travailler. Par contre, il a une faible réserve en eau et retient peu les éléments nutritifs.

**Tableau 17:** Caractérisation du sol de la station de Sidi Rghiss (Oum El Bouaghi)

| <b>Paramètres</b>                   | <b>Données</b>                                    |
|-------------------------------------|---|
| <b>Eléments (%)</b>                 | Sables 69.46 %<br>Limon 29.92 %<br>Argiles 0.60 % |
| <b>Taux d'humidité (%)</b>          | 7.40 ± 0.10                                       |
| <b>pH</b>                           | 8,06 ± 0,17                                       |
| <b>Conductivité (µs/cm)</b>         | 1430 ± 0.003                                      |
| <b>Calcaire total (%)</b>           | 42.06 ± 21.12                                     |
| <b>Calcaire actif (%)</b>           | 3.00 ± 0.70                                       |
| <b>Matière organique (%)</b>        | 4.28 ± 0.85                                       |
| <b>Phosphore total (mg/l)</b>       | 0.73 ± 0.22                                       |
| <b>Phosphore assimilable (mg/l)</b> | 0,05 ± 0,03                                       |
| <b>Nitrates (mg/l)</b>              | 11.41 ± 2.12                                      |
| <b>Azote total (%)</b>              | 3.88 ± 0.80                                       |
| <b>Rapport C/N</b>                  | 5.60 ± 1.40                                       |

- La matière organique joue un rôle important dans les fonctionnements physique, chimique et biologiques du sol. Le sol de la zone d'étude est pauvre en matière organique (4.28 ± 0.85%) (tableau 17). Ceci peut être dû d'une part à de faibles teneurs en argile, reconnue pour jouer un rôle important dans l'adsorption de la matière organique dans les sols (Roulet et Grimaldi, 2001). D'autre part, la susceptibilité au métabolisme microbien peut aussi expliquer cette teneur (Brady et *al.*, 2002).

- En ce qui concerne le taux d'humidité, ce paramètre a enregistré une valeur faible (7.40 ± 0.10%) (tableau 17). Cet effet revient certainement à la texture du sol, donc fortement associé aux caractéristiques physiques (Neffar et *al.*, 2011). D'après Klute (1986), la matière organique a un effet direct sur la fonction de rétention en eau à cause de sa nature hydrophilique/hydrophobique.



- Les résultats relatifs aux taux de calcaire total et actif ont révélé des valeurs de  $42.06 \pm 21.12\%$  et  $3 \pm 0.70\%$  respectivement, fluctuant dans la fourchette des sols calcaires. Ces variables sont principalement liées à la nature du matériel parental de la région (Sierra et *al.*, 2009). En effet, les faibles teneurs en calcium sont liées au caractère acide, tandis que les fortes teneurs dénotent un milieu fortement basique (Baize, 2000).
- La mesure du pH d'un sol permet de définir son état d'acidité ou d'alcalinité (ou statut acido-basique). La valeur moyenne du pH ( $8,06 \pm 0,17$ ) situe ce sol parmi les sols basiques; ceci montre que ces sols restent influencés par le calcaire. Ces sols qui se caractérisent par un complexe adsorbant saturé en calcium sont très répandus en climat semi-aride (Benabdellah et *al.*, 2010). D'après Brady et *al.* (2002), il existe très peu de réactions chimiques et microbiologiques dans les sols qui ne soient pas sensibles au pH.
- Quant à la conductivité électrique, sa valeur moyenne supérieure à  $1000 \mu\text{S}/\text{cm}$  révèle des sols légèrement salés (Mathieu and Pieltain, 2003). Cela peut être reflète une augmentation de la salinité due à l'accumulation à la surface du sol du Na, Ca, Mg, Cl et  $\text{SO}_4$  (Abule et *al.*, 2007) attribuée au processus physique de la désertification.
- Le phosphore est un des éléments majeurs indispensables à la croissance et au développement des végétaux. Les concentrations en P total et assimilable s'avèrent faibles ( $0.73 \pm 0.22$  et  $0,05 \pm 0,03$  respectivement) caractérisant un sol pauvre d'après la classification d'Olsen (1954). Selon Jinshui et *al.*, (2007), la disponibilité de P dépend davantage des processus biologiques de recyclage de P organique à travers les activités de la biomasse microbienne et des mycorhizes, que de la libération de P inorganique adsorbé à travers des processus chimiques (Oberson et *al.*, 2001; Bünemann et *al.*, 2004). D'autre part, la disponibilité du phosphore est bien liée à la nature et à l'état de l'agent adsorbant (Duchaffour, 1997). L'interprétation du P étant délicate, car liée à l'extractif et au type de sol, il est intéressant de le mesurer par plusieurs méthodes afin d'avoir une vision plus globale.
- Quant à l'azote total, cette variable a enregistré une teneur acceptable. Selon Goutouly (2011) la disponibilité en azote dans le sol dépend de nombreuses transformations biologiques car résultant de l'action des microorganismes du sol sur les différentes matières organiques du sol, ou non biologiques (lessivage, volatilisation...). Ces mécanismes sont dépendants de divers facteurs physiques qui relèvent de la caractérisation du pédoclimat (température,

humidité des sols, pluviométrie, taux d'argiles et de calcaire, pH, compacité des sols...). D'après la littérature, les conditions d'alcalinités favorisent la volatilisation de l'azote (Sommer et Hutchings, 2001).

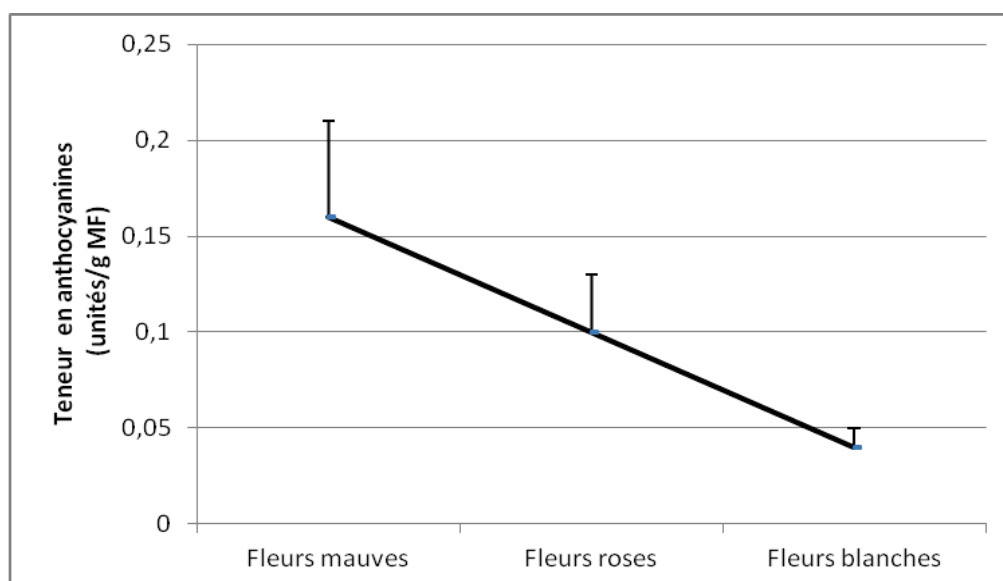
- Pour le ratio C/N, ce paramètre a enregistré une valeur faible ( $5.60 \pm 1.40$ ) vu peut être la forte minéralisation (L.C.A., 2008). Selon Rezaei and Gilkes (2005), ce ratio renseigne sur le degré d'évolution de la matière organique, l'activité biologique et le potentiel de fourniture d'azote par le sol (minéralisation). D'après Benabadji et *al.* (1996), le rapport C/N dépend également de la nature des débris organiques et de la maturation de l'humus. Un humus bien décomposé aura un C/N bas.

- Le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) est la forme assimilable disponible pour les plantes. Au regard de la teneur obtenue, une matière organique à faible C/N ( $5.60 \pm 1.40$ ) va être rapidement minéralisée en fournissant beaucoup d'azote minéral. Selon Troeh et *al.* (2005), ce processus est activée dans les sols bien aérés, non acides tel est le cas du sol étudié. Pourtant, les formes minérales assimilables par les plantes sont aussi importantes dans le sol que l'azote total, seulement 1,5 à 3,5 % de l'azote organique dans un sol minéralise chaque année (Brady et *al.*, 2002).

### **3. Les paramètres physio-biochimiques étudiés**

#### **3.1. Teneurs des anthocyanines**

Les teneurs mesurées en anthocyanines permettent de constater que le phénotype à fleurs mauves ( $0.18 \pm 0,05$  mg/g MF) est nettement supérieure aux fleurs roses et blanches ( $0.10 \pm 0,03$  et  $0.04 \pm 0,01$  mg /g MF. respectivement) (figure 33).



**Figure 33:** Teneur en anthocyanines chez les trois phénotypes étudiés

L'analyse de la variance de ces résultats montre des différences très hautement significatives entre les trois phénotypes étudiés de *Teucrium polium* L. *Capitatum* (tableau 18).

Le test de Newman et Keuls à 1% montre une variabilité biochimique dégageant trois groupes homogènes dont le premier est composé des plantes à fleurs mauves, suivi des plantes à fleurs roses et comme dernier groupe les plantes à fleurs blanches (annexe 5.2).

**Tableau 18:** Carrés moyens de l'analyse de variance des paramètres physio-biochimiques

| Source    | Ddl | Teneurs en anthocyanines | Teneurs en sucres solubles |
|-----------|-----|--------------------------|----------------------------|
| Total     | 14  | 0,01882                  | 0,8546                     |
| Phénotype | 2   | 0,0171 **                | 0,6752 **                  |
| Erreur    | 12  | 0,00171                  | 0,1794                     |

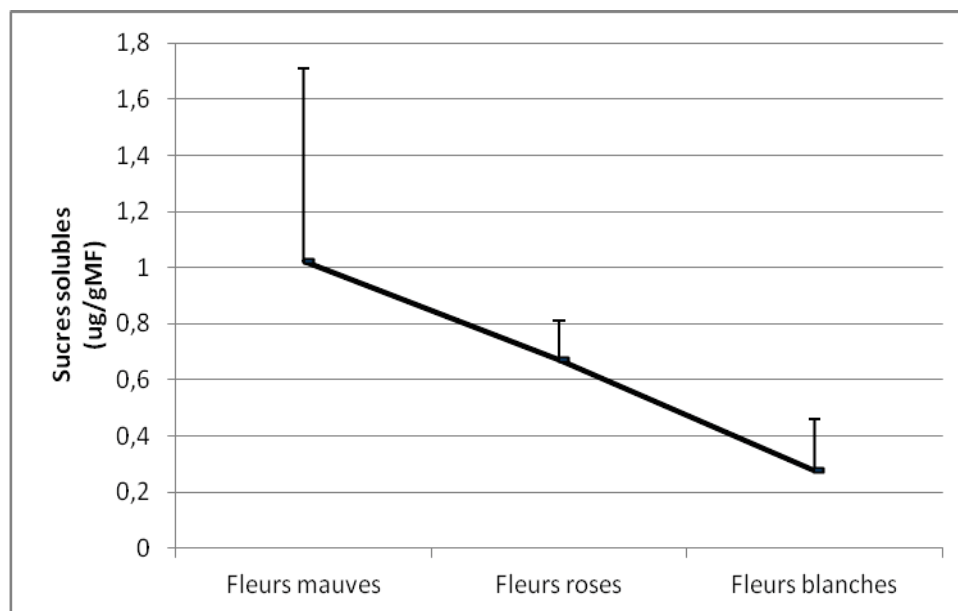
\*, \*\* : effet significatif à 5 et 1% respectivement

### 3.2. Teneurs en sucres solubles

Les teneurs en sucres solubles obtenues montrent une nette différence entre les trois phénotypes, avec une grande accumulation de cette substance chez les plantes à fleurs mauves (figure 34).

Les résultats sont très hautement significatifs par le biais de l'analyse de la variance chez les trois phénotypes de *Teucrium polium* L. *Capitatum* étudiés (tableau 18).

Le test de Newman et Keuls au seuil 1% montre pour la comparaison des phénotypes une grande quantité de sucres solubles chez les plantes à fleurs mauves ( $1,02 \pm 0,69 \mu\text{g}/100\text{mg MF}$ ) contrairement à celle aux fleurs blanches où on a enregistré les plus faibles concentrations ( $0,28 \pm 0,18 \mu\text{g}/100\text{mg MF}$ ); le phénotype restant est intermédiaire entre les deux groupes ( $0,67 \pm 0,14 \mu\text{g}/100\text{mg MF}$ ) (annexe 5.2).



**Figure 34:** Teneur en sucres solubles chez les trois phénotypes étudiés

Les plantes à fleurs blanches présentent une faible teneur en anthocyanes (figure 33), ce qui correspond très probablement à la réduction des besoins de photoprotection, comme la maturation photosynthétique des feuilles qui permet d'équilibrer la capture de l'énergie et son utilisation (Hughes et *al.*, 2007).

Les résultats obtenus ont permis de noter un rapport entre l'accumulation des anthocyanines et la teneur des sucres solubles. Avec les trois couleurs de fleurs étudiées on obtient une proportionnalité d'environ 1/6 et 1/7, équivalent à une unité d'anthocyanines pour environ 6  $\mu\text{g}$  de sucres solubles dans 1000 mg de matière fraîche.

Différents chercheurs ont montré que les glucides sont des inducteurs puissants des pigmentations anthocyaniques dans les différents organes de plusieurs espèces végétales, par le biais de leur capacité d'activer la transcription des gènes intervenant dans la biosynthèse des anthocyanes. Par exemple, les sucres favorisent l'accumulation des anthocyanes dans les corolles de *Petunia hybrida* en voie de développement, ainsi que les suspensions cellulaires

de *Vitis vinifera* et l'hypocotyle de *Raphanus sativus* (Larronde et al., 1998; Weiss, 2000; Hara et al., 2003), et spécifiquement le saccharose et le maltose induisent la biosynthèse des anthocyanes chez des plantules d'*Arabidopsis* (Ohto et al., 2001; Teng et al., 2005; Rolland et al., 2006; Solfanelli et al., 2006).

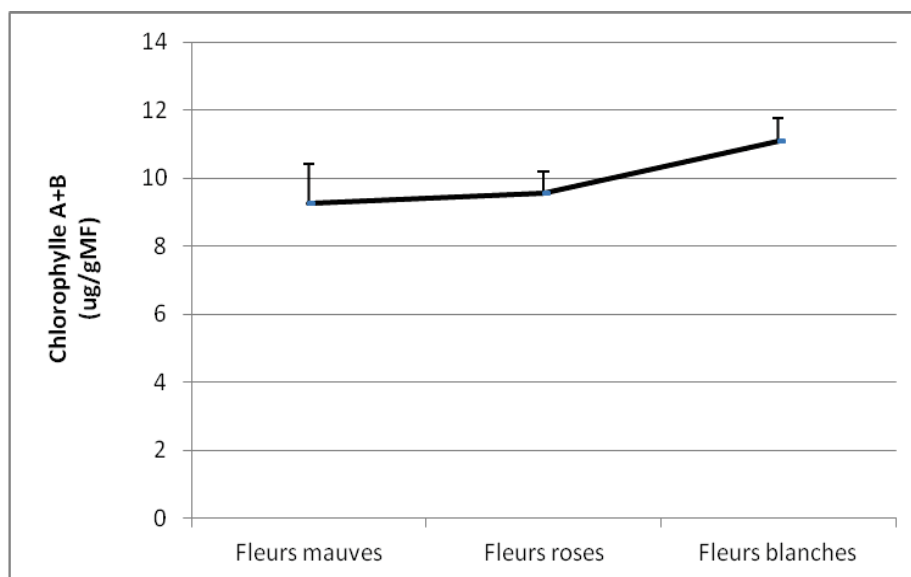
Peu de travaux ont été faits sur l'influence de la fertilisation minérale sur les teneurs en composés phénoliques. L'équipe de Penalosa (1989) ont observé qu'une déficience (0.2 et 0.5 mmol/l) ou un excès (4 mmol/l) en phosphore dans la solution nutritive entraîne une diminution des teneurs en flavonoïdes dans les feuilles de tomate. Par contre, Stewart et al. (2001) ont mis en évidence que de faibles apports en phosphores augmentaient les teneurs en flavonols dans les fruits de tomate pendant les premiers stades de maturation. La limitation en phosphore peut également induire chez l'*Arabidopsis* l'accumulation des anthocyanes (Chalker-Scott, 1999; Steyn et al., 2002).

La nutrition azotée modifie aussi les teneurs en composés phénoliques (Dumas et al., 1993; Wilkens et al., 1996). Stout et al. (1998) ont obtenu des concentrations deux fois plus importantes dans les feuilles de tomate ayant poussé dans de faibles apports en N (2 mM) en comparaison des teneurs obtenues dans les feuilles du fort traitement en N (8 mM). D'autres études relatent également une augmentation des teneurs en polyphénols lors de faibles apports en azote, dans les tubercules de pomme de terre, ou dans les fruits comme le raisin ou les pommes (Awad et De Jager, 2002; Delgado et al., 2004; Mittelstra et al., 2006). Certains travaux ont montrés que la limitation de l'azote pouvait induire l'accumulation des anthocyanes et la régulation des gènes de la synthèse d'anthocyanines dans les plantes (Bongue-Bartelsman et Phillips, 1995; Chalker- Scott, 1999; Stewart et al., 2001; Peng et al., 2007). Les travaux de Fritz et al. (2006) ont mis en évidence que les apports d'azote inhibent fortement le métabolisme des phénylpropanoïdes dans les feuilles du tabac, dans ce contexte Peng et al. (2008) ont montré que le mutant NLA est impliqué dans l'acheminement du flux métabolique des phénylpropanoïdes nécessaires à la synthèse des anthocyanes, permettant ainsi aux plantes d'accumuler les anthocyanes en abondance et de s'adapter à la limitation en azote.

### 3.3. Variations des pigments photosynthétiques

#### 2.3.1. Teneurs en chlorophylles (A+B)

La teneur en chlorophylles (A+B) pour chaque phénotype met en évidence des faibles valeurs chez les deux phénotypes aux fleurs mauves et roses ( $9,27 \pm 1,15$  et  $9,54 \pm 0,65 \mu\text{g/g MF}$  respectivement), par rapport aux phénotypes à fleurs blanches ( $11,09 \pm 0,69 \mu\text{g/g MF}$ ) (figure 35).



**Figure 35:** Teneur en chlorophylles A+B chez les trois phénotypes étudiés

L'analyse de la variance montre que les résultats sont hautement significatifs chez les trois groupes étudiés (tableau 19).

Le test de Newman et Keuls au seuil 5% a révélé essentiellement deux groupes distincts composés des phénotypes aux fleurs mauves et roses pour le premier groupe et le deuxième lieu les fleurs blanches (annexe 5.2).

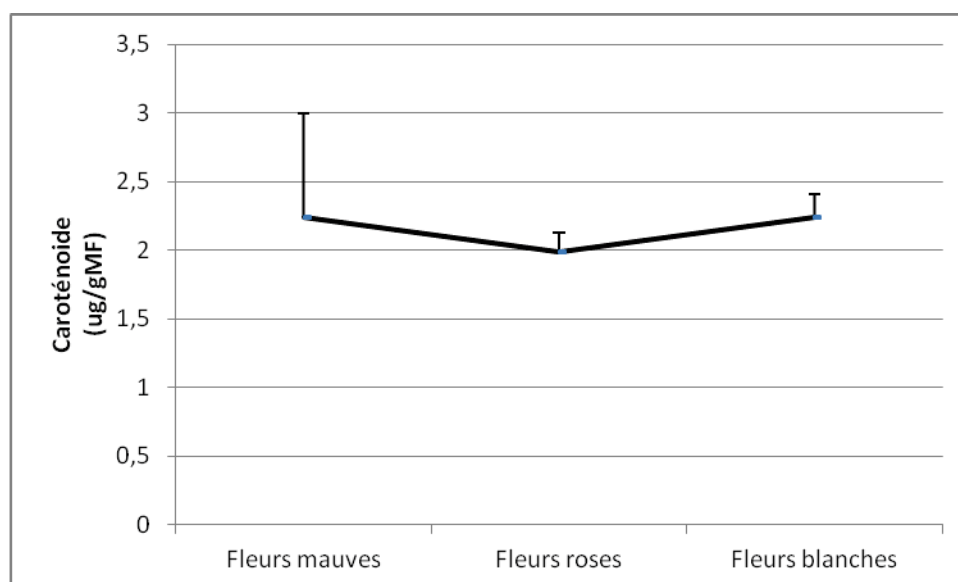
**Tableau 19:** Carrés moyens de l'analyse de variance des pigments photosynthétiques

| Source    | Ddl | Chl (A+B) | Teneurs en caroténoïdes | Rapport carot / chlo tot |
|-----------|-----|-----------|-------------------------|--------------------------|
| Total     | 14  | 5.554     | 0.565                   | 0.003                    |
| Phénotype | 2   | 4.804 *   | 0.001 Ns                | 0.354 Ns                 |
| Erreur    | 12  | 0.750     | 0.211                   | 0.002                    |

Ns, \*, \*\* : effet non significatif et significatif à 5 % et 1% respectivement

### 2.3.2. Teneurs en caroténoïdes

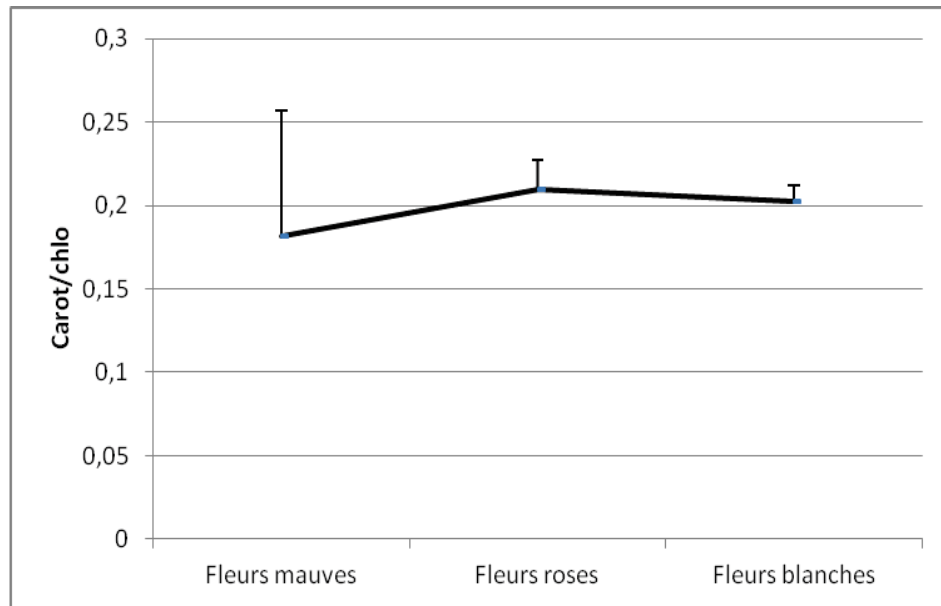
La figure 36 montre que la teneur en caroténoïdes chez les échantillons de fleurs blanches et mauves est de  $2,24 \mu\text{g/g MF}$ , non loin de la valeur des échantillons des fleurs roses ( $1,99 \pm 0,14 \mu\text{g/g MF}$ ). Ceci est bien démontré par l'effet non significatif de l'analyse de la variance (tableau 19).



**Figure 36:** Teneur en caroténoïdes chez les trois phénotypes étudiés

### 3.3.3. Rapport carot /chlo tot

La figure 37 permet de constater que, le rapport carot/chlo tot est nettement élevé chez les plantes à fleurs roses ( $0,21 \pm 0,018$ ) en comparaison avec les autres plantes. Cependant, l'analyse de la variance n'a révélé aucun effet significatif (tableau 19).



**Figure 37:** Rapport carot/chlo tot chez les trois phénotypes étudiés

Il a été noté par plusieurs auteurs que, chez les plantes supérieures seules les pigments chlorophylliens contribuent à l'absorption de la lumière dans la région rouge du spectre visible, et l'absorption à des longueurs d'ondes plus courtes, en particulier dans la région verte à bleue, peut être attribuée à d'autres pigments foliaires; les caroténoïdes et les flavonoïdes (y compris les anthocyanines) (Gitelson *et al.*, 2001; Cerovic *et al.*, 2002; Merzyliak *et al.*, 2003 et 2008; Solovchenko et Merzyliak, 2008; Albert *et al.*, 2009; Matus *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2011).

Il est intéressant de noter aussi que, les concentrations en chlorophylles totaux sont très élevées chez les plantes à fleurs blanches (figure 35), ce qui exige selon Fondom *et al.* (2009) une photoprotection supplémentaire par le cycle des xanthophylles qui assure la conversion de violaxanthine en zéaxanthine, lorsqu'il est nécessaire de dissiper un excès d'énergie sous forme de chaleur. D'autre part, Merzyliak *et al.* (2008) ont constaté dès les premières étapes de l'ontogenèse que l'accumulation des anthocyanines dans les vacuoles est comparable ou/et dépasse celle des pigments chloroplastiques, et permet de fournir une protection à long terme contre la phototoxicité induite par la chlorophylle, sous des conditions de stress ou lors de l'altération de l'appareil photosynthétique en automne. Selon les mêmes auteurs, la dégradation de la chlorophylle dans les tissus foliaires produit aussi d'autres produits photosensibilisateurs puissants tels que la vitamine E.



L'utilité potentielle du cycle des xanthophylles est évidente dans la mesure où les plantes modifient leur contenu en caroténoïdes en réponse à toute une série de conditions environnementales. Dans les feuilles exposées en pleine lumière le rapport carot/chlo tot est typiquement plus élevé que dans des feuilles qui se sont développées à l'ombre. Il semble que le cycle des xanthophylles à qui appartiennent les caroténoïdes soit un processus ubiquiste de protection des chloroplastes contre d'éventuels effets destructeurs d'un excès de lumière (Hopkins, 2003). Il est de même chez les algues, le processus de caroténogénèse est induit par divers facteurs de stress, notamment leurs combinaisons (les carences en azote et en phosphore et les stress osmotique et oxydatif) (Solovchenko, 2013).

### 3.4. Corrélation entre les paramètres physio-biochimiques étudiés

La teneur des anthocyanines des extraits des trois groupes de plantes est corrélé positivement avec les teneurs en sucres ( $R^2 = 0.998$ ), négativement avec les caroténoïdes ( $R^2 = - 0.999$ ) et la chlorophylle totale ( $R^2 = - 0.915$ ) (tableau 20).

**Tableau 20:** Matrice des coefficients de corrélation des différentes variables analysées

| Variable       | Chl a+b  | Chl a/b | carot    | suc sol | antho |
|----------------|----------|---------|----------|---------|-------|
| <b>Chl a+b</b> | 1,00     |         |          |         |       |
| <b>Chl a/b</b> | -0,06    | 1,00    |          |         |       |
| <b>carot</b>   | 0,91***  | 0,33    | 1,00     |         |       |
| <b>suc sol</b> | -0,93*** | -0,28   | -0,99*** | 1,00    |       |
| <b>antho</b>   | -0,91*** | -0,34   | -0,99*** | 0,99*** | 1,00  |

Plusieurs recherches ont montré que les photorécepteurs de la photosynthèse contribuent également à la formation des anthocyanes, les signaux de la photosynthèse pourraient être induits par l'intermédiaire de la thylacoïdes kinase STN7 ou le peroxyde d'hydrogène, puis transmis à des cellules épidermiques (Wade et al., 2001; Kim et al., 2006; Shin et al., 2007; Pfannschmidt et al., 2009). Chez *Arabidopsis*, le traitement des plantules par le DCMU (diuron, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-diméthylurea) un inhibiteur de la photosynthèse, supprime l'accumulation des anthocyanines dans les tissus foliaires (Jeong et al., 2010). Un phénomène similaire a été observé chez les plantules de *Pétunia* chez lesquelles la pigmentation de la corolle est contrôlé par des signaux lumineux dérivés du calice et des feuilles (Weiss and Halevy, 1991; Moscovici et al., 1996). Selon Merzylak et al. (1999), les quantités et les proportions relatives des divers pigments; chlorophylles, caroténoïdes et

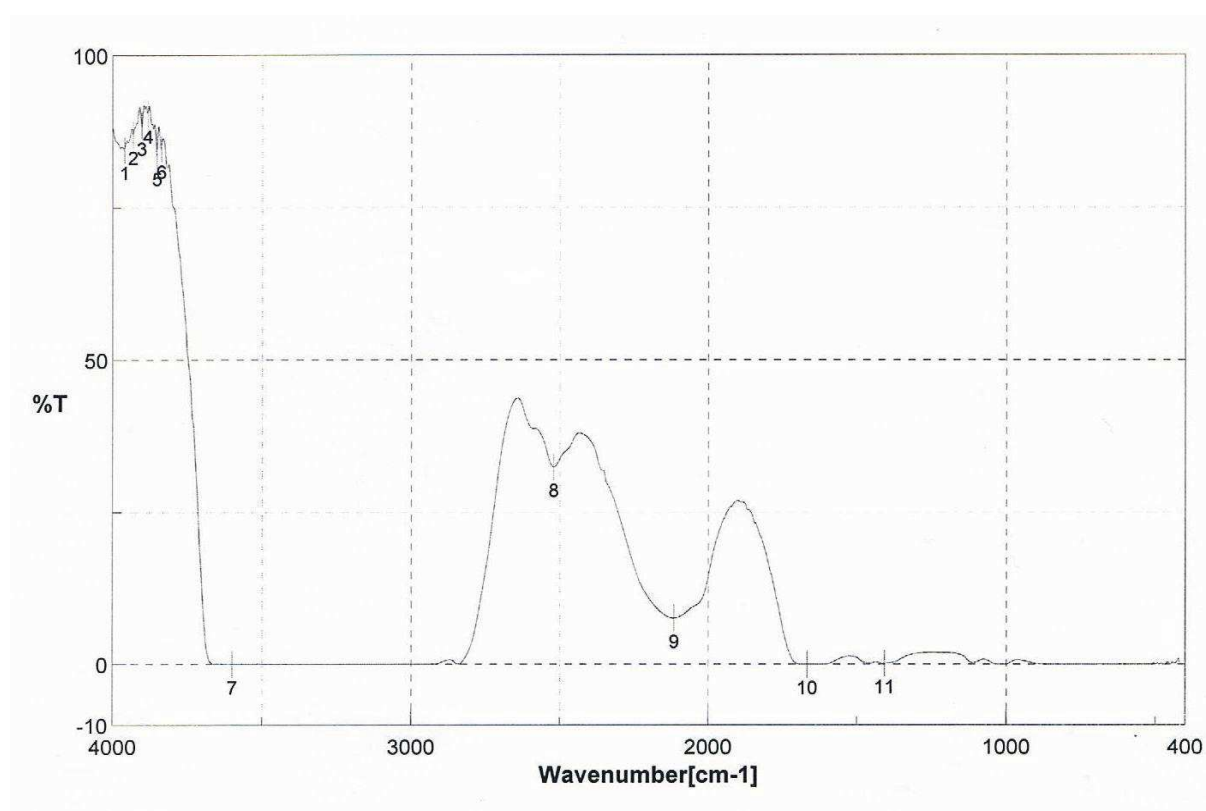
anthocyanines dans les feuilles et les fruits sont des indices sensibles de leur état physiologique et peuvent aussi varier de façon significative selon les conditions environnementales.

Actuellement, les travaux réalisés par Das et *al.* (2011) ont montré que les signaux lumineux responsable de la synthèse des anthocyanes semblent découler des cellules photosynthétiques en réponse à des sucres fournis d'une manière exogène et agissent alors à une distance sur des cellules sous épidermique et d'autres du système vasculaire, ce qui suggère la présence de molécules de signalisation intracellulaire.

#### 4. Interprétation des données spectrales

##### 4.1- Spectres IR

Les spectres infrarouges ( $4000-700\text{ cm}^{-1}$ ) réalisés sur pastilles de KBr sont présentés sur la figure 38.



**Figure 38:** Spectres IR ( $4000-700\text{ cm}^{-1}$ ) réalisés sur pastilles de KBr

Le spectre infrarouge indique la présence de groupement hydroxyle ( $3600.45\text{ cm}^{-1}$ ) et montre également la présence de bandes d'absorption des liaisons C-H aromatiques ( $1668.12\text{ cm}^{-1}$ ) et C-O, C=O et C≡C aliphatiques ( $1407.78\text{ cm}^{-1}$ ,  $2115.53\text{ cm}^{-1}$  et  $2115.53\text{ cm}^{-1}$ ).

#### 4.2- Caractérisation par CLHP

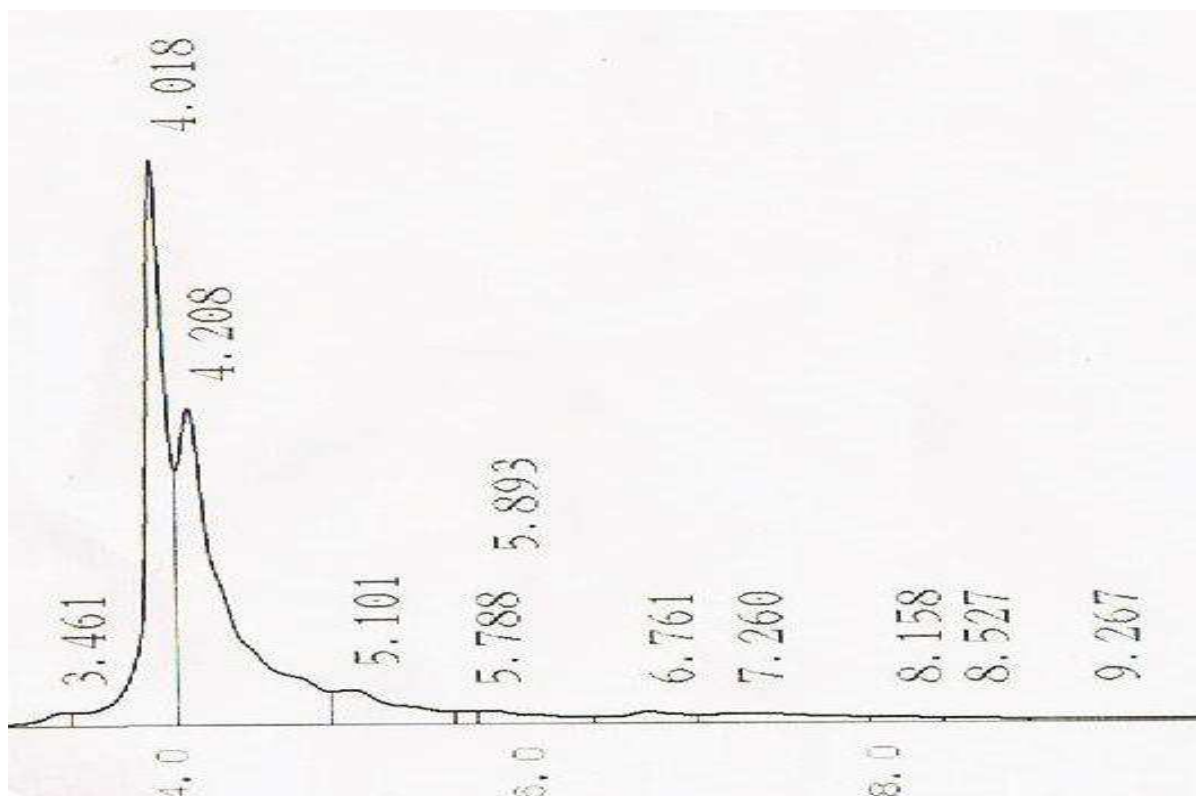
L'extrait méthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* a été analysé par CLHP-RP-C18, afin de comparer leur profil chromatographique avec ceux des standards et d'obtenir une information sur la nature chimique des constituants.

Six composés phénoliques purs (acide gallique, acide tannique, acide caféique, catéchine, rutine, quercétine) ont été utilisés dans l'analyse CLHP comme témoins. Leurs temps de rétentions (Tr) dans le tableau 21 ci-suivant et leurs chromatogrammes sont représentés dans l'annexe 5.1.

**Tableau 21:** Temps de rétention des différents témoins polyphénoliques obtenus par la séparation avec CLHP

| Standards      | Tr (min) |
|----------------|----------|
| Acide gallique | 3.344    |
| Acide tannique | 3.329    |
| Acide caféique | 1.996    |
| Catéchine      | 4.304    |
| Rutine         | 3.343    |
| Quercétine     | 6.686    |

Les chromatogrammes correspondant au profil des analyses qualitative et quantitative de l'extrait des fleurs de la plante *Teucrium polium* L. *Capitatum* est repris dans la figure 39. Tandis que les données correspondant à leurs évaluations quantitatives sont reprises dans le tableau 21. L'analyse CLHP de l'extrait méthanolique montre deux grands pics majoritaires; le premier pique avec un temps de rétention  $Tr = 4.018$  (35,15 mg/ml) et un autre pique avec un temps de rétention  $Tr = 4.208$  (40,49 mg/ml), alors que le quercétine (2,17 mg/ ml) et l'acide caféique (0,23 mg/ ml) sont les moins représentatifs.



**Figure 39:** Chromatogramme d'CLHP de l'extrait de *Teucrium polium* L. *Capitatum*

### 4.3- Spectre UV

Il est, en effet, connu que les anthocyanes présentent généralement une bande dans l'UV entre 270 et 280 nm et une bande visible entre 465 et 560 nm. Les coefficients d'extinction dans le visible étant en général plus faibles, la bande visible peut ne pas apparaître pour des faibles concentrations en anthocyanes. Ces bandes seraient dues aux transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  du noyau falvylum qui est le noyau de base des anthocyanes (Kahkonen et al., 2003; Mpiana et al., 2009).

Cette identification structurale est effectuée par le biais de différents réactifs, l'analyse comporte trois séries différentes, dont les spectres de chaque série sont superposés à fin de bien visualiser les déplacements dus aux réactions avec les différents réactifs utilisés.

#### a. Le spectre méthanol

Le spectre UV effectué dans le méthanol permettant d'observer deux bandes d'absorption, l'une à  $\lambda_{\max} = 372$  nm et l'autre à  $\lambda_{\max} = 264$  nm correspondant aux absorptions des deux cycles A et B de composés de type flavonoïde (Mabry et al., 1970).

**b. La première série**

La comparaison des spectres entre eux informe sur l'apparition d'une nouvelle bande 367nm montre la présence d'un OH libre sur la position 7 du cycle A, ceci est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = + 5$  nm) après addition de AcONa. Transformation de BI en une inflexion (374i), indique la présence d'un OH libre sur la position 5.

**c. La deuxième série**

Le déplacement hypsochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = - 28$  nm) enregistré en comparant les spectres  $AlCl_3$  et  $AlCl_3 + HCl$ , montre l'existence d'un système ortho dihydroxyle sur le cycle B en position 3' et 4'.

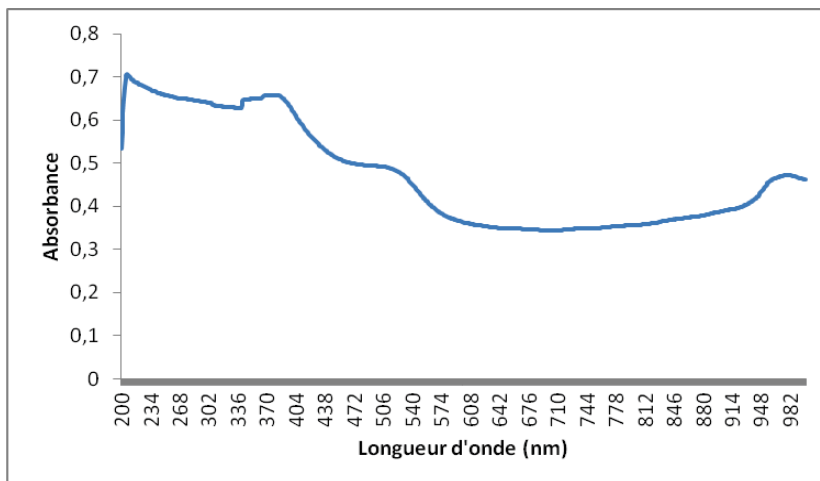
**d. La troisième série**

Elle provoque un effet bathochrome de 5 nm, sur la bande I qui indique la présence d'un hydroxyle libre en 7. Le spectre se décompose avec le temps, ce qui confirme la présence de 3, 3', 4' tri – OH. Le tableau 22 présente les résultats obtenus sur le composé anthocyanique.

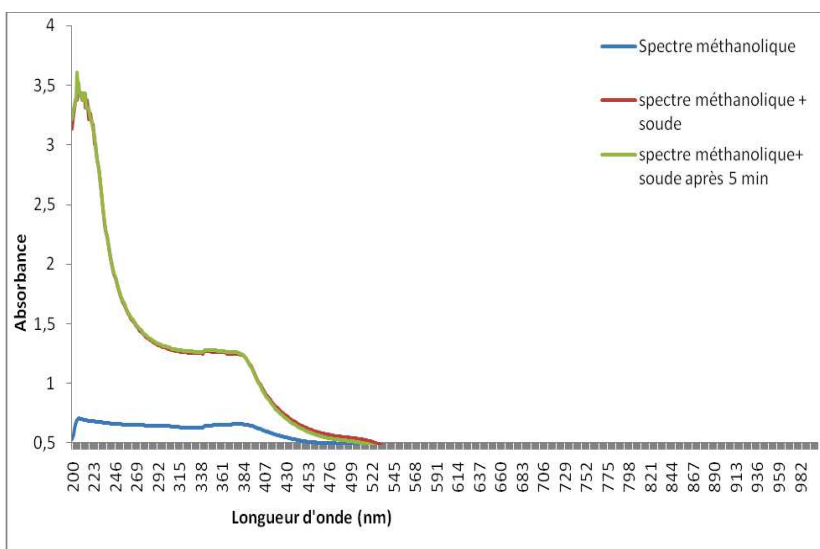
**Tableau 22:** Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

|                              | Réactif                                | Bande I   | Bande II | Observations     |
|------------------------------|--|---|----------|------------------|
| <b>1<sup>ère</sup> série</b> | MeOH<br>NaOH<br>NaOH (5min)            | 345, 372e<br>342e, 374i<br>342e, 367, 372e  | 264      | 5 – OH<br>7 – OH |
| <b>2<sup>ème</sup> série</b> | MeOH<br>$AlCl_3$<br>$AlCl_3 + HCl$     | 345, 372e<br>342, 344e<br>342   | 264      | 3', 4' di-OH     |
| <b>3<sup>ème</sup> série</b> | MeOH<br>NaOAc<br><br>NaOAc + $H_3BO_3$ | 345, 372e<br>309, 315, 321e, 327e,<br>331, 334, 336, 342,<br>345e, 349, 354e, 359,<br>362, 377<br>342, 375e | 264      | 3, 7,4' tri-OH   |

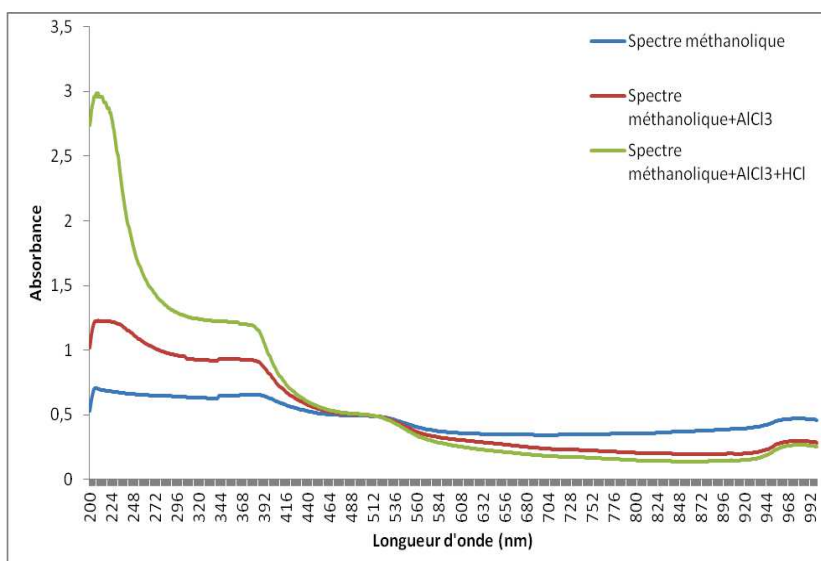
(i : inflexion, e : épaulement)



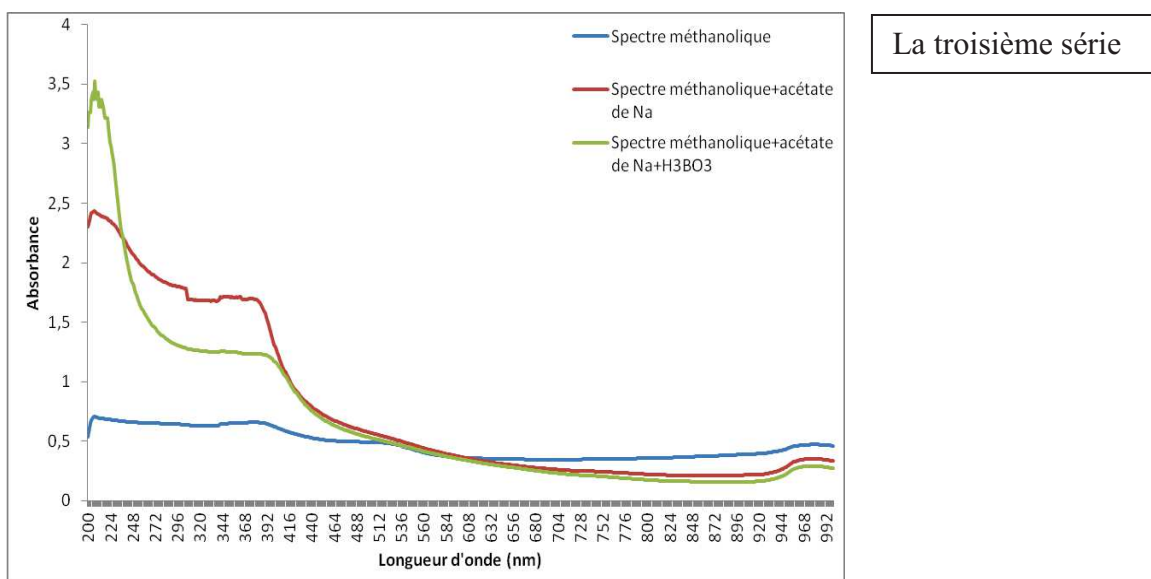
Le spectre méthanol



La première série

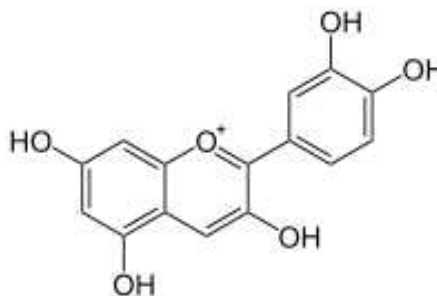


La deuxième série



**Figure 40:** Spectres UV de l'extrait de *Teucrium polium* L. *Capitatum*

Après interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante:



**Figure 41:** Cyanidine

## Troisième partie: Evaluation des activités biologiques de *Teucrium polium* L. ssp. *Capitatum*

### 1. Screening phytochimique

La phytochimie qualitative est basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisée sur des extraits reconstitués à partir de poudre lyophilisée de chaque échantillon végétal génère pour une première estimation des données préliminaires sur les constituants des extraits.

Les résultats de ce criblage phytochimique sont résumés dans le tableau 23. Il révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolite secondaire. Effectivement les extraits sont riches en flavonoïdes, anthocyanines, tannins galliques, terpènes, saponosides, glycosides et O-hétérosides à génines réduites, C-hétérosides et des huiles essentielles. Alors que les extraits sont dépourvus en tanins catéchiques, dérivés anthracéniques libres, O-hétérosides (anthraquinones), mucilages, coumarines et des alcaloïdes.

**Tableau 23:** Résultats du screening phytochimiques de *Teucrium polium* L. *Capitatum*

| Groupes chimiques                | Résultat |
|----------------------------------|----------|
| Flavonoïdes                      | +        |
| Anthocyanines                    | +        |
| Tanins catéchiques               | -        |
| Tanins galliques                 | +        |
| Saponosides                      | +        |
| Terpènes                         | +        |
| Dérivés anthracéniques libres    | -        |
| O-hétérosides (anthraquinones)   | -        |
| O-hétérosides à génines réduites | +        |
| C-hétérosides                    | +        |
| Huiles essentielles              | +        |
| Glycosides                       | +        |
| Mucilages                        | -        |
| Coumarines                       | -        |
| Alcaloïdes                       | -        |

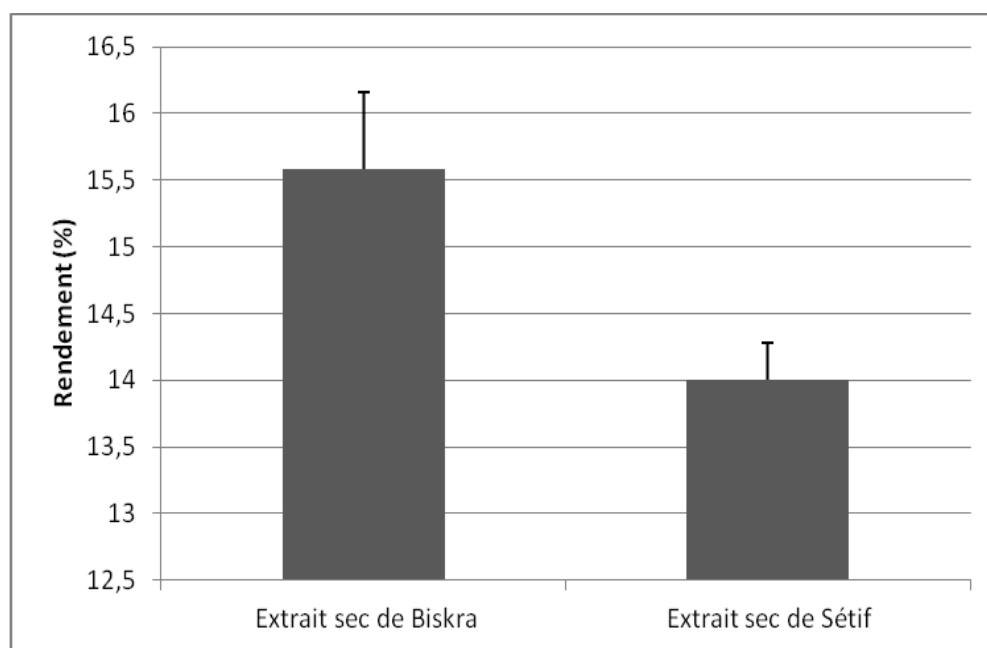
(+) : Résultat positif      (-) : Résultat négatif



## 2. Rendements et teneurs des composés phénoliques

### 2. 1. Rendement des extraits bruts

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction, de la figure 42 que les échantillons de Biskra ont donné un rendement d'extraction supérieur soit une moyenne de 15.58% en comparaison avec ceux de Sétif avec 14% en moyenne.



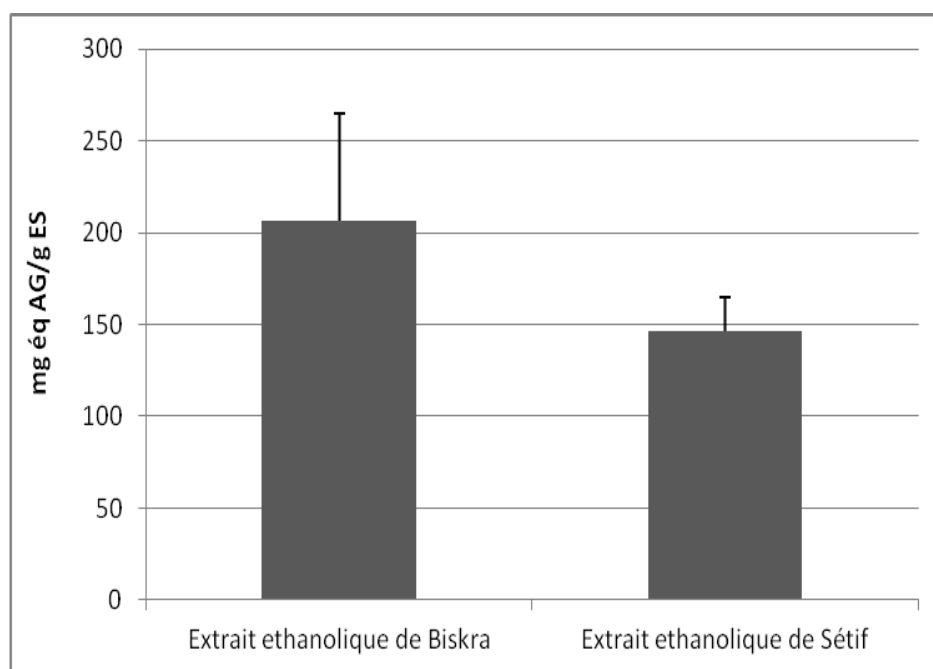
**Figure 42:** Rendements d'extraction des deux plantes

Statistiquement la différence entre les rendements d'extraction en fonction de l'origine de la plante n'est pas significative au niveau  $\alpha=0.05$ .

### 2.2. Dosage des phénols totaux

Les résultats obtenus des polyphénols sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (annexe 6.2).

Les teneurs en polyphénols totaux obtenus par les deux plantes ne révèlent pas une différence significative ( $p>0.05$ ) (annexe 6.3.1); toutefois, la plante originaire de Biskra semble renfermer une grande quantité en polyphénols totaux soit en moyenne  $206.54 \pm 58,17$  mg éq. AG/g PS contre  $146.13 \pm 18,95$  mg éq. AG/g PS pour la plante de Sétif (figure 43).



**Figure 43:** Teneurs en polyphénols totaux dans les deux extraits étudiés

Il est bien connu que les constituants des plantes médicinales peuvent varier considérablement en raison des facteurs génétiques, le climat, la qualité du sol et d'autres facteurs externes (Shan et *al.*, 2005). Dans notre cas, le climat semi-aride de l'Est algérien peut provoquer une hyperproduction des polyphénols totaux chez la population de Biskra en comparaison avec celle de Sétif, cette dernière qui se trouve dans des conditions moins extrêmes.

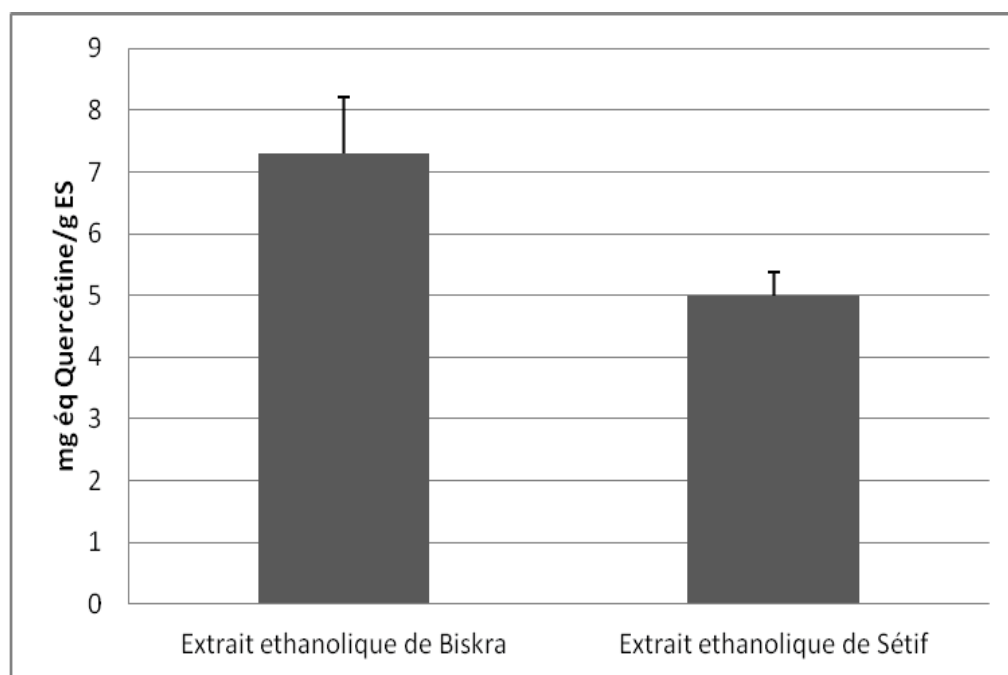
Selon Hamilton et *al.*, (2000), ces variations du contenu en polyphénols, sont dues au génotype étudié, à l'environnement de culture, et à l'interaction entre ces deux facteurs ( $P = G + E + G \times E$ ), d'où la complexité de caractériser leur évolution.

Les travaux conduits par Mulinacci et *al.* (2004); Katalinic et *al.* (2010) et Koffi et *al.* (2010) confirment nos résultats en indiquant que l'éthanol en combinaison avec l'eau permet une meilleure extraction des polyphénols totaux. L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant organique (Mohammedi and Atik, 2011). Cette augmentation est peut être due à l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions aqueuses. Elle pourrait également être due à l'augmentation de la basicité et de l'ionisation des polyphénols dans de telles solutions (Sripad et *al.*, 1982). La solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, de poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base (Mohammedi and Atik, 2011).

### 2.3. Dosage des flavonoïdes

La quercétine considérée comme contrôle positif a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes des deux plantes qui est exprimé en mg équivalent de quercétine (EC) par gramme de matière végétale sèche (annexe 6.2).

Les résultats de la teneur en flavonoïdes montrent que la valeur la plus élevée est celle de la plante de Biskra à savoir une moyenne de  $7.30 \pm 0.90$  mg éq. Qu/g extrait contre  $4.99 \pm 0.39$  mg éq. Qu/g extrait en moyenne pour la plante de Sétif (figure 44).



**Figure 44:** Teneur en flavonoïdes dans les extraits bruts

Statistiquement la différence entre les teneurs en flavonoïdes en fonction de l'origine de la plante est hautement significative ( $p < 0.01$ ) (annexe 6.3.2), appuyant sur les données de la figure 42 où on a enregistré des rendements élevés des extraits bruts ce qui prouve la richesse de la plante de Biskra en polyphénols à savoir les flavonoïdes.

De nombreux auteurs (Harborne, 1976; Hoch et al., 2001; 2003; Steyn et al., 2002; Hughes et al., 2005; Pfündel et al., 2006; Hughes et Smith, 2007; Merzyliak et al., 2008; Solovchenko et Merzyliak, 2008; Peng et al., 2008; Fondom et al., 2009; Hughes et al., 2010) ont décelé le rôle joué par cette famille de métabolite secondaire, dans la prévention du photovieillissement et de la photoinhibition par l'absorption des radiations solaires excessives qui seraient autrement absorbées par les pigments chloroplastiques. La biosynthèse des flavonoïdes est

également renforcée par l'augmentation des rayons UV, les forts éclaircissements, les températures extrêmes, la sécheresse, les carences en éléments nutritifs, et d'autres facteurs de stress.

### 3. Pouvoir antioxydant des composés phénoliques

Les résultats d'une seule méthode ne donnent que des suggestions réduites sur les propriétés antioxydantes des extraits, la combinaison de plusieurs techniques complémentaires, associant des mécanismes différents sont nécessaire pour une évaluation efficace et complète des potentiels antioxydants chez la plante.

Deux méthodes sont employées pour cette activité antioxydante: piégeage du radical libre DPPH et la chélation des métaux de transition, mesurée par la méthode du pouvoir réducteur.

Les composés qui ont été testés par la méthode de réduction de fer et celle de DPPH sont :

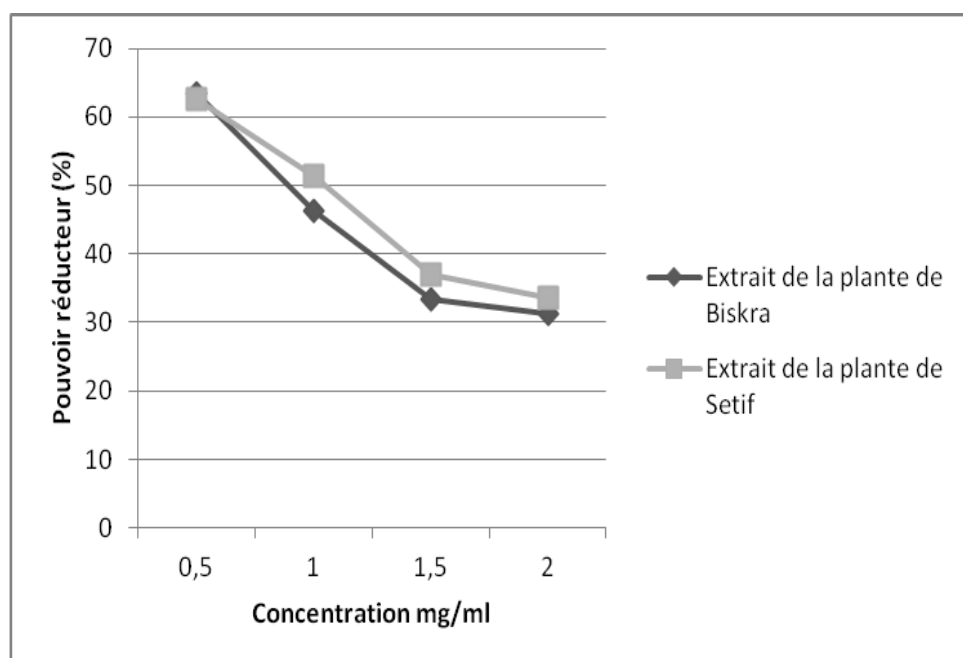
- Les extraits étudiés de *Teucrium polium* L. *Capitatum* originaire des wilaya de Sétif et Biskra;
- L'acide ascorbique est connu pour ses propriétés antioxydantes et utilisé comme contrôle positif.

#### 3.1. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$ . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (Yildirim et *al.*, 2001).

- **Pourcentage d'inhibition**

Les résultats de l'activité réductrice des extraits des plantes étudiées sont représentés dans la figure 45. On constate que la capacité réductrice est inversement proportionnelle à l'augmentation de la concentration. En effet, la capacité à réduire le Fer à la dose 2 mg/ml est presque la même pour les extraits des deux régions Biskra et Sétif ( $63.43\% \pm 3.45$  et  $62.58\% \pm 7.37$  respectivement).



**Figure 45:** Pouvoir réducteur des extraits bruts par la méthode FRAP

Le pouvoir réducteur de l'espèce *Teucrium polium* L. *Capitatum* est probablement dû à la présence dans les composés phénoliques des groupes hydroxyles qui peuvent servir comme donneur d'électron (Verdan et al., 2011). Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Waghulde et al., 2011).

- **Détermination d'IC<sub>50</sub>**

Afin de comparer l'activité antioxydante des extraits des deux plantes par cette méthode, on a calculé IC<sub>50</sub> qui est défini comme la concentration nécessaire pour réduire 50% du Fer.

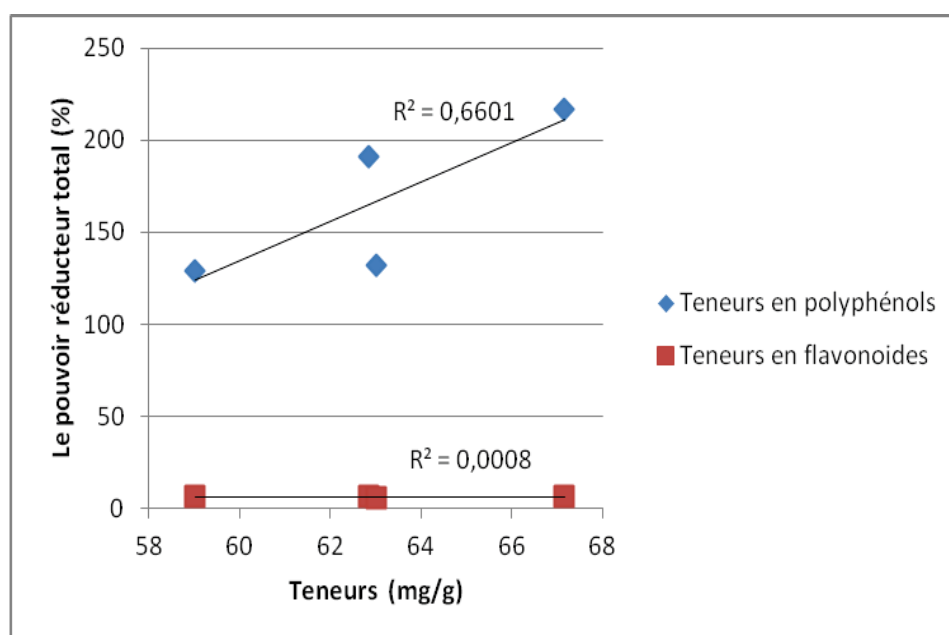
On remarque que la capacité à réduire le fer est variable entre les deux plantes, elle est plus ou moins importante dans l'extrait de la plante de Biskra (IC<sub>50</sub>=0.954 ± 0.30mg/ml) comparativement à l'extrait de la plante de Sétif dont la valeur IC<sub>50</sub> égale à IC<sub>50</sub>=1.079±0.19 mg/ml. Ces résultats nous ont permis de conclure que l'extrait de la plante de Biskra présente une meilleure activité antioxydante par rapport à celui de la plante de Sétif.

- **Corrélation entre les teneurs (phénols totaux et flavonoïdes) et le pouvoir réducteur total**

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 46. La teneur en polyphénols totaux des extraits de *Teucrium polium* L. *Capitatum* s'est corrélée significativement ( $R^2 = 0.66$ ) avec leurs pouvoirs réducteurs, indiquant que 66% de la capacité antioxydante d'extraits, soit due à

la contribution des composés phénoliques et qu'ils sont les antioxydants dominants dans ces extraits. Cependant, il n'y a pas une corrélation significative ( $R^2 = 0.0008$ ) entre la teneur en flavonoïdes et le pouvoir réducteur des extraits.

L'activité antioxydante ne peut être attribuée seulement aux polyphénols (Matthäus and Ozcan, 2005; Tlili et al., 2009; Ho et al., 2012). Les parties étudiées du *Teucrium polium* L. *Capitatum* contiennent d'autres composés ayant un effet antioxydant tels que les terpénoïdes, les saponosides et les caroténoïdes.



**Figure 46:** Relation entre le pouvoir réducteur total et les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes

### 3.2. Piégeage du radical libre DPPH

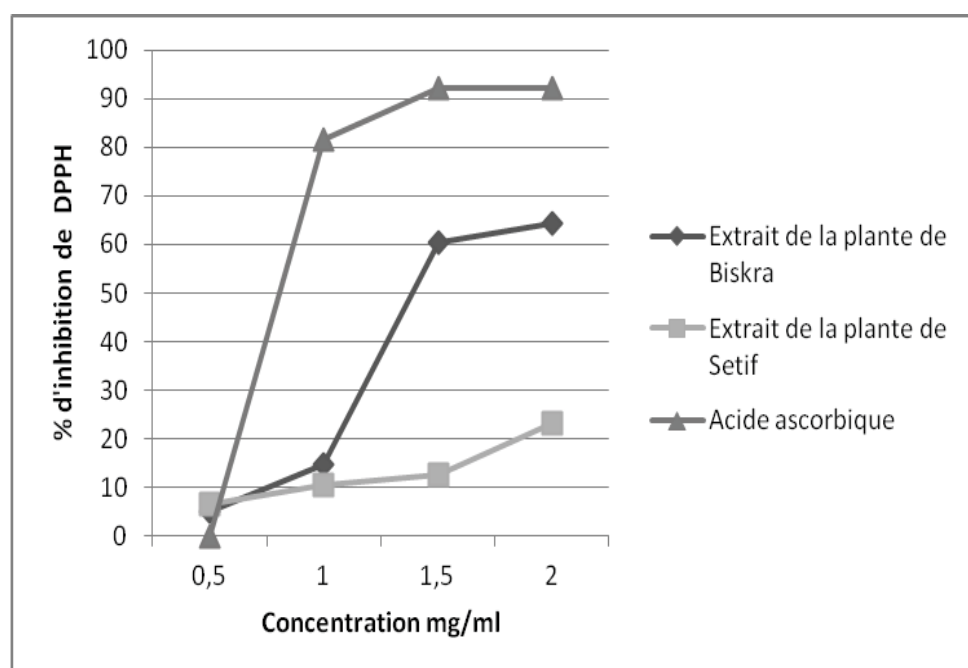
Dans notre travail, on a étudié l'activité antioxydante des deux extraits éthanoliques de *Teucrium polium* L. *Capitatum* afin de préjuger et localiser l'extrait le plus active. L'activité antioxydante par la même méthode est mesurée pour l'acide ascorbique, pris comme antioxydant de référence. Ce dernier a manifesté *in vitro* une capacité très puissante sur le radical libre DPPH•.

- **Pourcentage d'inhibition**

La figure 47 ci-dessous montre les résultats de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH• en fonction de concentration des composés testés. On constate que le pourcentage

d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour les extraits éthanoliques de *Teucrium polium* L. *Capitatum* ou pour l'acide ascorbique.

L'extrait de la population de Biskra a présenté l'activité antiradiculaire la plus élevée (64.46%  $\pm$  17.21), suivie par l'extrait de la population de Sétif avec une activité de 23.32%  $\pm$  0.32. Par contre, le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique est supérieur à celui des extraits étudiés (92.31%  $\pm$  0.21).



**Figure 47:** L'activité antioxydante des extraits bruts et de l'acide ascorbique par la méthode DPPH

Les résultats de l'activité antiradiculaire obtenus sont en accord avec ceux de Sharififar et *al.* (2009) et De Marino et *al.* (2012). Ces derniers ont mentionné que l'activité antioxydante exhibée par les extraits éthanoliques de *Teucrium polium* L. *Capitatum* est attribuée à la présence des substances phénoliques telles que la rutine, l'apigénine et les phénylpropanoïdes.

- **Détermination d'IC<sub>50</sub>**

L'IC<sub>50</sub> est inversement proportionnel à la capacité antioxydante d'un composé, parce qu'il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est petite, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

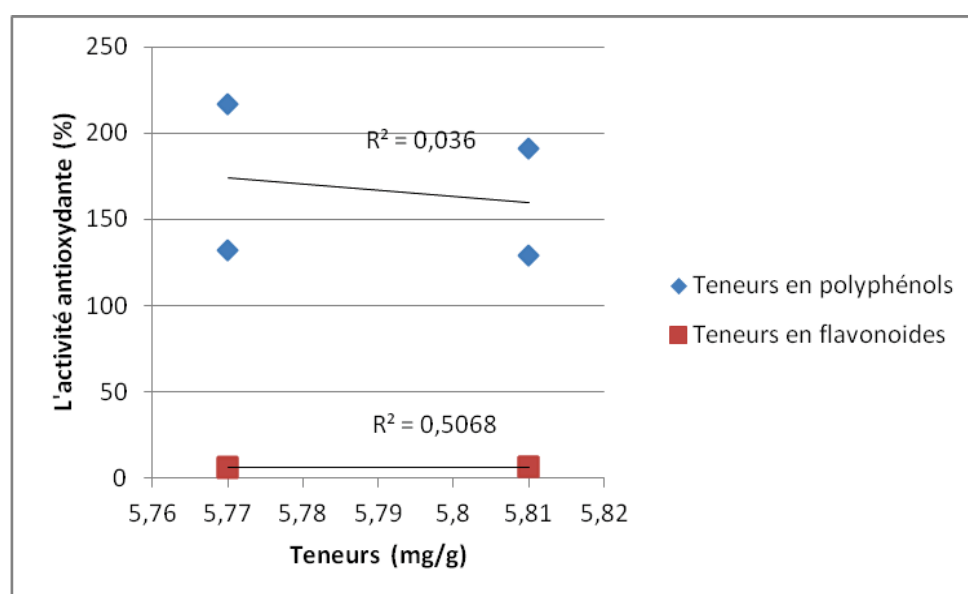
L'extrait éthanolique de la population de Biskra rend le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl stable (diphényl-picrylhydrazine) avec un IC<sub>50</sub> de 2,82 mg/ml montrant une

activité très importante qui est pratiquement semblable à celle de l'acide ascorbique qui ramène la stabilité au DPPH avec un  $IC_{50}$  de  $2.83 \pm 0.044$  mg /ml et en dernier lieu vient l'extrait de la plante de Sétif avec un  $IC_{50}$  de 3.31 mg /ml.

Des études sur la relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir piégeur des radicaux libres ont montré que l'activité antiradiculaire est dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituants sur les cycles B et C (groupements hydroxyles, metaxyles et glycosyles) et le degré de polymérisation (Rice-Evans et *al.*, 1997; Harborne and Williams, 2000). D'autres études ont mentionné que les substances phénoliques, comme les flavonoïdes et les acides phénoliques, sont considérablement plus antioxydants que la vitamine C (Ho et *al.*, 2012; Krinat et *al.*, 2014).

- **Corrélation entre les teneurs (phénols totaux et flavonoïdes) et l'activité antiradiculaire**

Les combinaisons effectuées entre les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes et l'activité antiradiculaire des extraits des plantes étudiées sont illustrées dans la figure 48.



**Figure 48:** Relation entre l'activité antioxydante et les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes

Le fractionnement des composés phénoliques révèle la présence d'une corrélation modérée entre les teneurs en flavonoïdes ( $R^2 = 0.50$ ) et l'activité antiradiculaire. Ces résultats se corroborent aux résultats déjà mentionnés auparavant (Czapecka et *al.*, 2005; Djeridane et *al.*, 2006; Sharififar et *al.*, 2009; De Marino et *al.*, 2012; Sakthidevi et *al.*, 2014).



L'absence d'une forte corrélation entre les paramètres étudiées peut être expliquée par la synergie entre les composés phénoliques d'une part et d'autre part l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration mais aussi de la structure de ces molécules (Rice-Evans et *al.*, 1997).

#### 4. Détermination de l'activité antibactérienne

##### 4.1. Résultats de l'antibiogramme

Les résultats de l'évaluation antimicrobienne des extraits de *Teucrium polium* L. *Capitatum* sont repris au niveau du tableau 24; le diamètre des halos formé par les microorganismes détruits par l'activité antimicrobienne est mesuré en mm.

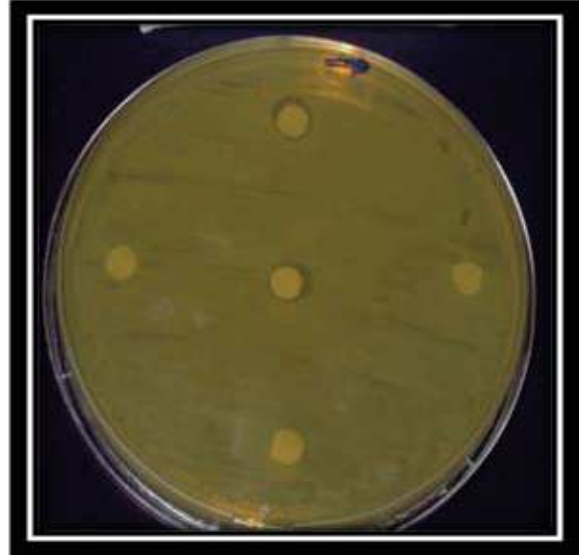
De même, la figure 49 donnent une illustration de la capacité antimicrobienne des extraits vis-à-vis des germes tels que les *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus megaterium*.

**Tableau 24:** Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne par les deux extraits de *Teucrium polium* L. *Capitatum* (en mm)

| Extraits      | Dilutions | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Bacillus megaterium</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
|---------------|-----------|-------------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Sétif</b>  | 1 :1      | 6.66 ± 0.57                   | 7.16 ± 0.70             | 7.33 ± 2.30                | 8.33 ± 2.51                       |
|               | 1 :2      | 6.00 ± 0.00                   | 6.00 ± 0.00             | 6.00 ± 0.00                | 6.00 ± 0.00                       |
|               | 1 :4      | 6.00 ± 0.00                   | 6.00 ± 0.00             | 6.00 ± 0.00                | 6.00 ± 0.00                       |
|               | 1 :8      | 6.00 ± 0.00                   | 6.00 ± 0.00             | 6.00 ± 0.00                | 6.00 ± 0.00                       |
|               | Témoin    | 6.00 ± 0.00                   | 6.66 ± 0.57             | 6.33 ± 0.57                | 6.00 ± 0.00                       |
| <b>Biskra</b> | 1 :1      | 11.0 ± 1.00                   | 10.0 ± 2.64             | 7.00 ± 1.73                | 9.00 ± 4.35                       |
|               | 1 :2      | 6.33 ± 0.57                   | 6.00 ± 0.57             | 6.00 ± 0.00                | 6.00 ± 0.00                       |
|               | 1 :4      | 6.00 ± 0.00                   | 6.00 ± 0.00             | 6.00 ± 0.00                | 6.00 ± 0.00                       |
|               | 1 :8      | 6.00 ± 0.00                   | 6.00 ± 0.00             | 6.00 ± 0.00                | 6.00 ± 0.00                       |
|               | Témoin    | 6.33 ± 0.57                   | 6.00 ± 0.57             | 6.00 ± 0.00                | 6.00 ± 0.00                       |



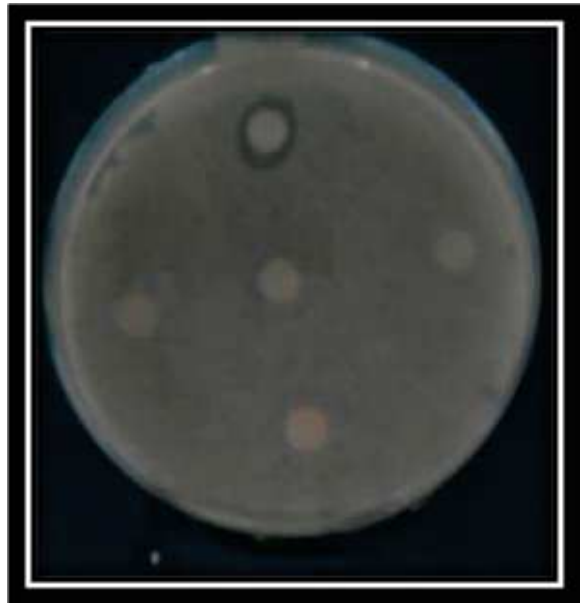
*Pseudomonas aeruginosa*



*Escherichia coli*



*Bacillus megaterium*

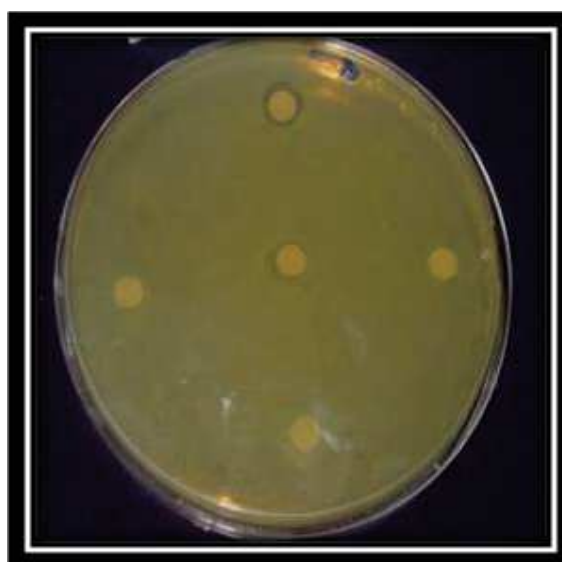


*Staphylococcus epidermidis*

A: Extrait de la population de Biskra



*Pseudomonas aeruginosa*



*Escherichia coli*



*Bacillus megaterium*



*Staphylococcus epidermidis*

**B:** Extrait de la population de Sétif

**Figure 49:** Effet de l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* sur les différentes souches bactériennes testées

L'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* de la plante de Biskra, sur différents germes (Gram (+) et (Gram (-)) par la méthode de l'antibiogramme donne des diamètres qui varient en fonction de la souche testée. Cependant, il est constaté que seule la concentration de la solution mère a présenté un

diamètre d'inhibition supérieure au témoin; tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus megaterium* qui ont montré des zones d'inhibition de 11, 10, 9 et 7 mm respectivement; le test aussi avec l'extrait éthanolique de la plante de Sétif a révélé une sensibilité à la concentration de la solution mère (tableau 24).

L'analyse de la variance a mis en évidence des effets significatifs pour les extraits, dilutions et toutes les interactions, cependant l'effet souche est non significatif (annexe 6.3.1).

La comparaison des moyennes fait apparaître pour l'origine de la plante deux groupes distincts; dont l'extrait de la plante de Biskra montre la plus forte activité antibactérienne. La comparaison des dilutions a révélé aussi la présence de deux groupes; dont la solution mère forme un groupe supérieur par rapport à toutes les autres dilutions (annexe 6.3.3).

La résistance de la souche *Bacillus megaterium* peut être attribuée à sa capacité de diffusion uniforme dans l'agar (Hayouni et al., 2007). De même, la résistance des souches bactériennes: *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* à l'extrait de la plante de Sétif est en relation avec la nature de leurs membranes externes composées de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes (Falleh et al., 2008). D'autre part, certaines études ne révèlent aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis des bactéries Gram (+) ou Gram (-) (Guesmi et Boudabous, 2006).

Il semble d'après ces résultats que la variabilité de l'activité antibactérienne est probablement due à une sensibilité relativement différente des bactéries et/ou la présence d'une sélectivité vis-à-vis les extraits des plantes. Ce qui explique que l'activité antibactérienne varie d'une plante à une autre et d'un germe à l'autre (Yameogo, 2003). Les travaux de Weber et al., (1996), ont indiqué que les composés phénoliques sont reconnus toxiques et auraient pour cible les enveloppes des microorganismes telles que la membrane plasmique et la paroi.

Dans ce contexte, la sensibilité des bactéries est aussi en relation avec le nombre des hydroxyles libres des flavonoïdes. Cowan (1999) supposait que les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus, ce qui conduit à une augmentation de leur affinité chimique aux lipides membranaires, donc on peut supposer que la cible microbienne de ces flavonoïdes testés est la membrane cytoplasmique.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Darabpour et *al.* (2010); Darwish et Aburjai (2010); Belmekki et *al.* (2013) qui ont prouvé que l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. s'est avéré pour montrer un pouvoir antimicrobien acceptable.

#### 4.2. Détermination de la CMI (Concentration minimale inhibitrice)

Après 24 h d'incubation à une température 37°C, les résultats obtenus reflètent une sensibilité des souches *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* uniquement à la concentration 2000 µg/ml des extraits, contrairement aux autres dilutions dont aucun effet antibactérien n'est décelé.

Selon Aligiannis et *al.* (2001), l'activité antimicrobienne est considérée comme forte lorsque les valeurs de CMI sont comprises entre 50 µg/ml et 500 µg/ml, modérée quand elles sont entre 600µg/ml et 1 500 µg/ml et faibles quand elles sont supérieures à 1 500 µg/ml. En accord avec la grande variabilité de leurs compositions chimiques, les composés phénoliques des 2 populations que nous avons testés ont été différenciellement efficaces envers les microorganismes cibles. En basant sur cette classification, les extraits éthanoliques de *Teucrium polium* L. semblent avoir une activité faible sur les souches bactériennes; *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa* (population de Biskra) et *Escherichia coli* (population de Sétif) (figure 50).



*Bacillus megaterium*



*Pseudomonas aeruginosa*

A: Extrait de la population de Biskra



*Escherichia coli*

**B:** Extrait de la population de Sétif

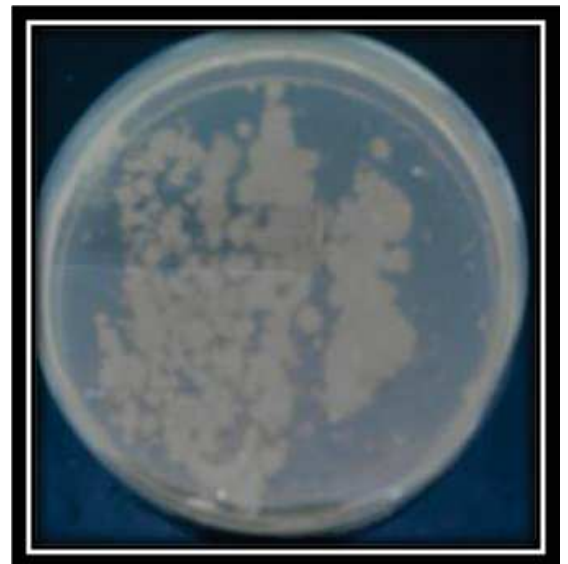
**Figure 50:** Résultats de CMI des produits actifs sur les bactéries

#### 4.3. Détermination de la CMB (Concentration minimale bactéricide)

Les résultats de CMB sont négatifs c'est-à-dire que les extraits éthanoliques des deux plantes ont juste inhibé les bactéries sans les tuées (figure 51).



*Bacillus megaterium*



*Pseudomonas aeruginosa*

**A:** Extrait de la population de Biskra



*Escherichia coli*

**B:** Extrait de la population de Sétif

**Figure 51:** Résultats de CMB des produits actifs sur les bactéries testées

L'effet antimicrobien observé serait alors attribuable à une ou plusieurs molécules actives, présentes en forte ou faible proportion dans les composés phénoliques. De cette façon, différentes combinaisons de plusieurs composés actifs peuvent générer des activités biologiques équivalentes. Ceci est une suggestion intéressante car elle permettrait à des plantes de varier leur composition de composés phénoliques pour s'adapter à diverses contraintes écologiques. Cependant tout cela n'empêche qu'un effet synergique entre plusieurs constituants des polyphénols peut aussi être pris en compte dans cette activité.

## 5. Détermination de l'activité diurétique

### 5.1. Elimination de la surcharge hydrique

Les résultats montrent une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de l'élimination hydrique chez les rats traités par les deux doses d'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* 20 mg /kg et 50 mg/kg, avec une augmentation de la dose dépendante de l'indice diurétique de 1,09 à 1.37 respectivement. Cependant, l'excrétion hydrique en réponse au traitement par le furosémide reste supérieure ( $p < 0,001$ ) par rapport au témoin et aux différents traitements par la plante, avec une augmentation de la dose dépendante de l'indice diurétique de 1,57 (tableau 25) (annexe 4).

**Tableau 25:** Effet de l'administration orale de l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* sur le volume des urines

| Groupe                                  | n | Volume d'urine<br>(ml/100 g/8 h) | indice<br>Diurétique <sup>a</sup> | Valeur de<br>Lipschitz <sup>b</sup> |
|---|---|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Control                                 | 4 | 6.14±0.76                        | -                                 | -                                   |
| Furosémide 20 mg/kg                     | 4 | 9.68±0.49                        | 1.57                              | -                                   |
| <i>Teucrium polium</i> (Et OH) 20 mg/kg | 4 | 6.70±0.09                        | 1.06                              | 0.69                                |
| <i>Teucrium polium</i> (Et OH) 50 mg/kg | 4 | 8.40 ±0.46                       | 1.37                              | 0.87                                |

n : Nombre des individus utilisés dans chaque groupe.

<sup>a</sup> Indice diurétique= volume groupe testé / volume des urines de témoin.

<sup>b</sup> Valeur de Lipschitz = moyenne du volume des urines du témoin / volume d'urine du groupe traité.

La comparaison des moyennes par le test de Newman et Keuls au seuil 1% a révélé que chaque traitement est différent de l'autre par le volume des urines, avec la mise en évidence de 4 groupes homogènes ayant en tête le control positif (9.68 ± 0.49 ml), suivi respectivement de la dose 50 mg/kg , de la dose 20 mg/kg et en dernier lieu le control négatif (respectivement 8.40 ± 0.46 ml, 6.70 ± 0.09 ml, et 6.14 ± 0.76 ml) (annexe 4.1).

Les résultats montrent clairement l'amélioration de l'excrétion rénale de la surcharge en présence de l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* et du furosémide. De plus, ces traitements accélèrent l'élimination de la surcharge hydrique. Des études ont montré que les pertes nettes en NaCl pendant l'administration diurétique régulière sont limitées par la rétention diurétique de NaCl et du liquide rénal (Wilcox et *al.*, 1983).

## 5.2. L'excrétion de Na<sup>+</sup>

La valeur de la natriurèse est plus basse chez les rats témoins par rapport aux rats traités par *T. polium* L. *Capitatum*, mais la différence n'est pas statistiquement significative (tableau 26) (annexe 4).



**Tableau 26:** Effet de l'administration orale de l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* sur l'excrétion des électrolytes urinaires

| Groupe                                  | Na <sup>+</sup><br>(mequiv./100<br>g/8 h) | K <sup>+</sup><br>(mequiv./100<br>g/8 h) | Cl <sup>-</sup><br>(mequiv./100<br>g/8 h) | Index saluretique <sup>a</sup> |      |      | Na/K |
|---|---|--|---|--------------------------------|------|------|------|
|   |   |  |   | Na                             | K    | Cl   |      |
| Contrôle                                | 246.26 ± 45.70                            | 32.47± 2.17                              | 48.13±27.98                               | -                              | -    | -    | 7.58 |
| Furosémide 20 mg/kg                     | 262.56 ± 18.67                            | 115.20± 38.41                            | 361.60±18.98                              | 1.06                           | 3.55 | 1.46 | 2.28 |
| <i>Teucrium polium</i> (Et OH) 20 mg/kg | 300.30 ± 52.65                            | 59.63± 15.82                             | 332.45±69.40                              | 1.22                           | 1.83 | 1.34 | 5.03 |
| <i>Teucrium polium</i> (Et OH) 50 mg/kg | 307.70 ± 55.08                            | 56.50± 21.13                             | 407.50 ±69.97                             | 1.25                           | 1.74 | 1.64 | 5.44 |

Les résultats montrent les valeurs moyennes et les écarts-types; n = nombre des individus utilisés dans chaque groupe.

<sup>a</sup> Index saluretique = mequiv. group testé /mequiv. groupe témoin

Selon Presne et *al.* (2007), les diurétiques de l'anse (essentiellement furosémide) agissent essentiellement en bloquant le cotransporteur NaK<sub>2</sub>Cl situé sur la membrane apicale des cellules de la branche ascendante large de Henlé. Environ 20–25 % du sodium filtré étant réabsorbé à ce niveau et seulement 7–9 % par les segments plus distaux du tubule; les diurétiques de l'anse à dose maximale sont les plus efficaces.

### 5.3. L'excrétion de K<sup>+</sup>

L'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* et le furosémide ont entraîné une augmentation significative de l'excrétion de K<sup>+</sup> par rapport au témoin. En effet, l'excrétion potassique en réponse au traitement au furosémide, rapportée sur le tableau 26 et annexe 4, montre une augmentation importante de la kaliurèse par rapport aux animaux ayant reçu l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum*, qui n'est que légèrement kaliurétique.

Le test de Newman et Keuls au seuil 5% affiche 3 groupes qui se distinguent par différente kaliurèse, en tête le control négatif et la dose 50 mg/kg avec les plus faibles valeurs (32.47 ± 2.17 et 56.50 ± 21.13 mequiv. respectivement), vient en deuxième lieu le furosémide avec 115.20 ± 38.41 mequiv. et en dernier la dose 20 mg/kg avec 59.63± 15.82 mequiv. (annexe 4.1).

Il est à noter que, l'hypokaliémie est propre aux diurétiques de l'anse, en raison de l'augmentation du débit de sodium arrivant au niveau du collecteur, où s'effectue la réabsorption d'un  $\text{Na}^+$  contre une sécrétion d'un  $\text{K}^+$  (Presne et *al.*, 2007). En plus, la réduction de l'excrétion de potassium a été montrée par l'index salidiurétique avec une valeur de 1,74 pour la dose de 50 mg/kg (1,83 pour la dose de 20 mg/kg et de 3,55 pour le furosémide).

Les valeurs 5,03 et 5,44 du rapport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ont été obtenus par les doses de 20 et 50 mg/kg respectivement. L'augmentation des rapports de la concentration des ions excrétés indiquent que les extraits de *Teucrium polium* L. *Capitatum* augmentent l'excrétion de l'ion sodium par rapport au potassium, ce qui révèle l'effet de conservation de K par l'extrait éthanolique.

La concentration d'aldostérone est jugé en fonction du rapport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . L'aldostérone favorise l'excrétion du potassium par ses effets sur la pompe  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase et les canaux épithéliales de sodium et de potassium du tube cortical collecteur (CCD) (Mc Kenna et *al.*, 1978). Cependant, cet effet peut être attribué aussi à l'inhibition de la réabsorption de l'eau et des anions par les tubules rénaux (Pantoja et *al.*, 1993), ou à la stimulation de la production du débit sanguin rénal (Stanic and Samarzija, 1993).

#### 5.4. L'excrétion de $\text{Cl}^-$

L'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* et le furosémide ont entraîné une augmentation significative de l'excrétion du  $\text{Cl}^-$  ( $P < 0,001$ ) par rapport au témoin. En effet, l'excrétion de  $\text{Cl}^-$  en réponse au traitement par la dose 50 mg/kg de l'extrait, indique une augmentation importante de la chlorurèse par rapport aux animaux ayant reçu le furosémide (tableau 26).

La comparaison des moyennes par le test de Newman et Keuls au seuil 5% met en première place le contrôle négatif avec  $248.13 \pm 27.98$  mequiv, suivi du deuxième groupe composé de la dose 20 mg/kg  $332.45 \pm 69.40$  mequiv. et en dernier lieu par les traitements 50 mg/kg et le furosémide avec  $361.60 \pm 18.98$  mequiv. et  $407.50 \pm 69.97$  mequiv. respectivement (annexe 4.1).

Les résultats indiquent que la sécrétion du potassium est co-dépendante à la sécrétion de  $\text{Cl}^-$ . Selon Weiner and Wingo (1997), la cellule  $\beta$  du tube cortical collecteur montre un couplage d'échange entre le  $\text{H}^+ - \text{K}^+$  ATPase et le  $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$  qui peuvent fournir un nouveau modèle de réabsorption actif de KCl.

Le criblage phytochimique préliminaire montre que l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* contient plusieurs composés chimiques (les flavonoïdes, les glycosides, les saponosides et les terpènes) qui pourraient être tous ensemble ou en partie responsables de l'augmentation de la diurèse et de l'activité natriurétique. Selon Chodera et *al.* (1991) les composés polaires peuvent être responsables des effets diurétiques.

Les substances polyphénoliques sont aussi reconnues pour leurs propriétés veinotoniques et vasculoprotectrices qui pourraient être bénéfiques dans la prévention des atteintes vasculaires susceptibles de survenir chez l'hypertendu.

## **Conclusion générale et perspectives**

## *Conclusion générale et perspectives*

---

Ce travail de recherche aux seins des populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum* dans l'écosystème steppique de l'Est algérien avait pour objectif, d'une part, d'apprécier les diversités morphologique et biochimique existantes et, d'autre part, la mise en évidence des propriétés biologiques de l'espèce.

Un double objectif a été tracé pour l'étude morphologique des trichomes; le premier est d'évaluer la diversité des trichomes dans les différentes populations étudiées, et le second portait sur l'influence du milieu sur la longueur des trichomes que l'on a observé par microscope photonique.

Il ressort de cette étude, dix types de trichomes trouvés chez toutes les populations examinées de *Teucrium polium* L. *Capitatum*. Les feuilles ont le plus faible nombre de types de poils (cinq sur dix), suivies par les calices et les corolles avec huit types.

Selon les résultats trouvés de la longueur des trichomes courts et longs chez les feuilles et les calices, il s'avère que l'environnement pourrait avoir une influence beaucoup plus grande sur la longueur des trichomes que sur leur forme (confirmés par des tests statistiques).

L'analyse électrophorétique des protéines totales par la technique SDS-PAGE a révélé 23 bandes polymorphes, qui ont généré dix phénotypes. Les bandes sont réparties sur trois zones: lente, intermédiaire et rapide, elles correspondent probablement à des loci; la zone lente comprend 9 électromorphes, les bandes à mobilité lente ont été trouvés dans pratiquement toutes les régions à l'exception de Constantine et Mila. Elle peut constituer un marqueur, spécifique à ces régions. La zone intermédiaire est composée de quatre bandes électromorphiques, possédant une mobilité relative variant de 59 à 50%. Ces bandes sont présentes dans pratiquement toutes les régions. L'ensemble des populations présente une uniformité pour les bandes à mobilité lente, leur zone est constituée de dix bandes, leur mobilité relative varie de 41.5 à 19%.

Dans la partie de diversité, le calcul des indices de similarité et l'établissement des diagrammes types des populations ont été effectués grâce à la diversité des profils électrophorétiques des protéines. Les valeurs des indices de ressemblance et les phénogrammes confirment les relations intraspécifiques entre les différentes populations de *Teucrium polium* L. *Capitatum*.

## *Conclusion générale et perspectives*

---

Par ailleurs, la comparaison des données physio-biochimiques obtenues à partir des trois phénotypes de la population *Teucrium polium* L. *Capitatum*; selon leurs biotopes de la station de Sidi Rghiss à Oum El Bouaghi, a démontré que les plus fortes teneurs en anthocyanes et sucres solubles se retrouvent dans les extraits provenant des phénotypes mauves, suivi par les phénotypes roses et puis les phénotypes blancs. Les teneurs en caroténoïdes et les rapports carot/ chlo tot sont plus constants chez les différents phénotypes analysés. Dans ce contexte, on peut dire que les régulations positive et négative des pigments anthocyaniques par la lumière et les sucres ont des implications physiologiques importantes. Ce mécanisme semble donc faire partie de la mise en place d'une réponse adaptative de la plante face à une modification durable de son environnement.

La détermination structurale des molécules isolées a été réalisée par spectroscopie UV-visible en utilisant différents réactifs qui provoquent des déplacements du spectre méthanolique. En coopération avec les résultats de l'CLHP. Les molécules supposées sont : la cyanidine, la quercétine et l'acide caféique.

Les résultats des dosages des polyphénols et des flavonoïdes indiquent que l'extrait de Biskra, comparé à celui de Sétif, montrent des teneurs plus élevée.

Le troisième aspect est de nature biologique, il a été mis en évidence par différents tests : antioxydant, antibactérien et diurétique.

Les potentialités antioxydantes des différents extraits éthanolique évaluées par le piégeage directe des radicaux libres par la méthode du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur du fer (FRAP) ont montré que :

- A une concentration de 2 mg/ml des extraits, les pourcentages d'inhibition des plantes de Biskra et de Sétif sont respectivement 64.46% et 23.32% de piégeage du radical DPPH•. La concentration IC<sub>50</sub> des échantillons de Biskra présente une bonne activité du piégeage du radical DPPH• de l'ordre de 2.82 mg/ml par rapport à l'acide ascorbique et les échantillons de Sétif respectivement 2.83 et 3.31 mg/ml.
- La réduction du fer a montrée des pouvoirs réducteurs équivalents des extraits bruts de *Teucrium polium* L. *Capitatum* des échantillons de Biskra et de Sétif avec des concentrations IC<sub>50</sub> moins importants respectivement de l'ordre de 0.954 ± 0.30 et 1.079 ± 0.196 mg/ml.

## *Conclusion générale et perspectives*

---

La corrélation positive et modérée (50 - 66 %) obtenue entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en polyphénols totaux montre la contribution des antioxydants de la plante qui peuvent être des flavonoïdes ou autres polyphénols.

Les tests antibactériens de quelques germes pathogènes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium* et *Staphylococcus epidermidis*), avec nos extraits ont montré que les deux populations réagissent différemment vis à vis des espèces bactériennes testées.

Les résultats des effets diurétiques de l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L. *Capitatum* utilisé sur les rats en comparaison avec un diurétique pharmacologique de synthèse (furosémide) ont révélé que l'extrait brut de *Teucrium polium* accélère l'élimination de la surcharge hydrique, avec une excrétion sodique modérée, et une élévation importante de la kaliurèse et la chlorurèse.

Au terme de cette étude, il est intéressant de retenir que :

- i. Vu la grande diversité des trichomes, d'autres recherches comparatives sont nécessaires en criblant des corrélations possibles entre les trichomes et d'autres paramètres, tels que le rendement en huile essentielle des différents organes pour une même espèce récoltée au même stade et dans un même biotope.
- ii. Etude de la diversité génétique du genre *Teucrium* en Algérie par le biais des marqueurs moléculaires tels que: RADP, RFLP, microsatellites, etc.
- iii. L'originalité des résultats obtenus dans l'étude physio-biochimique a permis de mettre en évidence l'importance d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans les réactions de l'accumulation des anthocyanes tels que la carence en éléments nutritifs (l'azote et le phosphore). Ces résultats seront utilisés ultérieurement pour explorer le mécanisme moléculaire de l'adaptation de la plante aux stress abiotiques.
- iv. Il est de même que l'étude des stress thermique, lumineux et minéraux appliqués, étudiés séparément ou associée pourrait permettre de mettre à jour les effets combinatoires ou antagoniques de ces stress dans l'accumulation des principes actifs de la plante in vitro.

## *Conclusion générale et perspectives*

---

- v. Pour la suite, il serait intéressant, de voir le mode d'action des dérivés polyphénoliques en évaluant *in vitro* et *in vivo* l'activité antioxydante de chacun des composés phénoliques pris séparément. Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits de plante et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénoliques.



## **Références bibliographiques**

### A

- **Adebooye O.C., Hunsche M., Noga G., Lankes C. 2012.** Morphology and density of trichomes and stomata of *Trichosanthes cucumerina* (Cucurbitaceae) as affected by leaf age and salinity. *Turk. J. Bot.*, 36: 328-335
- **Abu-Asab M.S., and Cantino P.D., 1987.** Phylogenetic implications of leaf anatomy in subtribe Melittidinae (Labiatae) and related taxa. *J. Arnold Arbor.*, 68: 1–34. In: Osman A.K., 2012. Trichome micromorphology of Egyptian ballota (Lamiaceae) with emphasis on its systematic implication. *Pak. J. Bot.*, 44(1): 33-46
- **Abule E., Snyman H.A. and Smit G.N. 2007.** Rangeland evaluation in the Middle Awash valley of Ethiopia: III. Relationships among soil and vegetation variables. *Journal of Arid environments*, 70: 293-303.
- **Afolayan A.J., Meyer J.J.M., 1995.** Morphology and ultrastructure of secreting and nonsecreting foliar trichomes of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). *Int. J. Plant Sci.*, 156(4): 481- 487
- **A.F.N.O.R., 1990.** Granulats, analyse granulométrique par tamisage. Norme P18-560.
- **Agrawal A.A., Conner J.K., Stinchcombe J.R., 2004.** Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecol. Lett.*, 7:1199–1208
- **Aharoni A., Jongsma M.A., Kim T., Ri M., Giri A.P., Verstappen F.W.A., Schwab W. Bouwmeester H.J., 2006.** Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochem. Rev.*, 5: 49–58.
- **Ahmad K.J., 1974.** Cuticular and epidermal structures in some species of *Eranthemum* and *Pseuderanthemum* (Acanthaceae). *Bot. Not.*, 127: 256-266. In: Osman A.K., 2012. Trichome micromorphology of Egyptian ballota (Lamiaceae) with emphasis on its systematic implication. *Pak. J. Bot.*, 44(1): 33-46
- **Ahmad K.J., 1978.** Epidermal hairs of Acanthaceae. *Blumea* 24, 101–117. Anthony, J., 1927. A description of some Asiatic phanerogams. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh*, 15: 239-246. In: Xiang C.-L., Dong Z.-H., Peng H., Liu Z.-W., 2010. Trichome micromorphology of the East Asiatic genus *Chelonopsis* (Lamiaceae) and its systematic implications. *Flora* 205 (2010) 434–441

## Références bibliographiques

---

- Albert N.W., Lewis D.H., Zhang H., Irving L.J., Jameson P.E. and Davies K.M., 2009. Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *Journal of Experimental Botany*, 60 (7): 2191–2202.
- Aliero A.A., Afolayan A.J., Grierson D.S., 2005. The foliar micromorphology of *Solanum pseudocapsicum*. *Flora*, 201: 326-330.
- Aliero A.A., Grierson D.S., Afolayan A.J., 2006. The foliar micromorphology of *Solanum pseudocapsicum*. *Flora*, 201: 326-330.
- Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., Chinou I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 4168-4170.
- Allagui M.B., Saadoun M., and Jlassi Y., 2013. Investigation of the genetic association between stem trichomes and resistance to the pathogen *Phytophthora nicotianae* in *Capsicum annuum* CM334 pepper cultivar. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 8: 65-73
- Andersen O. M., Jordheim M., 2006. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications, Andersen O. M. and Markham K. R., CRC Press, Boca Raton: 472-522.
- Antunes T., and Sevinate-Pinto I., 1991. Glandular trichomes of *Teucrium scorodonia* L.: Morphology and histochemistry. *Flora*, 185: 65–70. In: Serrato-Valenti G., Bisio A., Cornara L. and Ciarallo G., 1997. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany* 79: 329-336.
- Apel K., and Hirt H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399
- Ardi R., Kobiler I., Jacoby B., Keen N.T., Prusky D., 1998. Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53: 269-285
- Arnold N., Bellomaria B., 1993. Observations morphoanatomiques et histochimiques dans les *Salvia willeana* (Holmboe) Hedge et *Salvia fruticosa* Mill. De Chypre. *Flora Medit.*, 3, 287-297.
- Aron P., Kennedy J., 2008. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1):79–104.
- Ascensão L., Pais M.S.S., 1987. Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. Maritima): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Int. J. Plant Sci.*, 148(2): 221–227

## Références bibliographiques

---

- Ascensão L., and Pais M.S., 1998. The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Ann. Bot.*, 81: 263–271.
- Ascensão L., Mota L., and Casteo D.E.M., 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Ann. Bot.*, 84: 437–447
- Ashafa A.O.T., Grierson D.S., Afolayan A.J., 2008. Foliar micromorphology of *Felicia muricata* Thunb., A South African Medicinal Plant. *Pak. J. Biol.Sci.*, 11: 1713-1717
- Autore G., Capasso F., De Fusco R., Fasulo M.P., Lembo M. , Mascolo N., Menghini A., 1984. Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* L. *Pharmacol. Res. Commun.*, 1:16. In: Rasekh H. R., Yazdanpanah H., Hosseinzadeh L., Bazmohammadi N. and Kamalinejad M., 2005. Acute and subchronic toxicity of *Teucrium polium* total extract in rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 4: 245-249
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteit H., 1992. Bactériologie clinique. Ellipses 2<sup>ème</sup> édition, Paris: 151- 157
- Awad MA., De Jager A., 2002. Relationship between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in Elstar apple skin. *Scientia horticulture*, 92: 265-276
- Ayoola G.A., Ipav S.S., Solidiya M.O., Adepoju-Bello A.A., Coker H.A.B., Odugbemi T.O., 2008. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv (Guttiferae). *J. Int. J. health Res.*, 1(2):81-93

## B

- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J., Das D.K., Ray S.D., Kuszynski C.A., Joshi S.S., Pruess H.G., 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148(2-3): 187-197
- Bahramikia S. and Yazdanparast R., 2012. Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*, 26 (11): 1581–1593
- Baize D., and Jabiol B., 1995. Guide pour la description des sols: techniques et pratiques. INRA. Paris, 375 p.
- Baize D., 2000. Guide des analyses en pédologie. 2ème édition revue et augmentée. INRA. Paris, 257 p.
- Basu A., Rhone M., Lyons, T.J., 2010. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*, 68(3): 168-177

## Références bibliographiques

---

- Bayer E., Buttler K.P., Finkenzeller X. and Grau J., 1990. Guide de la flore méditerranéenne. Delachaux et Niestlé, Paris. Pp.156-157
- Békro Y.A., Békro J.A.M., Boua B.B., Tra B.F.H., Ehilé E.E., 2007. Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) (Caesalpiniaceae). *Rev.Sci. Nat.*, 4: 217-225.
- Belmekki N., Bendimerad N., Bekhechi C., Fernandez X., 2013. Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(14): 897-902
- Benabadji N., Bouazza M., Metge G. and Loisel R., 1996. Description et aspect des sols en région semi-aride et aride au Sud de Sebdou (Oranie-Algérie). *Bull. Inst. Sci.*, 20: 77-86
- Benabdellah M., Amrani S.M., Elhaitoum A. et Ollier S., 2010. Analyse phytoécologique des groupements à thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters) et à chêne vert (*Quercus rotundifolia* Lam.) dans les monts de Tlemcen (Algérie occidentale). *Ecologia mediterranea*, 36(2): 97-115
- Benz B.W., Martin C.E., 2006. Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in the species of epiphytic *Tillandsia* (Bromeliaceae). *J. Plant Physiol.*, 163: 648–656
- Bigham M., Hosseinaveh V., Nabavi B., Talebi Kh., Esmaeilzadeh N.S., 2010. Effects of essential oil from *Teucrium polium* on some digestive enzyme activities of *Musca domestica*. *Entomol. Res.*, 40, 37– 45
- Bongue-Bartelsman M., Phillips D.A., 1995. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 33, 539–546
- Bonneau M., and Souchier B., 1994. Constituants et propriétés du sol. Masson, Paris, 665 p.
- Bourett T.M., Howar R.J., Okeefe D.P., Hallahan D.L., 1994. Gland development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*. *Intern. J. Plant Sci.*, 155, 623-632.
- Bosabalidis A.M., Tsekos I., 1982a. Ultrastructure of the essential secretion in glandular scales of *Origanum dictamnus* L. leaves. In: Margaris N., Koedam A., Vokou D. Aromatic plants: basic and applied aspects. (eds), Martinus Nijhoff Publishers, The Hague: 3-12.
- Bosabalidis A.M., Tsekos I., 1982b. Glandular scale development and essential oil secretion in *Origanum dictamnus* L. *Planta*, 156(6): 496-504.
- Bosabalidis A.M., Skoula M., 1998. A comparative study of the glandular trichomes on the upper and lower leaf surfaces of *Origanum × intercedens* Res. *J. Essent. Oil Res.*, 10: 277-286

## Références bibliographiques

---

- **Bosabalidis A.M., 2013.** Glandular and non-glandular hairs in the winter and summer leaves of the seasonally dimorphic *Teucrium polium* (Lamiaceae). *Biharean Biologist*, 7 (2): 80-85.
- **Boss P.K., Davies C., 2001.** Molecular biology of sugar and anthocyanin accumulation in grape berries. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed.), molecular biology and biotechnology of the grapevine, Kluwer Academic Publishers, Netherlands:1-33
- **Bourett T.M., Howard R.J., O’Keefe D.P., Hallahan D.L., 1994.** Gland development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*. *Int. J. Plant. Sci.*, 155: 623–632.
- **Bünemann E.K., Bossio D.A., Smithson P.C., Frossard E. et überson A., 2004.** Microbial community composition and substrate use in a highly weathered soil as affected by crop rotation and P fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(6): 889-901.
- **Brady N.C. and Weil R.R., 2002.** The nature and properties of soils. 13th ed. Upper Saddle River, NJ, USA: Pearson Education Inc.
- **Braithwaite A., Smith F. J., 1999.** Chromatographic Methods. 5ème Ed Kluwer Academic Publishers. London. 548 p.
- **Broadhurst C.L., Chaney R.L., Angle J.S., Mangel T.K., Erbe E.F., Murphy C.A., 2004.** Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. *Environ. Sci. Technol.*, 38:5797-5802
- **Brouillard R., Delaporte B., 1977a.** Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *J. Am. Chem. Soc.*, 99(26): 8461-8468. In: Monica Jordheim, 2007. Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms. Department of Chemistry. University of Bergen. 108p.
- **Brouillard R., Dubois J.E., 1977b.** Mechanism of structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.*, 99:1359-1364. In: Monica Jordheim, 2007. Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms. Department of Chemistry. University of Bergen. 108p.
- **Brouillard R., 1993.** The Flavonoids, Advances in research since 1986. Ed J. B. Harborne. Chapman and Hall, London. In: Shiono M., Matsugaki N., and Takeda K., 2008. Structure of commelinin, a blue complex pigment from the blue flowers of *Commelina communis*. *Proc. Jpn. Acad. Ser B Phys Biol Sci.*, 84(10): 452–456

### C

- **Caddick L.R., Rudall P.J., Wilkin P., Hedderson T.A.J., and Chase M.W., 2002.** Phylogenetics of dioscoreales based on combined analyses of morphological and molecular data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 138: 123–144.
- **Cantrell C.L., Duke S.O., Fronczek F.R., Osbrink W.L.A., Mamonov L.K., Vassilyev J.I., Weste D.E., Dayan F.E. 2007.** Phytotoxic Eremophilanes from *Ligularia macrophylla*. *J. Agric. Food. Chem.*, 26:10656–10663
- **Cantino P.D., 1990.** The phylogenetic significance of stomata and trichomes in the Labiatae and Verbenaceae. *J. Arnold Arbor.*, 71: 323-370. In: Osman A.K., 2012. Trichome of micromorphology of Egyptian *Ballota* (Lamiaceae) with emphasis on its systematic implication. *Pak. J. Bot.*, 44(1): 33-46.
- **Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargues R., 1987.** Bactériologies médicales: techniques usuelles. Edition S.I.M.E.P. (2<sup>ème</sup> tirage), Paris, 105-108
- **Castellarin S.D., Gaspero D.G., 2007.** Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology*, 7:46. doi:10.1186/1471-2229
- **Celep F., Kahraman A., Atalay Z., Dogan M., 2011.** Morphology, anatomy and trichome properties of *Lamium truncatum* Boiss. (Lamiaceae) and their systematic implications. *Australian J. Crop. Sci.*, 5: 147-153.
- **Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K.H.C., 2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, 100: 553-559.
- **Cerovic Z.G., Ounis A., Cartelat A., Latouche G., Goulas Y., Meyer S., Moya I., 2002.** The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell and Environment*, 25: 1663–1676.
- **Chalker-Scott L., 1999.** Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*, 70: 1–9.
- **Chambers H.F., 1997.** Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 781-791. *Eur. J. Org. Chem.*, 15: 2438- 2448

## Références bibliographiques

---

- **Chitturi S. and Farrell G.C., 2008.** Hepatotoxic slimming aids and other herbal hepatotoxins. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23 (3): 366–373
- **Chodera A., Dabrowska K., Sloderbach A., Skrzypczak L., Budzianowski J., 1991.** Effect of flavonoid fractions of *Solidago virgaurea L.* on diuresis and levels of electrolytes. *Acta pol. pharm.*, 48:35-37
- **Choi Y.E., Harada E., Wada M., Tsuboi H., Morita Y., Kusano T., Sano H., 2001.** Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta*, 213:45-50
- **Choinski J.S., Wise R.R., 1999.** Leaf growth and development in relation to gas exchange in *Quercus marilandica* Muenchh. *J. Plant Physiol.*, 154:302–309
- **Christie P.J., Alfenito M.R., Walbot V., 1994.** Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways - enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 194: 541-549
- **Clarck R.J., Hamilton J.G.G., Chapman J.V., Rhodes M.J.C., Hallanhan D.L., 1997.** Analysis of monoterpenoids in glandular trichomes of catmint *Nepeta racemosa*. *Plant J.*, 11: 1387–1393
- **Close D.C., Davies N.W., Beadle C.L., 2001.** Temporal variation of tannins (galloylglucoses), flavonols and anthocyanins in leaves of *Eucalyptus nitens* seedlings: implications for light attenuation and antioxidant activities. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 269-278
- **Cook N.C., Samman S., 1996.** Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7: 66
- **Cooley H.S., Robinson H.S., Wielgus R.B., Lambert C.D., 2008.** Cougar prey selection in a white-tailed deer and mule deer community. *Journal of Wildlife Management*, 72: 99–106
- **Corsil G., Bottega S., 1999.** Glandular Hairs of *Salvia officinalis*: New data on morphology, localization and histochemistry in relation to function. *Ann. Bot.*, 84: 657–664
- **Costa-Arbulu C., Ganoli E., Gonzalez W.L., Niemeyer H.M., 2001.** Feeding by the aphid *Sipha flava* produces a reddish spot on leaves of *Sorghum halepense*: An induced response?. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 271–281
- **Coste H., Flahault C.H., 1980.** Flore descriptive et illustrée de la France de la corse et des contrées limitrophes. Tome III, 2<sup>ème</sup> édition, Scientifique et Technique, Paris, 139-140.
- **Courvalin P., Flandrois J.P., Goldstein F., Philippon A., Quentin C., Sirot J., 1988.** L'antibiogramme automatisé. M.P.C./Vigot, Paris, Bruxelles, 276 p.



## Références bibliographiques

---

- **Cowan M. M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4): 564-570
- **Cozzani V., Gubinelli G., Salzano E., 2005.** Criteria for the escalation of fires and explosions. In: Proceedings of the 7th Process Plant Safety Symposium, American Institute of Chemical Engineers, New York, NY, p. 225.
- **Cressey P.J., Macgibbon D.G. and Grama A., 1987.** Hexaploid wild emmer wheat derivatives grown under New Zealand conditions 3. Influence of nitrogenfertilization and stage of grain development on protein composition. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30(1): 53-58
- **Croteau R., Johnson M.A., 1984.** Biosynthesis of terpenoids in glandular trichomes. In: Rodriguez E., Healy P.L., Mehta I., Biology and chemistry of plant trichomes. Plenum Publishing Co., New York, 133-185. In: Liu M.-Q., Liu J.-F., 2012. Structure and histochemistry of the glandular trichomes on the leaves of *Isodon rubescens* (Lamiaceae). *African Journal of Biotechnology*, 11(17): 4069-4078
- **Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N., 2009.** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability, and effect on health. *Nat. Prod. Rep.*, 26: 1001-1043
- **Czapecka E., Mareczek A., and Leja M., 2005.** Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93, 223–226.

## D

- **Dabena H., 1997.** Infectiologie de A à Z. Ed. Arnette, France, 500-502.
- **Darabpour E., Motamedi H., Mansour S., Nejad S., 2010.** Antimicrobial properties of *Teucrium polium* L. against some clinical pathogens. *Asian pacific journal of tropical medicine*, 3(2): 124-127
- **Darwish R.M., Aburjai T.A., 2010.** Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on *Escherichia coli*. *Complementary and Alternative Medicine*, 10:1-9.
- **Das P.K., Geul B., Choi S.B., Yoo S.D., Park Y.I., 2011.** Photosynthesis-dependent anthocyanin pigmentation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*, 6(1): 23-25.
- **Debeaujon I., Peeters A.J.M., Leon-Kloosterziel K.M., Koornneef M., 2001.** The transparent testa 12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like

## Références bibliographiques

---

- protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell*, 13: 853-872
- **Dedio W., Kaltsikes P.J., Larter E.N., 1969.** Numerical chemo taxonomy in the genus *Secale*. *Can. J.Bot*: 1175-1180
- **Deikman J., Hammer P., 1995.** Induction of anthocyanin accukinin signaling would lead to drastic morphological mutation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.*, 108: 47–57. In: Vogel J.P., Schuerman P., Woeste K., Brandstatter I., Kieber J.J., 1998. Isolation and Characterization of *Arabidopsis* Mutants Defective in the Induction of Ethylene Biosynthesis by Cytokinin. *Genetics*, 149: 417–427.
- **Delgado R., Martin P., Del Alano M., Gonzales MR., 2004.** Changes in phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilization rates. *Journal of the science of food and agriculture*, 84:623-630.
- **Debuigne G., 1972.** Dictionnaire des plantes qui guérissent. Librairie Larousse. Pp.130
- **De Bruyne T., Pieters L., Deelstra H., Vlietinck A.J., 1999.** Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol.*, 4(27): 445-459.
- **De Marino S., Festa C., Zollo F., Incollingo F., Raimo G., Evangelista G., Iorizzi M., 2012.** Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC –SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *Food Chem.*, 133, 21–28
- Dermech Kh., Karouani M., El Belkhi, M., 1982.** L’essentiel en Pédologie. Direction des Publications Universitaires, Haleb, Syrie
- **Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F., 1999.** Flavonoids : old and new aspects of a class of naturel therapeutic drugs. *Life Sci.*, 65 (4): 337-353
- **Dinc M., Duran A., Pinar M., Öztürk M., 2008.** Anatomy, palynology and nutlet micromorphology of Turkish endemic *Teucrium sandrasicum* (Lamiaceae). *Biologia*, 63(5): 637—641
- **Dinc M., Dögu S., Koca A.D., Kaya B., 2011.** Anatomical and nutlet differentiation between *Teucrium montanum* and *T. polium* from Turkey. *Biologia*, 66(3): 448-453
- **Dixon D.P., Laphorn A., Edwards R., 2002.** Plant glutathione transferases. *Genome Biol.*, 3(3): 3004.1 – 3004.10
- **Dixon R.A., Xie D.Y., Sharma S.B., 2005.** Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research?. *New Phytologist*, 165: 9-28
- **Djabou N., Muselli A., Allali H., Dib M. E. A., Tabti B., Varesi L., Costa J., 2012.** Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, 83: 51-62.

## Références bibliographiques

---

- **Djebaili S., 1984.** Steppes algériennes, phytosociologie et ecologie. OPU., 177p. In : Neffar S., Beddiar A., Redjel N., et Boulkheloua J., 2011. Effets de l'âge des plantations de figuier de Barbarie sur les propriétés du sol et la végétation (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) à Tébessa (zone semi-aride de l'est Algérien). *Ecologia Mediterranea*, 37 (1): 5-15
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., and Vidal N. 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660
- **Downey M.O., Dokoozlian N.K., Krstic M.P., 2006.** Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57:257-268.
- **Dramane S., 2010.** Evaluation des activités antimicrobiennes et antiradicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire. *Euro Journal of Scientific Research*, 40 (2): 307-317.
- **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956.** Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356. In: Feller C., Jeanson P., Giummelly P., Bonaly P., 1991. Comparaison de différentes méthodes d'hydrolyse acide en vue du dosage des glucides totaux dans les sols. *Science du sol*, 29 (1):13-22.
- **Duchauffour P., 1997.** Abrégé de pédologie. Sol, végétation, environnement. 5ième Edit. Masson. 291p.
- **Duke S.O., Canel C., Rimando A.M., Tellez M.R., Duke M.V., Paul R.N., 2000a.** Current and potential exploitation of plant glandular trichome productivity. *Adv. Bot. Res.*, 31, 121–151.
- **Duke S.O., Dayan F.E., Romagni J.G., Rimando A.M., 2000b.** Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed. Res.*, 40: 99-111.
- **Dumas Y., Suriaga Quijada J., Bonafons M., 1993.** Influence of nitrogen availability on growth and development of tomato plants until fruit-setting. Optimization of plant nutrition: refereed papers from the eighth international colloquium for the optimization of plant nutrition, 31 august 8 September 1992, Lisbon, Portugal. In: Al-Mohammadi F., and Al-Zu'bi Y., 2011. Soil chemical properties and yield of tomato as influenced by different Levels of irrigation water and fertilizer. *J. Agr. Sci. Tech.*, 13: 289-299
- **Dupont F.M., Hurkman W.J., Vensel W.H., Tanaka C., Kothari K.M., Chung O.K., Altenbach S.B., 2006.** Protein accumulation and composition in wheat grains: Effects of mineral nutrients and high temperature. *Europ. J. Agronomy*, 25: 96–107

## Références bibliographiques

---

- Dyubeni L., Buwa L.V., 2012. Foliar micromorphology of *Salvia greggii* A. Gray (Lamiaceae). *African Journal of Plant Science*, 6(1): 32-38.

### E

- El Beyrouthy M., Arnold N., Delelis-Dusollier A., Dupont F. et De Foucault B., 2008. Morphologie du trichome des *Teucrium* du Liban. *Acta Bot. Gallica*, 155 (4) : 563-576.

- El Beyrouthy M., Arnold-Apostolides N., Dupont F., 2009. Trichomes morphology of six Lebanese species of *Stachys* (Lamiaceae). *Flora Mediterranea*, 19: 129-139

- Elias T.S., Newcombe L.F., 1979. Foliar nectarines and glandular trichomes in *Catalpa* (Bignoniaceae). *Acta. Bot.Sin.*, 21: 215-224. In : Mehrabian A.R., Sheidai M. and Mozaffarian V., 2014. Micromorphology of leaf trichomes in *Onosma* (Boraginaceae) and their systematic relevance in Iran. *Phytologia Balcanica*, 20 (1): 33 – 48

- Elmasri W.A., Hegazy M.E.F., Aziz M., Koksal E., Amor W., Mechref Y., Hamood A.N., Cordes D.B., Paré P.W., 2014. Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*, 103: 107-113

- Elmasri W.A., Hegazy M.E.F., Mechref Y., Paré P.W., 2016. Structure-antioxidant and anti-tumor activity of *Teucrium polium* phytochemicals. *Phytochemistry Letters*, 15: 81-87

- El Oualidi J., Puech S., 1993. Quelques marqueurs morphologiques des *Teucrium* section *Polium* (Lamiaceae) du Maroc. Valeurs diagnostiques différents niveaux d'intégration. *Acta Botanica Malacitana*, 18: 163-171

- Erdtman G., 1960. The acetolysate method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 54(4): 561-564.

- Ericsson H.M., Sherris J.C., 1971. Antimicrobial susceptibility testing-Report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B. Suppl.*, 217, 1-90. In: Shafi M.S. 1975. Determination of antimicrobial MIC by paper diffusion method. *J.Clin. Path.*, 28: 989-992

### F

- Failmezger H., Jaegle B., Schrader A., Hülkamp M., Tresch A., 2013. Semi-automated 3D leaf reconstruction and analysis of trichome patterning from light microscopic images. *Plos Comput Biol.*, 9(4): e1003029. doi: 10.1371

## Références bibliographiques

---

- **Fahn A., 1979.** Secretory tissues in plants. Academic Press, London, 313 p.
- **Fahn A., Shimony C., 1996.** Glandular trichomes of *Fagonia* L. (Zygophyllaceae) species: structure, development and secreted materials. *Ann. Bot.*, 77: 25-34.
- **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331: 372-379.
- **Fengel D., Wegener G., 1984.** Wood chemistry ultrastructure reactions. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 85. In: Mazet JF., Triboulot-Trouy MC., Merlin A., Janin G., Deglise X., 1993. Modification de couleur du bois de chênes européens exposés à la lumière solaire. *Ann Sci For.*, 50 : 119-146
- **Ferron A., 1976.** Bactériologie médical à l'usage des étudiants en médecine. 8<sup>ème</sup> édition. Ed. Groun et Roques, France.
- **Feenstra W.J., 1978.** Contiguity of linkage groups I and IV as revealed by linkage relationship of two newly isolated markers dis-1 and dis-2. *Arabidopsis Inf. Serv.*, 15: 35–38. In: Nagata T., Todoriki S., Hayashi T., Shibata Y., Mori M., Kanegae H., Kikuchi S., 1999. g-Radiation Induces Leaf Trichome Formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 120, 113–119
- **Fernandes M.E.S., Silva D.J.H., Derly J.H.S., Picanço M.C., Fernandes F.L., Jham G.N., Carneiro P.C.S., 2011.** Resistance of tomato subsamples to *Bemisia tabaci* biotype B (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Agronomy Journal.*, 103 (6): 1849-1861
- **Ferrer J.L., Austin M.B., Stewart C.J., Noel J.P., 2008.** Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phelippanoids. *Plant Physiol. Biochem.*, 46: 356-370
- **Fiorentino A., D'Abrosca B., Pacifico S., Scognamiglio M., D'Angelo G., Gallicchio M., Chambery A., Monaco P., 2011.** Structure elucidation and hepatotoxicity evaluation against HepG2 human cells of *neo*-clerodane diterpenes from *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, 72 (16): 2037-2044
- **Folkers U., Kirik V., Schobinger U., Falk S., Krishnakumar S., Pollock M.A., Oppenheimer D.G., Day I., Reddy A.S.M., Jurgens G., Hulskamp M., 2002.** The cell morphogenesis gene *ANGUSTIFOLIA* encodes a CtBP/BARS-like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton. *EMBO. J.*, 21:1280-1288
- **Fondom N.Y., Castro-Nava S., and Huerta A.J., 2009.** Photoprotective mechanisms during leaf ontogeny: cuticular development and anthocyanin deposition in two morphs of *Agave striata* that differ in leaf coloration. *Botany*, 87: 1186–1197.

## Références bibliographiques

---

- Fritz C., Palacios-Rojas N., Feil R., Stitt M., 2006. Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The plant journal*, 46: 533-548.

### G

- Gairola S., Naidoo Y., Bhatt A., Nicholas A., 2009. An investigation of the foliar trichomes of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd (Lamiaceae): an important medicinal plant of Southern Africa. *Flora*, 204: 325-330.

- Gan Y., Kumimoto R., Liu C., Ratcliffe O., Yu H., Broun P., 2006. Glabrous inflorescence stems modulates the regulation by gibberellins of epidermal differentiation and shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 1383–1395.

- Gan Y., Liu C., Yu H., Broun P., 2007. Integration of cytokinin and gibberellin signalling by *Arabidopsis* transcription factors GIS, ZFP8 and GIS2 in the regulation of epidermal cell fate. *Development*, 134: 2073–2081.

- Gharaibeh M.N., Elayan H.H. Salhab A.S., 1988. Hypoglycaemic effects of *Teucrium polium*. *J. Ethnopharm.*, 24, 93-99

- Gherroucha H., 1995. Techniques pratiques d'analyse du sol. OPU (manuscrit en arabe), 104 p.

- G.E.P.P.A., 1963. In : Baize d., 2000. Guides des analyses en pédologie. 2ème édition, INRA, Paris, 60

- Giusti M. M., Jing P., 2007. Natural pigments of berries: functionality and application. In Zhao Y., Berry fruit: Value-added products for health promotion, Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC, 105-146.

- Gitelson A.A., Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., 2001. Optical properties and non-destructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochemistry and Photobiology*, 74: 38–45.

- Glas J.J., Schimmel B.C.J., Alba J.M., Escobar-Bravo R., Schuurink R.C., Kant M.R., 2012. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 17077-17103

- Glassgen, W.E., Rose, A., Madlung, J., Koch, W., Gleitz, J., and Seitz, H.U., 1998. Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta*, 204: 490-498

## Références bibliographiques

---

- **Gonzales W.L., Negritto M.A., Suarez L.H., Gianoli E., 2008.** Induction of glandular and non-glandular trichomes by damage in leaves of *Madia sativa* under contrasting water regimes. *Acta Oecologica*, 33: 128-132
- **Goutouly J.P., 2011.** L'azote chez la vigne: dynamique des besoins, de l'assimilation, du stockage et de la redistribution vers les fruits. Colloque IFV Sud-Ouest, Toulouse.
- **Guesmi A., Boudabous A., 2006.** Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. *Revue des Régions Arides*. Numéro spécial, 224-230
- **Guignard B., Coste C., Menigaux C., Chauvin M., 2001.** Reduced isoflurane consumption with the bispectral index monitoring. *Acta Anaesthesiol Scand*, 45: 308-14
- **Grotewold E., 2006.** The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 761–780
- **Grubešić R., Vladimir-Knežević S., Kremer D., Kalodera Z., Vuković J., 2007.** Trichome micromorphology in *Teucrium* (Lamiaceae) species growing in Croatia. *Biologia, Bratislava*, 62(2): 148-156

## H

- **Hamilton J.G., Zangerl A.R., Delucia H.D.E., Berenbaum M.R., 2000.** The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology letters*, 4: 86-95.
- **Handley R., Ekbom B., Ågren J., 2005.** Variation in trichome density and resistance against a specialist insect herbivore in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Ecol. Entomol.*, 30: 284–292
- **Hanlidou E., Kokkini S., Bosabalidis A.M., Bessiere J.M., 1991.** Glandular trichomes and essential oil constituents of *Calamintha menthifolia* (Lamiaceae). *Plant Syst. Evo.*, 177: 17–26. In: Huang S.S., Kirchoff B.K., Liao J.P., 2008. The Capitulate and Peltate Glandular Trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): Histochemistry, Ultrastructure and Secretion. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 135: 155–167.
- **Hallahan D.L., 2000.** Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of labiatae plants. *Adv. Bot. Res.*, 31: 77-120.
- **Hasani P., Yasa N., Vosough-Ghanbari S., Mohammadirad A., Dehghan G., Abdollahi M., 2007.** *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to  $\alpha$ -tocopherol. *Acta Pharm.*, 57: 123–129

## Références bibliographiques

---

- **Haughn G.W., Somerville C.R., 1988.** Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis*. *Dev Genet.*, 9: 73–89. In: Nagata T., Todoriki S., Hayashi T., Shibata Y., Mori M., Kanegae H., Kikuchi S., 1999.  $\lambda$ -Radiation induces leaf trichome formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 120: 113–119
- **Hauser M-T., Harr B., Schlötterer C., 2001.** Trichome distribution in *Arabidopsis thaliana* and its close relative *Arabidopsis lyrata*: molecular analysis of the candidate gene *Glabrous1*. *Mol. Biol. Evol.*, 18:1754–1763.
- **Harborne J.B., 1976.** Function of flavonoids in plants. In: Goodwin T.W., ed. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic Press Inc., London, 736–778.
- **Harborne J.B., 1980.** Secondary Plant Products. Encyclopedia of Plant Physiology, Vol 8, Bell EA, Charlwood BV, eds, Springer-Verlag, Berlin, 1980, pp.329-402. In: Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Macheix J.J., Fleriet A., Christian, A. 2005. PPTUR Lausanne
- **Harborne J.B., 1985.** Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed., Chapman and Hall, New York, 171p.
- **Harborne J.B., Tomas-Barberan F.A., Williams C.A., Gil M.I., 1986.** A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry*, 25 (12): 2811-2816. In: Mansour Mashreghi M., Soudabe Niknia S., 2012. The Effect of *Peganum harmala* and *Teucrium polium* Alcoholic Extracts on Growth of *Escherichia coli* O157. Jundishapur J Microbiol.; 5(3): 511-515.
- **Harborne J. B., Greenham J. and Eagles J., 1990.** Malonylated chalcone glycosides in *Dahlia*. *Phytochemistry*, 29: 2899-2900. In: Stich K., Halbwirtha H., Wurst F. and Forkmann G., 1994. Formation of 6'-Deoxychalcone 4'-Glucosides by Enzyme Extracts from Petals of *Dahlia variabilis*. *Z. Naturforsch.* 49c, 737-741
- **Harborne J.B., and Baxter H., 1999.** The Handbook of Natural Flavonoids. Vols. 1 and 2. John Wiley and Sons, Chichester
- **Harborne J.B., Williams C.A., 2000.** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6): 481-504.
- **Hare J.D., Elle E., 2002.** Variable impact of diverse insect herbivores on dimorphic *Datura wrightii*. *Ecology*, 83:2711–2720
- **Harleva E., Nevoa E., Lansky E.P., Lansky S., Bishayeed A., 2012.** Anticancer attributes of desert plants. *Anti-Cancer Drugs*, 23:255–271
- **Hartmann T., 2007.** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68: 2831 - 2846.



## Références bibliographiques

---

- Hassan S.M., Gutierrez O., Haq A.U., Byrd J.A., Bailey C.A., Cartwright A.L., 2007. Saponin-rich extracts from quillaja, yucca, soybean, and guar differ in antimicrobial and hemolytic activities. *Poult. Sci.*, 86:121
- Havsteen B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 96 (2-3): 67-202
- Hayouni E.A, Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M., 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.*, 105, 267–273.
- He J., Giusti M., 2010. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1: 163-187
- Heim M.A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P.C., 2003. The basic Helix-Loop-Helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol.Biol. Evol.*, 20 (5): 735-747
- Heywood V.H., Brummitt R.K., Culham A., Seberg O., 2007. Flowering Plant Families of the World. Kew: *Royal Botanic Gardens*, 23-339.
- Hipskind J., Wood K., Nicholson R.L., 1996. Localized stimulation of anthocyanin accumulation and delineation of pathogen ingress in maize genetically resistant to *Bipolaris maydis* race O. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 247-256. In: Clive Lo S.-C. and Nicholson R.L., 1998. Reduction of Light-Induced Anthocyanin Accumulation in Inoculated Sorghum Mesocotyls. *Plant Physiol.*, 116: 979–989
- Ho Y.L., Huang S.S., Deng J.S., Lin Y.H., Chang Y.S., Huang G.J., 2012. In vitro antioxidant properties and total phenolic contents of wetland medicinal plants in Taiwan. *Bot. Stud.*, 53(1): 55-66
- Hoch W.A., Singaas E.L., McCown B.H., 2003. Resorption protection. anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiology*, 133: 1296–1305.
- Hoch W.A., Zeldin E.L., McCown B.H., 2001. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree Physiology*, 21: 1–8
- Hodges D.M., Nozzolillo C., 1996. Anthocyanin and anthocyanoplast content of cruciferous seedlings subjected to mineral nutrient deficiencies. *Journal of Plant Physiology*, 147: 749-754. In: KAMOTO G.O., NISHI H.O. and IRANO K.H., 2003. The effect of different fertilizer application levels on anthocyanoplast development in berry skin of Pione grapevines (*V. vinifera* x *V. labrusca*). *Vitis*, 42 (3): 117–121

## Références bibliographiques

---

- **Hopkins W. G., 2003.** Physiologie végétale. 1<sup>re</sup> édition, De Boeck Supérieur, Espagne, 183-184.
- **Huang S.S., Kirchoff B.K., Liao J.P., 2008.** The Capitate and Peltate Glandular Trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): Histochemistry, Ultrastructure and Secretion. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 135: 155–167.
- **Hughes N.M., Neufeld H.S., Burkey K.O., 2005.** Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*. *New Phytologist*, 168: 575–587
- **Hughes N.M., Morley C.B., Smith W.K., 2007.** Coordination of anthocyanin decline and photosynthetic maturation in juvenile leaves of three deciduous tree species. *New Phytol.*, 175(4): 675–685
- **Hughes N.M., Smith W.K., 2007.** Attenuation of incident light in *Galax urceolata* (Diapensiaceae): concerted influence of adaxial and abaxial anthocyanic layers on photoprotection. *American Journal of Botany*, 94: 784–790
- **Hughes N.M., Reinhardt K., Feild T.S., Gerardi A.R., Smith W.K., 2010.** Association between winter anthocyanin production and drought stress in angiosperm evergreen species. *Journal of Experimental Botany*, 61(6), 1699–1709
- **Hulskamp M. Misra S., Jurgens G., 1994.** Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell*, 76: 555-566
- **Huttnen P., Kärkkäinen K., Løe G., Rautio P., Ågren J., 2010.** Leaf trichome production and responses to defoliation and drought stress in *Arabidopsis lyrata* (brassicaceae). *Ann. Bot. Fennici.*, 47: 199-207

## I

- **Iriti M., Colnaghi G., 2006.** Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(4): 704-712
- **Ishida T., Hattori S., Sano R., Inoue K., Shirano Y., Hayashi H., Shibata D., Sato S., Kato T., Tabata S., Okada K., Wada T., 2007.** *Arabidopsis* TRANSPARENT TESTA GLABRA2 is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of GLABRA2 transcription in epidermal differentiation. *Plant Cell*, 19: 2531-2543

## Références bibliographiques

---

- **Ishida T., Kurata T., Okada K., Wada T., 2008.** A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 365–386

### J

- **Jeffree C.E., 1986.** The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, function and evolution. In: Juniper B., Southwood S.R. (eds) *Insects and the plant surface*. Arnold, London, 23–64

- **Jia Y.- Q., Masbou V., Aussennac T., Fabre J.- I. and Debaeke P., 1996.** Effects of nitrogen fertilization and maturation conditions on protein aggregates and on the breadmaking quality of soissons, a common wheat cultivars. *Cereal Chem.*, 73(1):123–130

- **Jinshui W., Huang M., Xiao H.-A., Su Y.-R., Tong C.-L., Huang D.-Y. and Syers J., 2007.** Dynamics in microbial immobilization and transformations of phosphorus in highly weathered subtropical soil following organic amendments. *Plant and Soil*. 290 (1): 333-342.

- **Johnson H.B., 1975.** Plant pubescence - ecological perspective. *Bot. Rev.*, 41: 233–258. In: Yu N., Cai W.J., Wang S., Shan C.M., Wang L.J., Chen X.Y., 2010. Temporal control of trichome distribution by microrna156-targeted spl genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 22: 2322–2335

- **Johnson C.S., Kolevski B., Smyth D.R., 2002.** Transparent Testa Glabra2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell*, 14:1359-1375

- **Juan R., Pastor J., Millán F., Alaiz M. and Vioque J., 2004.** Amino acids composition of *Teucrium* nutlet proteins and their systematic significance. *Annals of Botany*, 94: 615–621.

- **Jump A., Penuelas J., Rico L., Ramalo E., Estiarte M., Martinez-Izquierdo J., Lloret F., 2008.** Simulated climate change provokes rapid genetic change in the Mediterranean shrub *Fumana thymifolia*. *Global Change Biology*, 14:637-643.

- **Juriscic Grubescic R., Vladimir-Knezevic S., Kremer D., Kalodera Z. and Vukovic J., 2007.** Trichome micromorphology in *Teucrium* (lamiaceae) species growing in Croatia. *Biologia, Bratislava, section Botany*, 62 (2): 148-156.

### K

- **Kabouche A., Kabouche Z., Ghannadi A., Sajjadi S.E., 2007.** Analysis of the essential oil of *Teucrium polium* ssp. *Aurasiacum* from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 19:44-46
- **Kahkonen M.P., Heinamaki J., Heinonen M., 2003.** Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 83: 1403-1411
- **Kahraman A., Celep F., Dogan M., 2009.** Morphology, anatomy and palynology of *Salvia indica* (Labiatae). *World Appl. Sci. J.*, 6: 289-296.
- **Kamatou G.P.P., Van Zyl R., Van Vuuren S., Viljoen A.M., Figueiredo C., Barroso J.G., Pedro L.G., Tilney P.M., 2006.** Chemical composition, leaf trichome types and biological activities of the essential oils of four related *Salvia* species indigenous to Southern Africa. *J. Essent. Oil Res.*, 18 : 72-79.
- **Karabourniotis G., Kofidis G., Fasseas C., Liakoura V., Drossopoulos I., 1998.** Polyphenol deposition in leaf hairs of *Olea europaea* (Oleaceae) and *Quercus ilex* (Fagaceae). *Am. J. Bot.*, 85: 1007–1012. In: Paoletti E., 2005. UV-B and Mediterranean forest species: Direct effects and ecological consequences. *Environmental Pollution*, 137: 372 - 379
- **Kasabri V., Afifi F.U., Hamdan I., 2011.** *In vitro* and *in vivo* acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2): 888-896
- **Kasuga J., Hashidoko Y., Nishioka A., Yoshiba M., Arakawa K., Fujikawa S., 2008.** Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant Cell and Environment*, 31: 1335-1348
- **Katalinic V., Mozina S., Skroza D., Generalic I., Abramovic H., Milos M., Ljubenkovic I., Piskernik S., Pezo I., Terpinc P. and Boban M., 2010.** Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *J. Food. Chem.*, 119: 715-723.
- **Kawashty S.A., Gamal El-Din E.M., Saleh N.A.M., 1999.** The flavonoid chemosystematics of two *Teucrium* species from Southern Sinai, Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 657-660
- **Keppeler K., Humpf H.U., 2005.** Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg. Med. Chem.*, 13(17), 5195-5205.

## Références bibliographiques

---

- **Khani A., Heydarian M., 2014.** Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from *Teucrium polium* subsp. *Capitatum* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 956-961. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60169-3.
- **Khleifat K., Shakhanbeh J., Tarawneh K., 2002.** The chronic effects of *Teucrium polium* on some blood parameters and histopathology of liver and kidney in the rat. *Turk. J. Biol.*, 26 : 65-71
- **Kim J.S., Lee B.H., Kim S.H., Ok K.H., Cho K.Y., 2006.** Response to environmental and chemical signals for anthocyanin biosynthesis in non-chlorophyllous corn (*Zea mays* L.) leaf. *J. Plant Biol.*, 49:16-25
- **Kisiel W., Piozzi F., and Grzybek J., 1995.** Terpenoids from *Teucrium montanum* subsp. *Pannonicum*. *Planta Med.*, 61: 191-192. In: Vukovic N., Sukdolak S., Solujic S., Mihailovic V., Mladenovic M., Stojanovic J. and Stankovic M. S., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Teucrium arduini* essential oil and cirsimarin from Montenegro. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7): 1244-1250, 4
- **Kivimäki M., Kärkkäinen K., Gaudeul M., Løe G., Ågren J., 2007.** Gene, phenotype and function: *glabrous1* and resistance to herbivory in natural populations of *Arabidopsis lyrata*. *Mol. Ecol.*, 16:453–462
- **Klute A., 1986.** Water retention: laboratory methods. In: Klute A., ed. *Methods of soil analysis. Part 1.* 2nd ed. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, 635-662.
- **Koffi E., Sea T., Dodehe Y. and Soro S., 2010.** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *J. Animal & Plant Sci.*, 5: 550-558.
- **Kofidis G., Bosabalidis A.M., Moustakas M., 2003.** Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in oregano (*Origanum vulgare* L.). *Ann. Botany*, 92: 635-645.
- **Kofidis G., Bosabalidis A.M., 2008.** Effects of altitude and season on glandular hairs and leaf structural traits of *Nepeta nuda* L. *Botanical Studies*, 49: 363-372
- **Kondo T., Yoshida K., Nakagawa A., Kawai T., Tamura H., Goto T., 1992.** Structural basis of blue-color development in flower petals from *commelina communis*. *Nature*, 358: 515-518. In: Oliveira J., Brás N. F., da Silva M. A., Mateus N., Parola A. J., de Freitas V., 2014. Grape anthocyanin oligomerization: A putative mechanism for red color stabilization? *Phytochemistry*, 105: 178–185
- **Koornneef M., Dellaert S.W.M., van der Veen J.H., 1982.** EMS and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Mutat. Res.*, 93, 109-123. In: Nayidu N.K, Kagale S., Taheri A., Withana-Gamage T.S., Parkin I. A. P., Sharpe

## Références bibliographiques

---

- A.G., Gruber M. Y. 2014. Comparison of five major trichome regulatory genes in *Brassica villosa* with orthologues within the Brassicaceae. *Plos One*, 9(4): e95877. doi:10.1371
- **Krimat S., Dob T., Lamari L., Boumeridja S., Chelghoum C., Metidji H. 2014.** Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from *Algeria*. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(6): 478-483
- **Krol M., Gray G.R., Hurry V.M., Oquist G., Malek L., Huner N.P.A., 1995.** Low-Temperature Stress and Photoperiod Affect an Increased Tolerance to Photoinhibition in *Pinus-Banksiana* Seedlings. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1119-1127.
- **Kueny-Stotz M., Isorez G., Chassaing S., Brouillard R., 2007.** Straightforward Synthesis of Highly Hydroxylated Phloroglucinol-Type 3-Deoxyanthocyanidins . *Synlett*, 7: 1067-1070
- **Kumar V., Sharma S.S., 1999.** Nutrient deficiency-dependent anthocyanin development in *Spirodela polyrhiza* L. Schleid. *Biologia Plantarum*, 42: 621-624
- **Kuntie V., Pejie N., Ivkovic B., Vugie Z., Ilie K., Micie S., Vukojevie V., 2007.** Isocratic R-P-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43 : 718-721
- **Kupper H., Lombi E., Zhao F.J., McGrath S.P., 2000.** Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, 212:75-84

### L

- **Ladjel S., Laamara K., Al-Hillo M.R.Y., Paÿs M., 1994.** Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium* ssp. *Aurasionum*. *Phytochemistry*, 37 (6): 1663–1666.
- **Laemmler U. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
- **Lakušić B., Popov V., Runjajic-antic D., 2007.** Morpho-anatomical characteristics of the raw material of the herbal drug *Olivae folium* and its counterfeits. *Archives Biological Science*, 59(3): 187-192. In: Korkijthamkul W., Riengrojpitak S., Traiperm P., 2013. Microscopic study of plants containing cardiac glycoside in Apocynaceae. *Thai. Journal of Botany*, 5: 119-131.
- **Lakušić B., Stevanović B., Janić R., Lakušić M., 2010.** Habitat-related adaptations in morphology and anatomy of *Teucrium* (Lamiaceae) species from the Balkan peninsula (Serbia and Montenegro). *Flora*, 205: 633–646

## Références bibliographiques

---

- **Lapinjoki S.E., Elo H.A., Taipale H.T., 1991.** Development and structure of resin glands on tissues of *Betula pendula* Roth. during growth. *New Phytol.*, 117: 219-223. In: Valkama E., Salminen J.-P., Koricheva J., And Pihlaja K., 2003. Comparative Analysis of Leaf Trichome Structure and Composition of Epicuticular Flavonoids in Finnish Birch Species. *Ann Bot.*, 91(6): 643–655
- **Larkin J.C., Young N., Prigge M., Marks M.D., 1996.** The control of trichome spacing and number in *Arabidopsis*. *Development*, 122: 997-1005
- **Larronde F., Krisa S., Decendit A., Cheze C., Merillon J.M., 1998.** Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Rep.*, 17: 946-950
- **Lassányi Z., Stieber G., 1976.** The volatile oil secretory system of the tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Acta Agron. Acad. Scient. Hung.*, 25: 269-280. In: El Beyrouthy M., Arnold N., Delelis-Dusollier A., Dupont F. et de Foucault B., 2008. Morphologie du trichome des *Teucrium* du Liban. *Acta Bot. Gallica*, 155 (4), 563-576.
- **L.C.A., 2008.** Guide pratique: comprendre et utiliser les analyses agro-environnementales.
- **Leclerc H., Gaillard J.L., Simonet M., 1999.** Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien, Doin Editions, Paris, 154- 201.
- **Le minor L., Veron M., 1989.** Bactériologie médicale. 2<sup>ème</sup> édition, médecine sciences, Flammarion, Paris, 331-381, 773-828
- **Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J.M., Baudry A., Pourcel L., Nesi N., Caboche M., 2006.** Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 405-430
- **Lichtenthaler H.K., 1987.** Chlorophylls and caroténoides: pigments of photosynthetic biomembranes. *Menth. Enzymol.*, 148: 350-382.
- **Liu J., Xia K.F., Zhu J.C., Deng Y.G., Huang X.L., Hu B.L., Xu X., Xu Z.F., 2006.** The nightshade proteinase inhibitor Iib gene is constitutively expressed in glandular trichomes. *Plant Cell Physiol.*, 47: 1274–1284
- **Livermore D.M., 2002.** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare?. *Clinical Infectious Diseases*, 34(5): 634-640
- **Løe G., Toräng P., Gaudeul M., Ågren J., 2007.** Trichome production and spatiotemporal variation in herbivory in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. *Oikos*, 116: 134–142

### M

- **Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B., 1970.** The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York, Heidelberg. In: Intekhab J., Aslam M., 2011. Isolation of a flavone glucoside from *Glycosmis mauritiana* (Rutaceae). *Arabian Journal of Chemistry*, 4: 79–81
- Macías F.A., Galindo J.G.G., Molinillo J.M.G., Castellano D., 2000.** Dehydrozaluzanin C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. *Phytochem.*, 54: 165-171. In: Badmus A.A. and Afolayan A.J., 2010. The foliar micromorphology of *Arctotis arctotoides* (L.f.) O. Hoffm. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(16): 1643-1646
- **Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J., 1990.** Fruit phenolics. CRC Press: Boca Raton, Etats Unis, 378 p. In: Georgé S., Tourniaire F., Gautier H., Goupy P., Rock E., Caris-Veyrat C., 2011. Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. *Food Chemistry*, 124 : 1603–1611
- **Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 192 p.
- **Maffei M., Chialva F., Sacco T., 1989.** Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. *New Phytologist*, 11: 707–716
- **Makkar, H.P.S., Hagerman, A., Mueller-Harvey, I., 2000.** Quantification of tannins in tree foliage: a laboratory manual. FAO/IAEA Working Document. IAEA, Vienna, pp. 23–24. In: Addisu S., 2016. Effect of dietary tannin source feeds on ruminal fermentation and production of cattle; a review. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 6(2): 45 - 56
- **Manetas Y., 1999.** Is enhanced UV-B radiation really damaging for plants? Some case studies with European Mediterranean species. In: Rozema J., ed. Stratospheric ozone depletion; the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 251–263
- **Manetas Y., 2006.** Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? *Flora*, 201: 163-177



## Références bibliographiques

---

- **Maleci Bini L., Servettaz O., 1991.** Morphology and distribution of trichomes in Italian species of *Teucrium* sect. *Chamaedrys* (Labiatae); a taxonomical evaluation. *Plant Syst. Evol.*, 174: 83-91. In: Navarro T., El Oualidi J., 2000. Trichome morphology in *Teucrium* L. (Labiatae). A taxonomic review. *Ann. Jard.Bot. Madrid*, 57: 277-297
- **Maleci Bini L., Giuliani C., 2006.** The glandular trichomes of the Labiatae. A review. In: Proc. Ist IC on Labiatae. B. Ruffoni et al. (eds), *Acta Hort.*, ISHS, 723: 85-90.
- **Malhotra B., Onyilagha J. C., Bohm B., Towers G.H.N., James D., Harbone J.B., French C.J., 1996.** Inhibition of tomato ringspot virus by flavonoids. *Phytochemistry*, 43(6): 1271-1276
- **Marimoto M., Komai K., 2005.** Plant growth inhibitors: patchoulane-type sesquiterpenes from *Cyperus rotundus* L. *Weed Biol. Manage.*, 5: 203-209.
- **Markham K.R., 1982.** Techniques of flavonoids identification. Ed Academic Press. 6-10
- **Marks M.D., Esch J.J., 1994.** Morphology and development of mutant and wild type trichomes on the leaves of *Arabidopsis thaliana*. In: Bowman J., ed., *Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development*. Springer-Verlag, New York, 56–73
- **Marks M.D., 1997.** Molecular genetic analysis of trichome development in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:137–163.
- **Martin P.D., Petković B., Duletić S., 1994.** Nutlet sculpturing of selected *Teucrium* species (Lamiaceae) a character of taxonomic significance. *Pl. syst .evol.*, 192: 199-214. In: Navarro T., El Oualidi J., 2000. Trichome morphology in *Teucrium* L. (Labiatae). A taxonomic review. *Ann. Jard.Bot. Madrid*, 57: 277-297
- **Mathew L., Shan G.L., 1983.** Structure, development, organographic distribution and taxonomic significance of trichomes in nine species of *Verbena*. *Feddes Repert.*, 94: 323-333  
In : GENÇ G.E., ÖZCAN T., DİRMENC T., 2015. Micromorphological characters on nutlet and leaf indumentum of *Teucrium* sect . *Teucrium* (Lamiaceae) in Turkey. *Turk J Bot.*, 39: 439-448
- **Mathieu C., and Pieltain F., 2003.** Analyse chimique de sol : méthodes choisies. Tec & Doc, Paris, 388 p.
- **Mathur J., Chua N.H., 2000.** Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes. *Plant Cell*, 12:465-477
- **Matthäus B. et Özcan M., 2005.** Glucosinolates and fatty acid, sterol, and tocopherol composition of seed oils from *Capparis spinosa* Var. *spinosa* and *Capparis ovata* Desf. Var. *canescens* (Coss.) Heywood. *J. Agric. Food Chem.*, 53(18): 7136-7141

## Références bibliographiques

---

- **Matus J.T., Loyola R., Vega A., Peña-Neira A., Bordeu E., Arce-Johnson P., Alcalde J.A., 2009.** Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonols synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *Journal of Experimental Botany*, 60 (3): 853–867.
- **Mayachiew P., Devahastin S., 2008.** Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology*, 41: 1153-1159.
- **Mayekiso B., Magwa M.L., Cooposamy R., 2008.** The morphology and ultrastructure of glandular and non-glandular trichomes of *Pteronia incana* (Asteraceae). *Afr. J. Plant Sci.*, 2(7): 52-60.
- **Mayekiso B., 2009.** Morphological and chemical composition of the essential oil of the leaf of *Schistostephium heptalobium*. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(8): 1509-1519.
- **Mayekiso B., Mhinana Z., Magwa M.L., 2009.** The structure and function of trichomes in the leaf of *Salvia repens* Burch. Ex Benth. *African Journal of Plant Science*, 3(9): 190-199.
- **Mazza G., Brouillard R., 1990.** The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 29: 1097-1102.
- **Mazza G., Miniati E., 1993.** Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. CRC Press: Boca Raton, 1-6, 10-12
- **Mc Caskill D., Croteau R., 1995.** Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha × piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta*, 197: 49–56
- **Mc Ghie T.K., Walton M.C., 2007.** The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51: 702-713.
- **Mc Kenna T.J., Island D.P., Nicholson W.E., Liddle G.W., 1978.** The effects of potassium on early and late steps in aldosterone biosynthesis in cells of the *Zona lomerulosa*. *Endocrinology*, 103: 1411-6.
- **Menichini F., Conforti F., Rigano D., Formisano C., Piozzi F., Senatore F., 2009.** Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry*, 115: 679–686
- **Merzyljak M.N., Gitelson A.A., Chivkunova O.B., Rakitin V.Yu., 1999.** Non-destructive optical detection of pigment changes during leaf senescence and fruit ripening. *Physiol. Plant.*, 106: 135–141.
- **Merzyljak M.N., Solovchenko A.E., Gitelson A.A., 2003.** Reflectance spectral features and non-destructive estimation of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 197–211.

## Références bibliographiques

---

- **Merzylak M.N., Melø T.B., Naqvi K.R., 2008.** Effect of anthocyanins, carotenoids and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. *Journal of Experimental Botany*, 59: 349–359.
- **Messaili B., 1995.** Botanique, systématique des spermaphytes. OPU (Ed), Alger, 91p.
- **Mittelstra K., Trentter D., Ple M., Heller W., Elastner E.F., Heiser L., 2006.** Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Plant biology*, 8: 653-661
- **Moghtader M., 2009.** Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5 (6): 843-846
- **Mohammedi Z. and Atik F., 2011.** Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. *Inter. J. Pharma. Bio. Sci.* 2 : 609-615.
- **Morohashi K., Zhao M., Yang M., Read B., Lloyd A., Lamb R., Grotewold E., 2007.** Participation of the *Arabidopsis* bHLH factor GL3 in trichome initiation regulatory events. *Plant Physiol.*, 145: 736–746
- **Moscovici S., Moalem-Beno D., Weiss D., 1996.** Leaf-mediated light responses in petunia flowers. *Plant Physiol.*, 110: 1275-82
- **Mpiana P.T., Mudogo V., Kabangu Y.F., Tshibangu D.S.T., Ngbolua K.N., Atibu E.K., Mangwala K.P., Mbala M.B., Makelele L.K., Bokota M.T., 2009.** Antisickling activity and thermostability of anthocyanins extract from a Congolese plant, *Hymenocardia acida* Tul. (Hymenocardiaceae). *Int. J. Pharmacol.*, 5(1): 65-70.
- **Muanda F.N., 2010.** Identification de polyphénol, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leur propriétés biologiques. Thèse de doctorat. 55 p.
- **Mulinacci N., Prucher D., Peruzzi M., Romani A., Pinelli P., Giaccherini C. and Vincieri F.F., 2004.** Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compound content. *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 34: 349-357
- **Mráz P., 1998.** The structure and development of the glandular trichomes of *Teucrium montanum* (Lamiaceae). *Biol. Bratislava*, 53(1): 65-72. In: El Beyrouthy M., Arnold N., Delelis-Dusollier A., Dupont F. et de Foucault B., 2008. Morphologie du trichome des *Teucrium* du Liban. *Acta Bot. Gallica*, 155 (4), 563-576.

### N

- **Nataro J. P., Kaper J. B., 1998.** Diarrheagenic *E. coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11: 142-201.
- **Navarro T., 1995.** Revisión del género *Teucrium* L. section *Polium* (Mill.) Schreb. (Lamiaceae) en la Península Ibérica y Baleares. *Acta Bot. Malac.*, 20, 173-265. In: Navarro T., El Oualidi J., 2000. Trichome morphology in *Teucrium* (Labiatae). A taxonomic review. *Anal. Jard. Bot. Madrid*, 57 (2): 278-297
- **Navarro T., El Oualidi J., 2000.** Trichome morphology in *Teucrium* L. (Labiatae). A taxonomic review. *Ann. Jard.Bot. Madrid*, 57: 277-297
- **Nayidu N.K, Kagale S., Taheri A., Withana-Gamage T.S., Parkin I.A.P., Sharpe A.G., Gruber M.Y., 2014.** Comparison of Five Major Trichome Regulatory Genes in *Brassica villosa* with Orthologues within the Brassicaceae. *Plos One*, 9(4): e95877. doi:10.1371
- **Nematollahi-Mahani S.N., Rezazadeh-Kermani M., Mehrabani M., and Nakhaee N., 2007.** Cytotoxic effects of *Teucrium polium* on some established cell lines. *Pharmaceutical Biology*, 45(4): 295–298
- **Niazmand S., Esparham M., Hassannia T., Derakhshan M., Niazmand S., Esparham M., Hassannia T., Derakhshan M., 2011.** Cardiovascular effects of *Teucrium polium* L. extract in rabbit. *Phcog. Mag.*, 7: 260-264.
- **Nedjraoui D. et Bédrani S., 2008.** La désertification dans les steppes algériennes : causes, impacts et actions de lutte . Le désert et la désertification : impacts, adaptation et politiques, 8 (1).
- **Neffar S., Beddiar A., Redjel N., et Boukheloua J., 2011.** Effets de l'âge des plantations de figuier de Barbarie sur les propriétés du sol et la végétation (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) à Tébessa (zone semi-aride de l'est Algérien). *Ecologia Mediterranea*, 37 (1): 5-15

### O

- **Oberson A., Friesen D.K., Rao M., Bühler S. et Frossard E., 2001.** Phosphorus Transformations in an Oxisol under contrasting land-use systems: The role of the soil microbial biomass. *Plant and Soil*, 237( 2): 197-210.
- **Office national de la météorologie (ONM), 2011.** Données climatiques 1978-2011

## Références bibliographiques

---

- **Oganesyan G.B., Galstyan A.M., Mnatsakanyan V.A., Shashkov A.S., Agababyan P.V., 1991.** Phenylpropanoid glycosides of *Teucrium polium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 27, 556-559
- **Ohto M., Onai K., Furukawa Y., Aoki E., Araki T., Nakamura K., 2001.** Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 127: 252-261
- **Oliver J.E., 2006.** The encyclopedia of world climatology (Encyclopedia of Earth Sciences Series). Springer, Berlin, 89 p.
- **Olsen S.R., Cole C.V, Watanabe F.S., Dean L.A., 1954.** Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *U.S.D.A. Circular*, 939:1-19
- **Oppenheimer D.G., Herman P.L., Sivakumaran S., Esch J., Marks M.D., 1991.** A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell*, 67: 483–493.
- **Oppenheimer D.G., Pollock M.A., Vacik J., Szymanski D.B., Ericson B., Feldmann K., Marks M.D., 1997.** Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 94:6261-6266
- **Orgogozo M.J., Dartigues J.F., Lafont S., Letenneur L., Commenges D., 1997.** Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev. Neurol.*, 185-192
- **Ozkan G., Kuleasan H., Celik S., Gokturk R.S., Unal O., 2007.** Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *Pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities. *Food Control*, 18: 509-512

## P

- **Pantoja C.V., Chiang L.C.H., Norris B.C., Concha J.B., 1993.** Diuretic, natriuretic and hypotensive effects produced by *Allium sativum* (garlic) in anaesthetized dogs. *J. Ethnopharmacol.*, 31: 325–331
- **Pare P., Tumlinson J., 1999.** Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.*, 121: 325-332
- **Parsaee H. and Shafiee-Nick R., 2006.** Anti-spasmodic and anti-nociceptive effects of *Teucrium polium* aqueous extract. *Iranian Biomedical Journal*, 10 (3): 145-149.

## Références bibliographiques

---

- **Passamonti S., Terdoslavich M., Franca R., Vanzo A., Tramer F., Braidot E., Petrusa E., Vianello A., 2009.** Bioavailability of flavonoids: A review of their membrane transport and the function of bilitranslocase in animal and plant organisms. *Curr. Drug Metab.*, 10: 369-394.
- **Patricia S., Biedendieck V.R., Tobias F., Meinhardt F., Rohde M., Deckwer W. D., Jahn D., 2007.** *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10.1007/s00253-007-1089-3
- **Pattanaik S., Xie C.H., Yuan L., 2007.** The interaction domains of the plant Myc-like bHLH transcription factors can regulate the transactivation strength. *Planta*, 227(3): 707-715
- **Payne P.I., Corfield K.G., 1979.** Subunit composition of glutenin wheat proteins isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta*, 145: 83-88
- **Payne C.T., Zhang F., Lloyd A.M., 2000.** GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics*, 156:1349–1362
- **Peer W.A., Murphy A.S., 2007.** Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science*, 12(12): 556–563
- **Peltonen J. and Virtanen A., 1994.** Effects of nitrogen fertilizers in release characteristics on the quantity of storage proteins in Wheat. *Cereal Chem.*, 77(1):1–5. In: Borkowska H. and Grundas S., 2007. Changes of quality properties of spring wheat grain resulting from some agrotechnical factors. *Int. Agrophysics*, 21, 117-121
- **Penalosa J.M., Sarro M.J., Revilla E., Carpena R., Cadahia C., 1989.** Influence of phosphorus supply on tomato plant nutrition. *Journal of plant nutrition*, 12(5): 647-657.
- **Peng M., Hannam C., Gu H., Bi Y.-M., Rothstein S.J., 2007.** A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts *Arabidopsis* adaptability to nitrogen limitation. *The Plant Journal*, 50: 320–337.
- **Peng M., Hudson D., Schofield A., Tsao R., Yang R., Gu H., Bi Y.M., Rothstein S.J., 2008.** Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. *Journal of Experimental Botany*, 59(11): 2933–2944.
- **Perry J., Staley J., Lory S., 2004.** Microbiologie - Cours et questions de révision, édition Dunod, Paris, 159-162.
- **Peter K., Vollhardt C., Schore N., 2004.** Traité de chimie organique. 4<sup>ème</sup> Edition. De Boeck, Bruxelles, P. 444-449.

## Références bibliographiques

---

- **Perez-Estrada L.B., Canto-Santan Z., Oyama K., 2000.** Variation in leaf trichomes of *wigandia urens*: environmental factors and physiological consequence. *Tree Physiology*, 20: 629–632.
- **Pesch M., Hülskamp M., 2004.** Creating a two-dimensional pattern de novo during *Arabidopsis* trichome and root hair initiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 14: 422–427.
- **Pesch M., Hülskamp M., 2009.** One, two, three models for trichome patterning in *Arabidopsis*?. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12: 587-592.
- **Pfannschmidt T., Brautigam K., Wagner R., Dietzel L., Schroter Y., Steiner S., Nykytenko A., 2009.** Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding. *Ann. Bot.*, 103: 599-607.
- **Pfündel E.E., Agati G., Cerovic Z.G., 2006.** Optical properties of plant surfaces. In: Riederer M., Müller C., eds. *Biology of the plant cuticle*. Annual plant reviews. Oxford: Blackwell Publishing, 216–249.
- **Philippon A., 1995.** Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. *Lett. Infectiol.*, 10: 619-630.
- **Pibiri M.C., 2005.** Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat de la faculté environnement naturel architectural et construit. Lausanne, 28-42
- **Pichersky E., Gershenzon J., 2002.** The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 237-243
- **Pistrick K., 2002.** Notes on neglected and underutilized crops Current taxonomical overview of cultivated plants in the families umbelliferae and labiatae. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49, 211–225.
- **Piozzi F., Bruno M., Rosselli S., Maggio A., 2005.** Advances on the chemistry of furano-diterpenoids from *Teucrium* genus. *Heterocycles*, 65:1221-1234
- **Puech S., 1984.** Les *Teucrium* (Labiées) de la section *Polium* du bassin méditerranéen occidental (France et péninsule ibérique). *Natur. Monsp. Bota.*, 1-71.  
Puech S. 1985. Contribution à l'étude des *Teucrium* de la section *polium* (Labiatae) de Tunisie (suite). *Bull. Sor. bot. Fr.*, 132, lettres bot., ( 1),41- 50
- **Presne C., Mongea M., Mansoura J., Oprisiua R., Choukrouna G., Achardb J. M., Fournier A., 2007.** Thérapeutique diurétique. *Néphrologie and Thérapeutique*, 3: 392–426.
- **Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G.J.E., Komaitis M., 2006.** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and

## Références bibliographiques

---

antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95: 664–671.

### Q

- **Quenzel P.S. and Santa, 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed :CNRS, Paris, 45 p.
- **Qiu J., Jilk R., Marks M.D., Szymanski D.B., 2002.** The *Arabidopsis* SPIKE1 gene is required for normal cell shape control and tissue development. *Plant Cell*, 14:101-118

### R

- **Rajabalian S., 2008.** Methanolic extract of *Teucrium polium* L. potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines. *Exp Oncol.*, 30(2):133-8.
- **Rafieian-Kopaei M., Baradaran A., 2013.** *Teucrium polium* and kidney. *J. Ren. Inj. Prev.*, 2(1): 3-4
- **Rahn K., 1992.** Trichomes within the Plantaginaceae. *Nord. J.Bot.*, 12: 3-12.
- **Rasmussen S.E., Frederiksen H., Struntze Krogholm K., Poulsen L., 2005.** Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 159-174.
- **Rausher M.D., 2008.** Evolutionary transitions in floral color. *International Journal of Plant Science*, 169: 7–21.
- **Razieh Yazdanparast R., Ardestani A., 2009.** Suppressive effect of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on cellular oxidative damages and apoptosis induced by 2-deoxy-D-ribose: Role of de novo synthesis of glutathione. *Food Chemistry*, 114(4):1222-1230
- **Reille M., 1992.** Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du Nord. Livre 01. Laboratoire de botanique ésotérique et palynologique. Marseille, France, 446p.
- **Reille M., 1995.** Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du Nord. Supplément N<sup>o</sup> :1 et 2. Laboratoire de botanique ésotérique et palynologique. Marseille, France, 711p.
- **Reille M., 1999.** Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du Nord. Index. Laboratoire de botanique ésotérique et palynologique. Marseille, France, 242p.
- **Rezaei S. and Gilkes R., 2005.** The effect of landscape attributes and plant community on soil chemical properties in rangelands. *Geoderma*, 125: 167-176.



## Références bibliographiques

---

- **Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G., 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4): 152-159. In: Wojdyło A., Oszmian'ski J., Czemerys R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105: 940–949
- **Rizk A.M., Hammouda F.M., Rimpler H., Kamel A., 1986.** Iridoids and flavonoids of *Teucrium polium* herb. *Planta Med.*, (2): 87-88
- **Robles-Zepeda R.E., Lozoya-Gloria E., López M.G., Villarreal M.L., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J., 2009.** *Montanoa tomentosa* glandular trichomes containing kaurenoic acids chemical profile and distribution. *Fitoterapia*, 80: 12-17.
- **Rodier J., Bazin C., Chanbon P., Broutin J.P., Champsaur H., Rodi L., 1996.** L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires et eaux de mer. 8<sup>ème</sup> Ed. Dunod, Paris, 158-160.
- **Rolland F., Baena-González E., Sheen J., 2006.** Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:676-709.
- **Ronchetti F., Russo G., 1971.** A new alkaloid from *Rauvolfia*. *Phytochem.*, 10: 1385-1388.
- **Roulet M., Grimaldi C., 2001.** Le mercure dans les sols d'Amazonie. Origine et comportement du mercure dans les couvertures ferralliques du bassin amazonien et des Guyanes. Le mercure en Amazonie, IRD édition, Institut de Recherche pour le Développement, Paris, 121-165.
- **Rösch D., Krumbein A., Kroh L.W., 2004.** Antioxidant gallocatechins, dimeric and trimeric proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace. *European Food Research and Technology*, 219(6): 605-613
- **Rosenthal G.A., Berenbaum M.R., 1991.** Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant metabolites, Vol. I: The Chemical Participants, 2nd ed. Acad Press, San Diego.
- **Ryan K.G., Swinny E.E., 2001.** Flavonoids and UV photoprotection in *Arabidopsis* Mutants. *Z. Naturforsch C.*, 56: 745-754
- **Ryding O., 1998.** *Teucrium* (Lamiaceae) in NE tropical Africa. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh.*, 55(2): 209-220. In: Navarro & EL Oualidi J., 1999. Flower and life strategy diversity in *Teucrium* L. (lamiaceae) Teresa. *Acta Botanica Malacitana*, 24: 63-75

## S

- **Sadeghi H., Jamalpoor S., Shirzadi M.H., 2014.** Variability in essential oil of *Teucrium polium* L. of different latitudinal populations. *Industrial Crops and Products*, 54: 130-134

## Références bibliographiques

---

- **Sakthidevi G., Mohan V. R., Jeeva S., 2014.** *In vitro* antioxidant studies of tuber of *Jatropha maheshwarii* Subram. & Nayar. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 29(1): 6 -10
- **Salt D.E., Prince R.C., Pickering I.J, Raskin I., 1995.** Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology*, 109: 1427–1433
- **Saroglou V., Arfan M., Shabir A., Hadjipavlou-Litina D., Skaltsa H., 2007.** Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium royleanum* Wall. ex Benth growing in Pakistan. *Flavour Fragr. J.*, 22:154-157.
- **Sarret G., Harada E., Choi Y., Isaure M., Geoffroy N., Fakra S., Markus M.A., Birschwilks M., Clemens S., Manceau A., 2006.** Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiol.*, 141: 1021–1034
- **Satil F., Kaya A. and Dirmenci T., 2011.** The taxonomic value of leaf anatomy and trichome morphology of the genus *Cyclotrichium* (Lamiaceae) in Turkey. *Nordic Journal of Botany*, 29: 38-48
- **Satue Garcia M.T., Heinonen M., and Frankel E.N., 1997.** Anthocyanins as antioxidants on human lowdensity lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. of Agric. Food Chem.*, 45: 3362-3367
- **Scalbert A., 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12): 3875-3883
- **Shakhanbeh J., Atrouce O., 2001.** *Teucrium polium* inhibits nerve conduction and carrageenan induced inflammation in the rat skin. *Turk J Med Sci.*, 3:15-21
- **Schellmann S., Hülskamp M., 2005.** Epidermal differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a model system. *Int. J. Dev. Biol.*, 49: 579-584.
- **Schellmann S., Hülskamp M., Uhrig J., 2007.** Epidermal pattern formation in the root and shoot of *Arabidopsis*. *Biochem. Soc. Trans.*, 35: 146–148. In: Wang S., Chen J.G., 2014. Regulation of cell fate determination by single- repeat R3 MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 5. doi: 10.3389.
- **Schiefelbein J., 2003.** Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 74–78
- **Schnee C., Köllner T.G., Held M., Turlings T.C.J., Gershenzon J., Degenhardt J., 2006.** The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103: 1129–1134. In: Glas J.J., Schimme B.C.J., Alba J.M., Escobar-Bravo R., Schuurink R.C., Kant M.R., 2012. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 17077-17103.

## Références bibliographiques

---

- **Schnittger A., Folkers U., Schwab B., Jurgens G. and Hulskamp M., 1999.** Generation of a spacing pattern: the role of triptychon in trichome patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 1105-1116
- **Schröder S., Beckmann K., Franconi G., Meyer-Hamme G., Friedemann T., Greten H. J., Rostock M., Efferth T., 2013.** Can medical herbs stimulate regeneration or neuroprotection and treat neuropathic pain in chemotherapy-induced peripheral neuropathy?. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-18.
- **Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H., 2005.** Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agri. Food Chem.*, 53(20): 7749–7759.
- **Sharaby A., 1988.** Anti-insect properties of the essential oil of lemongrass, *Cymbopogon citrates* against the cotton leafworm *Spodoptera exigua* (Hbn). *Insect Sci. Appl.*, 9: 77-80
- **Sharaf A., Khafagi A., Hatab E. and Moursy M. 2013.** Effect of altitudinal gradients on the content of carbohydrate, protein, proline and total phenols of some desert plants in Saint Katherine Mountain, South Sinai, Egypt. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 14 (1): 122-129
- **Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldini M., 2009.** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium*. *Food Chemistry*, 112: 885–888
- **Shen B., Sinkevicius K.W., Selinger D.A., Tarczynski M.C., 2006.** The homeobox gene *GLABRA2* affects seed oil content in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 60: 377–387
- **Shepherd R.W., Bass W.T., Houtz R.L., Wagner G.J., 2005.** Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on aerial surfaces by short glandular trichomes. *Plant Cell*, 17, 1851–1861.
- **Shin J., Park E., Choi G., 2007.** PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in a HY-5 dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 49:981-94.
- **Shtukmaster S., Ljubuncic P., and Bomzon A., 2010.** The effect of an aqueous extract of *Teucrium polium* on glutathione homeostasis in vitro: a possible mechanism of its hepatoprotectant action. *Advances in Pharmacological Sciences*, Article ID 938324, 7 p. doi:10.1155/2010/938324
- **Serrato-Valenti G., Bisio A., Lornara C., Ciarallo G., 1997.** Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves and chemical analysis of the essential oil. *Ann. Bot.*, 79: 329–336.

## Références bibliographiques

---

- **Siebert D., 2004.** Localization of Salvinor A and related compounds in glandular trichomes of the psychoactive stage, *Salvia divinorum*. *Ann. Bot.*, 93: 763-771
- **Sierra M., Martinez C., Sierra C., Aguilar J., 2009.** Correlations between pedological parameters in relation to lithology and soil type in Almeria (SE Spain). *Journal of Arid Environments*, 73: 493-498
- **Singh N.K., Shepherd K.W., and Cornish G.B., 1991.** A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J.Cereal. Sci.*, 14:203-208.
- **Singleton V.L., Esau P., 1969.** Phenolic substances in grapes and wine and their significance. *Advances in Food research - Smith 1996, Oxidative damage in Alzheimer's, Nature*, 382: 120-121. In: Kenned J. A., 2008. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Cien. Inv. Agr.*, 35(2): 107-120.
- **Simmonds M.S.J., 2003.** Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, 64(1): 21-30.
- **Simmonds M., 2001.** Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry*, 56: 245-252
- **Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T. and Arsenakis M., 1995.** Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (9): 2384-2388.
- **Solfanelli C., Poggi A., Loreti E., Alpi A., Perata P., 2006.** Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 140: 637-46.
- **Solovchenko A.E., Merzlyak M.N., 2008.** Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(6): 719-737.
- **Solovchenko A.E., 2013.** Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. *Russ. J. Plant Physiol.*, 60: 1-13
- **Sommer S.G., Hutchings N.J., 2001.** Ammonia emission from field applied manure and its reduction. *European Journal of Agronomy*, 15: 1-15
- **Skaltsa H., Verykokidou E., Harvala C., Krabourniotis G., Manetas Y., 1994.** UV-protective potential and flavonoid content of leaf hairs of *Quercus ilex*. *Phytochemistry*, 37: 987-990
- **Sliman R., Rehm S., Shlaes D.M., 1987.** Serious infections caused by *Bacillus* species. *Medicine (Baltimore)*, 66(3): 218-23.
- **Smith M.A., Perry G., Richey P.L., Sayre L.M., Anderson V.M., Beal M.F., Kowall N., 1996.** Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*, 382:120 -121.

## Références bibliographiques

---

- Spelt C., Quattrocchio F., Mol J., Koes R., 2002. Anthocyanin1 of *Petunia* controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *Plant Cell*, 14: 2121–2135
- Spichiger R.O., Savolainen V., Figeat M., Jeanmonod D., 2004. Botanique systématique des plantes à fleurs. Ed. Presses Polytechniques et universitaires Romandes, 3ième édition, 413p.
- Sripad G., Prakash V. and Narasinga Rao M. S., 1982. Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents. *J. Biosci.*, 4: 145-152
- Stanic G., Samarzija I., 1993. Diuretic Activity of *Satureja Montana* subsp. *montana* extracts and oil in rats. *Phytother. Res.*, 7: 363–66.
- Stefkov G., Karapandzova M., Stefova M., Kulevanova S., 2009. Seasonal variation of flavonoids in *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 55 (1, 2) 33 – 40
- Stefkov G., Kulevanova S., Miova B., Dinevska-Kjovkarovska S., Mølgaard P., Jäger A.K., Josefsen K., 2011. Effects of *Teucrium polium* spp. *capitatum* flavonoids on the lipid and carbohydrate metabolism in rats. *Pharm. Biol.*, 49(9): 885-892.
- Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M., Jacobs G., 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155: 349–361.
- Stevenson P.C., Haware M.P., 1999. Maackiain in *Cicer bijugum* Rech. f. associated with resistance to *Botrytis* grey mould. *Bioch. Syst. Ecol.*, 27(8): 761-767.
- Stewart A.J., Chapman W., Jenkins G.I., Graham I., Martin T., Crozier A., 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell and Environment*, 24: 1189–1197.
- Stone B.C., 1979. Protective Coloration of Young Leaves in Certain Malaysian Palms. *Biotropica*, 11: 126-126. In: Lev-Yadun S. and Gould K.S., 2008. Role of Anthocyanins in Plant Defence. In book: Anthocyanins, pp.22-28. DOI: 10.1007/978-0-387-77335-3-2
- Stout M.J., Brovont R.A., Duttey S.S., 1998. Effect of nitrogen availability on expression of constitutive and inducible chemical defenses in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of chemical ecology*, 24(6): 945-963.
- Strack D., 1997. Phenolic metabolism. In: Aleksander S. and Malgorzata N.K, 2010. Studies on influence of rapeseed vegetation stages on level of phenolic compounds. *Journal of Oilseed Brassica*, 1(1): 12-18

## Références bibliographiques

---

- Szymanski D.B., Lloyd A.M., Marks M.D., 2000. Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, 5:214–219.

### T

- Talib W.H. and Mahasneh A. M., 2010. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci. Pharm.*, 78(1): 33–45.

- Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A., 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal*, 54: 733-749

- Tanaka-Oda A., Kenzo T., Kashimura S., Ninomiya I., Wang L., Yoshikawa K. and Fukuda K., 2010. Physiological and morphological differences in heterophylly of *Sabina vulgaris* Ant. In the semi-arid to temperate and microclimate density in Finnish environment of Mu Us Desert, Inner Mongolia. *China. J. Arid. Environ.*, 74: 43-48. In: Sharaf A.A., Khafagi O.A., Hatab E.E. and Moursy M.M., 2013. Effect of altitudinal gradients on the content of carbohydrate, protein, proline and total phenols of some desert plants in Saint Katherine Mountain, South Sinai, Egypt. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 14 (1): 122-129.

- Tariq M., Ageel A.M., Al-Yahya M.A., Mossa J.S., Al-Said M.S., 1989. Anti-inflammatory activity of *Teucrium polium*. *Int. J. Tissue React.*, 11: 185-188

- Tattini M., Gravano E., Pinelli P., Mulinacci N., Romani A., 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytol.*, 148: 69–77

- Tatsuzawa F., Saito N., Yokoi M., Shigihara A., Honda T., 1998. Anthocyanins from the scarlet flowers of *Anemone coronaria*. *Phytochemistry*, 49(3): 869-874.

- Telfer A., Bollman K.M., Poethig R.S., 1997. Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124: 645–654.

- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M., 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90: 333-340.

- Teng S., Keurentjes J., Bentsink L., Koornneef M., Smeeckens S., 2005. Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the *MYB75/PAP1* gene. *Plant Physiol.*, 139:1840-52.

## Références bibliographiques

---

- **Tlili N., Nasri N., Saadaori E., Khalidi A. et Triki S. 2009.** Carotenoid and tocopherol composition of leaves, buds, and flowers of *Capparis spinosa* grown wild in Tunisia. *J. Agric. Fd. Chem.*, 57(12): 5381-5385.
- **Toufektsian M.C., Lorget M., Nagy N., Salen P., Donati M.B., Giordano L., Mock H.P., Peterek S., Matros A., Petroni K., Pilu R., Rotilio D., Tonelli C., de Leiris J., Boucher F., Martins C., 2008.** Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Nutrition*, 138: 747-752
- **Traw B.M., Bergelson J., 2003.** Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellins on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 133:1367–137
- **Triboï E., Martre P. and Triboï-Blondel A.M., 2003.** Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany*, 54(388): 1731-1742
- **Troeh F.R. and Thompson L.M., 2005.** Soils and soil fertility. 6th ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing
- **Tsuda T., Shiga K., Ohshima K., Kawakishi S., and Osawa T., 1996.** Inhibition of lipid peroxydation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Pharmacol.*, 52: 1033-1039
- **Turner G.W., Gershenzon J., Croteau R.B., 2000.** Distribution of peltate glandular trichomes on development leaves of peppermint. *Plant Physiology*, 124: 655–663

## U

- **Ulubelen A., Topcu G., and Kaya Ü., 1994.** Steroidal compounds from *Teucrium chamaedrys* subsp. *chamaedrys*. *Phytochemistry*, 36: 171D173.
- **Ulubelen A., Topcu G., Sonmez U., 2000.** Chemical and biological evaluation of genus *Teucrium*. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 23:591-648
- **Uphof J.C.T., 1962.** Plant hairs. *Encyclopedia of Plant Anatomy IV*, 5: 1–206. In: Vrachnakis T. G., 2002. On the Epidermal Elements of *Origanum calcaratum* Juss. (Labiatae). *Phyton*, 42 (1): 39-67
- **Upson T.M., Grayer R.J., Greenham J.R., Williams C.A., Al-Ghamdi F., et Chen F.H., 2000.** Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical, Systematics and Ecology*, 28: 991-1007

### V

- **Valkama E., Salminen J.P., Koricheva J. and Pihlaja K., 2004.** Changes in leaf trichomes and epicuticular flavonoids during leaf development in three birch taxa. *Annals of Botany*, 94: 233–242.
- **Valverde P.L., Fornoni J., Nunez-Farfan J., 2001.** Defensive role of leaf trichomes in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium*. *J. Evol. Biol.*, 14: 424–432
- **Verdan A.M., Wang H.C., García C.R., Henry W.P. and Brumaghim J.L., 2011.** Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105: 1314-1322.
- **Verykokidou-Vitsaropoulou E., Vajias C., 1986.** Methylated Flavones from *Teucrium polium*, *Planta Med.* (5): 401-402. In: Stefkov G., Karapandzova M., Stefova M., Kulevanova S., 2009. Seasonal variation of flavonoids in *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 55 (1, 2): 33 - 40
- **Vokou D., Margaris N.S., 1986.** Autoallelopathy of *Thymus capitatus*. *Acta Ecol.*, 7: 157-163. In: Papanastasis V.P., Kyriakakis S. and Kazakis G., 2002. Plant diversity in relation to overgrazing and burning in mountain mediterranean ecosystems. *Journal of Mediterranean Ecology*, 3(2-3): 53-63

### W

- **Wade H.K., Bibikova T.N., Valentine W.J., Jenkins G.I., 2001.** Interactions within a network of phytochrome, Cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *Plant J.*, 25: 675-685
- **Waghulde H., Kamble S., Patankar P., Jaiswal B., Pattanayak S., Bhagat C., Mohan M., 2011.** Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Seeds of *Punica Granatum* (Punicaceae) and *Solanum Torvum* (Solanaceae). *Pharmacologyonline*, 1: 193-202
- **Wagner G.J., 1991.** Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology*, 96: 675–679
- **Wagner H., Bladt S., 2001.** Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas (2nd ed.). Springer, Berlin, 349-364



## Références bibliographiques

---

- **Wagner G.J., Wang E., Shepherd R.W., 2004.** New approaches for studying and exploiting on old protuberance, the plant trichomes. *Ann. Bot.*, 93: 3-11
- **Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C., James C.M., Srinivasan N., Blundell T.L., Esch J.J., Marks M.D., Gray J.C., 1999.** The Transparent Testa Glabra1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell*, 11: 1337-1350
- **Wang H., Cao G.H., and Prior R.L., 1997.** Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 2 : 304-309
- **Wang S., Kwak S.H., Zeng Q., Ellis B.E., Chen X.Y., Schiefelbein J., Chen J.G., 2007.** Trichomeless1 regulates trichome patterning by suppressing Glabra1 in *Arabidopsis*. *Development*, 134: 3873–3882
- **Waterhouse A.L., 2002.** Wine phenolics. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 957: 21-36
- **Weber F.J. and de Bont J.A.M., 1996.** Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 12: 225- 245.
- **Weiner I.D., Wingo C.S., 1997.** Hypokalemia. Consequences, causes and correction. *Journal of The American Society of Nephrology*, 88: 1179-1188
- **Weiss D., Halevy A.H., 1991.** The role of light reaction in the regulation of anthocyanin synthesis in *Petunia corolla*. *Physiol. Plant*, 81: 127-33
- **Weiss D., 2000.** Regulation of flower pigmentation and growth: multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiol. Plant*, 110: 152-157.
- **Werker E., Fahn A., 1981.** Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Air.; development, ultrastructure and secretion. *Botan. Gazette*, 142: 461-476.
- **Werker E., Ravid U. and Putievsky E., 1985a.** Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Isr. J. Botany*, 34, 31-45. In: Bisio A., Corallo A., Gastaldo P., Romussi G., Ciarallo G., Fontana N. , De Tommasi N. and Profumo P., 1999. Glandular Hairs and Secreted Material in *Salvia blepharophylla* Brandegee exeppling Grown in Italy. *Annals of Botany*, 83: 441-452.
- **Werker E., Ravid U. and Putievsky E., 1985b.** Glandular hairs and their secretions in the vegetative and reproductive organs of *Salvia sclarea* and *S. dominica*. *Isr. J. Botany*, 34, 239-252. In: Bisio A., Corallo A., Gastaldo P., Romussi G., Ciarallo G., Fontana N. , De Tommasi N. and Profumo P., 1999. Glandular Hairs and Secreted Material in *Salvia blepharophylla* Brandegee exeppling Grown in Italy. *Annals of Botany*, 83: 441-452.

## Références bibliographiques

---

- **Werker E., Putievsky E., Ravid U., Dudai N., Katzir I., 1993.** Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Ann.Botany*, 71: 43-50.
- **Werker E., 1993.** Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae. *Flavor Fragr. J.*, 8: 249–255.
- **Werker E., 2000.** Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research*, 31: 1–35.
- **West C., 2010.** Caractérisation et classification de systèmes chromatographiques. Habilitation à Diriger des Recherches – Orléans, Université d'Orléans.
- **Wilcox C.S., Mitch W.E., Kelly R.A., Skorecki K., Meyer K.W., Friedman P.A., Souney P.F., 1983.** Response of kidney to furosemide: Importance of salt intake and renal compensation. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 102: 450- 458.
- **Wilkens R.T., Spoerke J.M., Stamp N.E., 1996.** Differential responses of growth and tow soluble phenolics of tomato to resource availability. *Ecology*, 77(11): 247-258.
- **Winkel-Shirley B., 2002.** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 218p.
- **Wooding A.R., Kavale S., Mac Ritchie F., Stoddard F.L., and Wallace A., 2000.** Effects of Nitrogen and sulfur fertilizer on protein composition, mixing requirements, and dough strength of four Wheat cultivars. *Cereal Chem.*, 77(6): 798–807

## Y

- **Yameogo N., 2003.** Etude de la contribution de l'aviculture traditionnelle urbaine et périurbaine dans la lutte contre les pathologies aviaires au Burkina Faso, CRDI. Université de Ouagadougou: UFR SIT, IDRC, Rapport AGROPOLIS, 85 p.
- **Yashodhara K., Shanmukha Rao S.R., Subba Rao J.V., 2001.** Structure, distribution and taxonomic importance of trichomes in the tribe Verbenaeae (Verbenaceae) histological investigation of the leaf and leaf-originating calli of *Lavandula vera* L. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 72: 265-285
- **Yildirim A., Mavi A. and Kara A.A., 2001.** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4083-4089

## Références bibliographiques

---

- **Yilmaz Y., Toledo R.T., 2004.** Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 255–260.
- **Yu H., Kowalski S.P., Steffens J.C., 1992.** Comparison of polyphenol oxidase expression in glandular trichomes of *Solanum* and *Lycopersicon* species. *Plant Physiol.*, 100, 1885–1890.
- **Yu O., Matsuno M., Subramanian S., 2006.** Flavonoid compounds in flowers: genetics and biochemistry. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*, 282-292.

## Z

- **Zhang F., Gonzalez A., Zhao M., Payne T., Lloyd A., 2003.** A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development*, 130: 4859-4869
- **Zhao M., Morohashi K., Hatlestad G., Grotewold E., Lloyd A., 2008.** The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development*, 135:1991-1999
- **Zhou Z., An L., Sun L., Zhu S., Xi W., Broun P., et al., 2011.** Zinc finger protein5 is required for the control of trichome initiation by acting upstream of zinc finger protein8 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 157: 673–682
- **Zhou Z., Sun L., Zhao Y., An L., Yan A., Meng X., et al., 2013.** Zinc Finger Protein 6 (ZFP6) regulates trichome initiation by integrating gibberellin and cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, 198: 699–708.



Received on 05 October, 2013; received in revised form, 16 February, 2014; accepted, 21 March, 2014; published 01 April, 2014

## EVALUATION OF DIURETIC ACTIVITY FROM *TEUCRIUM POLIUM* L. CAPITATUM EXTRACTS (LAMIACEAE) IN RATS

S. Malki\*<sup>1</sup> and A.L. Yahia<sup>2</sup>

Department of Biology, Faculty of Science, Larbi Ben M'hidi University <sup>1</sup>, Oum El Bouaghi 04000, Algeria

Department of Biology, Centre University of Mila <sup>2</sup>, Mila 43000, Algeria

### Keywords:

*Teucrium polium* L. *Capitatum*,  
Ethanollic extract, Electrolyte  
excretion, Diuretic activity, Urine  
output

### Correspondence to Author:

S. Malki

Department of Biology, Faculty of  
Science, Larbi Ben M'hidi  
University, Oum El Bouaghi 04000,  
Algeria

E-mail: malkisamra1@yahoo.fr

**ABSTRACT:** The present study was carried out to investigate the diuretic activity of the ethanollic extract of *Teucrium polium* L. *Capitatum* (Lamiaceae) in normal albino rats. The diuretic activity of extract was evaluated by determining the urine volume and electrolyte concentration in albino rats (n=4). Furosemide (20 mg/kg) was used as the reference diuretic drug while normal saline (0.9%) was used as control. Alcoholic extract of the drug (25 mg/kg and 50mg/kg) were used as tests. Urine output and electrolytes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>) excretion were estimated at the end of 8 hours. Ethanollic extract has significantly increased the volume of urine (6.70±0.09ml/100g/8hr and 8.40 ±0.46ml/100gm/8hr), and has also increased the diuretic index to 1.09 and 1.37 for 25mg/kg and 50mg/kg dose ranges respectively (P< 0.01). The test drug, when compared to the control group, displayed a significant increase in the excretion of potassium and chloride. There was an increase in the saluretic index as reflected by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio to 5.03 and 5.44 respectively for the two dosages studied when compared to furosemide which noted a saluretic index of 2.28. The extract (50 mg/kg) showed significant increase in urine volume as well as K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ion concentrations in albino rats. These findings support the traditional uses of *Teucrium polium* L. as diuretic agent in folk medicine.

**INTRODUCTION:** Diuretics are used in medicine to treat heart failure, liver cirrhosis, hypertension and some kidney disease <sup>1, 2</sup>. Proper electrolyte balance is essential for a good health and diuretics may cause electrolyte imbalance hypokalemia, hyponatremia, and hypernatremia.

Plants medicines are commonly used for the treatment of some renal diseases and have also been reported to show significant diuretic activity <sup>3</sup>.

*Teucrium polium* L. (Lamiaceae) is one of 300 species of the genus *Teucrium* and mainly it is found abundantly in south-western Asia, Europe and North Africa. It is widely distributed in Algeria.

In traditional medicaments, *Teucrium* species have been used as diuretic, anti-bacterial <sup>4-6</sup>, anti-hypertensive <sup>7</sup>, hypoglycaemic, hypolipidemic <sup>8-9</sup>, anti-inflammatory <sup>10</sup> and it has also been reported

|  |  |
|--|--|
|  | <p>QUICK RESPONSE CODE</p> <p>DOI:<br/>10.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1259-62</p> |
|  | <p>Article can be accessed online on:<br/>www.ijpsr.com</p>                      |
| <p>DOI link: <a href="http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1259-62">http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1259-62</a></p> |  |

to have antitumour<sup>10-11</sup>, hepatoprotective<sup>12</sup>, neuro-protection<sup>13</sup> and antioxidant properties<sup>14-15</sup>. Chemical analysis of *T. polium* L. has shown that it contained various compounds such as flavonoids<sup>16-17</sup>, terpenoids<sup>18</sup> and oils essentials<sup>19-21</sup>.

There is no report on the diuretic studies of *Teucrium polium* L. Considering the various uses of folk medicine as a diuretic, the purpose of the current study was to evaluate the diuretic efficacy of ethanol extract of the plant in the rat.

## MATERIALS AND METHODS:

**Preparation of *T. polium* L. extract:** The flowering tops and leaves of *T. polium* L. (200g); dried at room temperature and ground to a fine powder, and extracted with ethanol 95% under low pressure using a rotary vacuum evaporator with a yield of 47.76 %, were collected from Biskra, Algeria, in early summer 2010.

**Experimental animals:** Experiments were performed on male albino rats (*Rattus rattus*) obtained from Pasteur institute in Algeria and weighing 200-250g. They were maintained on standard light, temperature and feeding conditions for 10 days before the experiment. They were housed under standard conditions of temperature ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ), humidity ( $65 \pm 5\%$ ) and dark light cycle (12h – 12h) and were allowed access to food and water *ad libitum*. All the experimental procedures and protocols used in this study were reviewed by the Institutional Animal Ethics Committee (IAEC).

**Preliminary phytochemical screening:** The extracts of *Teucrium polium* L. were subjected to the phytochemical tests for the presence of carbohydrates, flavonoids, tannins, phenolic compounds, saponins, and steroids<sup>22</sup>.

**Diuretic activity:** The method of<sup>23</sup> was employed for the assessment of diuretic activity. The rats were divided into four groups of four rats each. Of these groups of animals, the first group served as a control and is feed with normal saline orally (25ml/kg), and the second group of animals received the same amount of normal saline in which Furosemide at a dose of 20mg/kg is dissolved. While the third and the fourth ones were treated with 20mg/kg and 50mg/kg of *T. polium* L. respectively. Immediately after administration, the animals were placed in metabolic cages (4 in each cage) specially designed to separate urine and faeces. Urine was collected in a graduated cylinder and its volume was measured at the end of 8 hours. Cumulative urine excretion was calculated in relation to body weight and expressed as ml/100 g bw. Electrolyte ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) concentrations were estimated from the urine samples by flame photometric method and expressed as mequiv./100 g bw.

**Statistical evaluation:** Results are expressed as means  $\pm$  SEM, significant differences among the groups were determined by one-way ANOVA using STATIT CF, with Newman and Keuils test, with the significant level set at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ .

**RESULTS AND DISCUSSION:** The reference diuretic Furosemide significantly increased the urine volume when compared to control ( $P < 0.01$ ), which put the diuretic index at 1.57. The two doses of ethanolic extract of *Teucrium polium* L. 20mg/kg and 50mg/kg showed a marked increase in the urine output with a dose dependent increase in the diuretic index to 1.09 and 1.37 as shown in table 1.

**TABLE 1: EFFECT OF ORAL ADMINISTRATION OF ETHANOL EXTRACT OF *TEUCRIUM POLIUM* L. CAPITATUM ON URINARY VOLUME EXCRETION**

| Group                                   | n | Urine volume (ml/100 g/8 h) | Diuretic index <sup>a</sup> | Lipschitz value <sup>b</sup> |
|---|---|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Control                                 | 4 | 6.14 $\pm$ 0.76             | -                           | -                            |
| Furosemide 20 mg/kg                     | 4 | 9.68 $\pm$ 0.49*            | 1.57                        | -                            |
| <i>Teucrium polium</i> (Et OH) 20 mg/kg | 4 | 6.70 $\pm$ 0.09*            | 1.06                        | 0.69                         |
| <i>Teucrium polium</i> (Et OH) 50 mg/kg | 4 | 8.40 $\pm$ 0.46*            | 1.37                        | 0.87                         |

The results show the mean values and standard errors; n = number of pairs used in each group. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared with the control group (Newman and Keuils's unpaired *t*-test).

<sup>a</sup> Diuretic index = volume test group/volume control group.

<sup>b</sup> Lipschitz value = Mean urine volume of test/Mean urine volume of standard.

This study indicates that urinary Na<sup>+</sup> excretion tended to be lower in control rats compared with rats treated with *T. polium* L. extract, but the difference was not statistically significant (P<0.01). Further studies demonstrated that net losses of NaCl and fluid during regular diuretic administration are limited by post diuretic renal NaCl and fluid retention<sup>24</sup>. In contrast, *Teucrium polium* L. ethanol extract caused a significant increase in K<sup>+</sup> (P<0.05) and Cl<sup>-</sup> (P<0.01) excretion.

Additional evidence indicates that potassium secretion is co-dependent on Cl<sup>-</sup> secretion<sup>25</sup> and the  $\beta$  cell in cortical collecting duct shows a coupling operation of apical H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and apical Cl<sup>-</sup> / HCO<sub>3</sub> exchange provides a new model for active KCL reabsorption<sup>26</sup>. Reduced potassium excretion was shown from the saluretic index at dose of 50mg/kg which has a value of 1.74 (1.83 for 20mg/kg dose and 3.55 for the furosemide group). The obtained observations are mentioned in **table 2**.

**TABLE 2: EFFECTS OF ORAL ADMINISTRATION OF THE ETHANOL EXTRACT OF *TEUCRIUM POLIUM* L. CAPITATUM ON URINARY ELECTROLYTE EXCRETION**

| Group                                   | Na <sup>+</sup><br>(mequiv./100 g/8 h) | K <sup>+</sup><br>(mequiv./100 g/ 8 h) | Cl <sup>-</sup><br>(mequiv./100 g/8 h) | Saluretic index <sup>a</sup> |      |      | Na/<br>K |
|---|--|--|--|------------------------------|------|------|----------|
|   |  |  |  | Na                           | K    | Cl   |          |
| Control                                 | 246.26 ± 45.70                         | 32.47± 2.17                            | 248.13±27.98                           | -                            | -    | -    | 7.58     |
| Furosemide 20 mg/kg                     | 262.56 ± 18.67                         | 115.20± 38.41*                         | 361.60±18.98**                         | 1.06                         | 3.55 | 1.46 | 2.28     |
| <i>Teucrium polium</i> (Et OH) 20 mg/kg | 300.30 ± 52.65                         | 59.63± 15.82 *                         | 332.45±69.40**                         | 1.22                         | 1.83 | 1.34 | 5.03     |
| <i>Teucrium polium</i> (Et OH) 50 mg/kg | 307.70 ± 55.08                         | 56.50± 21.13 *                         | 407.50 ±69.97**                        | 1.25                         | 1.74 | 1.64 | 5.44     |

The results show the mean values and standard errors; n = number of pairs used in each group. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 compared with the control group (Newman and keuil's unpaired t-test).

<sup>a</sup> Saluretic index = mequiv. test group/mequiv. control group.

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio of 5.03 and 5.44 were obtained for ethanolic extract at doses of 20 and 50mg/kg respectively. The increase in the ratio of concentration of excreted sodium and potassium ions indicate that the extracts of *Teucrium polium* L. increase sodium ion excretion to a greater extent than potassium which indicates the interesting potassium-saving effect of the extract.

The concentration of aldosterone is found to be dependent on the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio. Adlosterone promotes potassium excretion through its effects on Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>-ATPase and epithelial sodium and potassium channels in cortical collecting duct (CCD)<sup>27</sup>.

The preliminary phytochemical screening showed the presence of flavonoids, glycosides, saponins, carbohydrates, tannins, terpenoids and the absence of alkaloids in all the extracts.

This promotes the hypothesis that these types of polar compounds may be responsible for the diuretic effects<sup>28</sup>.

However, the effect may be produced by inhibition of tubular reabsorption of water and anions<sup>29</sup> or by producing stimulation of regional blood flow<sup>30</sup>.

**CONCLUSION:** The present study shows that the ethanolic extract of *Teucrium polium* L. significantly increases the urine output and excretion of urinary potassium and chloride and has no effect on the urinary sodium excretion. Further studies elucidating the exact molecular and cellular mechanism(s) of action are desired.

## REFERENCES:

1. Wilcose CS: New insights into diuretic use in patients with chronic renal disease. *Jam. Soc. Nephrol.* 2002; 13: 798-805.
2. Ahmed A, Zannad F, Love TE, Tallaj J, Gheorghide M, Ekundayo OJ and pitt B: A propensity-matched study of the associated of low serum potassium levels and mortality in chronic heart failure. *European Heart journal* 2007; 28:1334-1343.
3. Caceres A, Giron LM and Martnez AM: Diuretic activity of plants used for the treatment ailments in Guatemala. *Journal of Ethnopharmacol.* 1987; 19(3): 233-262.
4. Darabpour E, Motamedi H, Mansour S and nejad S: antimicrobial properties of *Teucrium polium* L. against some clinical pathogens. *Asian pacific journal of tropical medicine* 2010: 124-127
5. Darwish RM and Aburjai TA: Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on *Escherichia coli*. *Complementary and Alternative Medicine* 2010; 10:1-9
6. Belmekki N, Bendimerad N, Bekhechi C and Fernandez X: Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research* 2013; 7(14): 897-902
7. Niazmand S, Esparham M, Hassannia T, Derakhshan M, Niazmand S, Esparham M, Hassannia T and Derakhshan

- M: Cardiovascular effects of *Teucrium polium* L. extract in rabbit. *Phcog Mag.* 2011;7:260-264
8. Stefkov G, Kulevanova S, Miova B, Dinevska-Kjovkarovska S, Mølgaard P, Jäger AK and Josefsen K: Effects of *Teucrium polium* spp. *capitatum* flavonoids on the lipid and carbohydrate metabolism in rats. *Pharm Biol.* 2011; 49(9): 885-892
  9. Kasabri V, Afifi FU and Hamdan I: *In vitro* and *in vivo* acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 133(2): 888-896
  10. Menichini F, Conforti F, Rigano D, Formisano C, Piozzi F, and Senatore F: Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry* 2009; 115: 679–686
  11. Harleva E, Nevoa E, Lansky EP, Lansky S and Bishayeed A: Anticancer attributes of desert plants. *Anti-Cancer Drugs* 2012, 23:255–271
  12. Shtukmaster S, Ljubuncic P and Bomzon A: The effect of an Aqueous Extract of *Teucrium polium* on Glutathione Homeostasis *in vitro*: A Possible mechanism of Its hepatoprotectant Action. *Advances in Pharmacological Sciences* 2010: 1-7
  13. Schröder S, Beckmann K, Franconi G, Meyer-Hamme G, Friedemann T, Greten H J, Rostock M, Efferth T: Can medical herbs stimulate regeneration or neuroprotection and treat neuropathic pain in chemotherapy-induced peripheral neuropathy?. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 1-18
  14. Hasani P, Yasa N, Vosough-Ghanbari S, Mohammadirad A, Dehghan G, and Abdollahi M: *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to  $\alpha$ -tocopherol. *Acta Pharm.* 2007 ; 57: 123–129
  15. Sharififar F, Dehghn-Nudeh G and Mirtajaldini M: Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium*. *Food Chemistry.* 2009 ; 112: 885–888
  16. De Marino S, Festa C, Zollo F, Incollingo F, Raimo G, Evangelista G and Iorizzi M: Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium*. *Food Chemistry* 2012; 133: 21–28
  17. Goulas V, Gomez-Caravaca AM, Exarchou V, Gerathanassis IP, Segura-Carretero A and Gutiérrez AF: Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE- NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *LWT - Food Science and Technology* 2012; 46: 104-109
  18. Bahramikia S and Yazdanparast R: Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytother Res.* 2012; 26(11):1581-93.
  19. Stanciu G, Mititelu M and Popescu M: The GC/MS characterization of the volatile oil from *Terbium polium* L. *Ovidius. University Annals of Chemistry* 2006 ; 17(1): 119-122.
  20. Afifi FU, Abu -Irmaileh B E and Al-Noubani RA: Comparative Analysis of the Essential Oils of *Teucrium polium* L. Grown in Different Arid and Semi-Arid Habitats in Jordan . *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009 ; 2 (1) : 42-52
  21. Hammoudi R et Hadj Mahammed M : Contribution à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp. *geyii* (Lamiaceae). *Annales des Sciences et Technologie* 2010 ; 2(1): 1-5.
  22. Harborne JB: *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis.* 2nd ed. 1985, Chapman and Hall, New York: 171.
  23. Lipschitz WL, Hadidian Z and Kerpcar A: Bioassay of Diuretics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1943; 79: 97–110.
  24. Wilcox CS, Mitch WE, Kelly RA, Skorecki K, Meyer KW, Friedman PA and Souney PF: Response of kidney to Furosemide: Importance of salt intake and renal compensation. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1983; 102: 450- 458.
  25. Weiner ID and Wingo CS: Hypokalemia. Consequences, causes and correction. *Journal of The American Society of Nephrology* 1997; 88: 1179-1188.
  26. wingo SC and Armitage FE: Potassium transport in the kidney: regulation and physiologies relevance of  $H^+ -K^+ -ATPase$ . *Seminars in Nephrology* 1993; 13: 212
  27. Mc Kenna TJ, Island DP, Nicholson WE and Liddle GW: The effects of potassium on early and late steps in aldosterone biosynthesis in cells of the *Zona lomerulosa*. *Endocrinology* 1978; 103:1411-6.
  28. Chodera A, Dabrowska K, Sloderbach A, Skrzypczak L and Budzianowski J: Effect of flavonoid fractions of *Solidago virgaurea* L. on diuresis and levels of Electrolytes. *Acta pol. pharm.* 1991; 48:35-37.
  29. Pantoja CV, Chiang LCH, Norris BC and Concha JB: Diuretic, natriuretic and hypotensive effects produced by *Allium sativum* (garlic) in anaesthetized dogs. *J. Ethnopharmacol.* 1993; 31: 325–31.
  30. Stanic G and Samarzija I: Diuretic Activity of *Satureja Montana* subsp. *montana* extracts and oil in rats. *Phytother. Res.* 1993; 7: 363–66.

**How to cite this article:**

Malki S and Yahia AL: Evaluation of diuretic activity from *Teucrium polium* L. *Capitatum* extracts (Lamiaceae) in rats. *Int J Pharm Sci Res* 2014; 5(4): 1259-62. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1259-62

All © 2013 are reserved by International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. This Journal licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License.

This article can be downloaded to **ANDROID OS** based mobile. Scan QR Code using Code/Bar Scanner from your mobile. (Scanners are available on Google Playstore)

|   |  |
|---|--|
| <b>Nom &amp; prénom:</b> Malki Samira   | <b>Année Universitaire :</b> 2016/2017 |
| <b>Thème:</b> Etude morphologique, biochimique, physiologique et biologique de quelques populations de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> dans l'Est algérien   |  |
| <b>Nature du diplôme:</b> Doctorat en Sciences en Biologie Végétale<br>Option : Production Végétale   |  |
| <p><b>Résumé</b></p> <p>L'objet de notre travail a porté sur l'étude de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> une plante médicinale très répandue dans les steppes algériennes. Plusieurs volets d'étude ont été touchés tels que l'aspect morphologique, les constituants physio-biochimiques, et les effets biologiques.</p> <p>Les analyses morphologiques ont porté sur dix populations échantillonnées dans différents biotopes de l'Est algérien. Cette étude a montrée que les feuilles ont le plus faible nombre (cinq sur dix) de types de trichomes, suivies par les calices et les corolles avec huit types chacun. Ce qui confirme l'absence d'une variabilité intraspécifique chez les populations examinées. D'autre part, l'analyse des relations entre les caractères morphologiques et les facteurs du milieu d'origine, ont permis de montrer que le biotope intervient sur la longueur des trichomes.</p> <p>L'utilisation de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle sur gel polyacrylamide en présence d'un détergent (SDS-PAGE) a permis de déterminer les profils des protéines totales des dix populations. Les coefficients de similitude des bandes polypeptidiques obtenus montrent des similitudes élevées entre les populations étudiées.</p> <p>Les analyses biochimiques sur les trois phénotypes de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> ont montré que les extraits des phénotypes mauves sont les plus riches en anthocyanines, en sucres solubles et en caroténoïdes par rapport aux phénotypes rose et blanc mettant ainsi l'importance de la couleur de la fleur.</p> <p>La combinaison de certaines méthodes d'analyses chimiques; spectrophotométrie (UV) et chromatographique (CLHP) ont permis d'identifier 3 flavonoïdes dont un majoritaire la cyanidine et deux autres flavonoïdes; la quercétine et l'acide caféique.</p> <p>L'évaluation du pouvoir antioxydant qui a été réalisée en utilisant les méthodes du piégeage du radical libre DPPH et celle de la réduction du fer FRAP a indiqué que l'extrait de la population de Biskra a montré une meilleure capacité réductrice par rapport à celui de Sétif et un fort piégeage des radicaux DPPH●.</p> <p>En ce qui concerne l'activité antibactérienne, il apparait que les extraits des deux populations possèdent des propriétés antibactériennes acceptables.</p> <p>L'évaluation de l'effet pharmacologique de <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> a mis en évidence une propriété diurétique intéressante.</p> |  |
| <b>Mots clés:</b> <i>Teucrium polium</i> L. <i>Capitatum</i> , Lamiaceae, trichome, électrophorèse, CLHP, polyphenols, activité antioxydante, activité antibactérienne, effet diurétique  |  |
| <b>Laboratoire de recherche:</b> Lab/ molécules bioactives et applications Université Larbi Tébessi - Tébessa   |  |
| <p><b>Membres de jury</b></p> <p><b>Président :</b> D. KHELIFI Pr. Université des Frères Mentouri - Constantine1</p> <p><b>Rapporteur :</b> A. YAHIA Pr. Centre <i>Universitaire</i> Abdelhafid Boussouf - Mila</p> <p><b>Examineur :</b> H. GHERROUCHA Pr. Université des Frères Mentouri - Constantine1<br/>L. SAHAB Pr. Larbi Ben M'hidi - Oum El Bouaghi<br/>A.A. OULDJAOUI M.C. Université Larbi Ben M'hidi - Oum El Bouaghi</p>   |  |