

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

N° d'ordre :

Année 2011

Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

« Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) »

THÈSE

Présentée

par **M^{me} BELYAGOUBI Née BENHAMMOU NABILA**

Pour l'obtention d'un Doctorat en **Biologie**

Option : Substances Naturelles, Activités biologiques et Synthèse

Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien

Soutenue le :

Devant le jury composé de :

Président :	M ^r Chabane Sari D.	Professeur	à l'U. de Tlemcen
Examineurs	M ^r Marouf A.	Professeur	à l'U. d'Oran
	M ^r Yousfi M.	Professeur	à l'U. de Laghouat
	M ^r . Belarbi M.	Professeur	à l'U. de Tlemcen
	M ^{me} Bendimered N.	Professeur	à l'U. de Tlemcen
Directeur de thèse :	M ^{me} Atik-Bekkara F.	Professeur	à l'U. de Tlemcen

Année universitaire : 2011-2012

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) du département de Biologie, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers (SNV/STU), de l'Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Mme. ATIK-BEKKARA F, Professeur de phytochimie à la Faculté des SNV/STU de Tlemcen. Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche. Je la remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir été présent aussi souvent que possible malgré ses tâches administratives comme Chef d'équipe « Etude des composés volatils (huiles essentielles) et des composés phénoliques (flavonoïdes) au laboratoire de LAPRONA et présidente du comité scientifique. Son soutien permanent et son dynamisme m'ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur CHABANE SARI D. Directeur du laboratoire des « Produits Naturels », pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur MAROUF A, Professeur à l'Université d'Oran, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail. Je suis particulièrement reconnaissant et honoré par sa participation au jury de cette thèse.

Que Monsieur YOUSFI M. Professeur à l'Université de Laghouat, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur d'être examinateur et de participer au jury de ce travail

Il m'est aussi agréable de remercier Mme BELARBI M, Professeur à l'Université de Tlemcen de m'avoir mis à ma disposition son laboratoire et pour avoir accepté de juger ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude pour les services rendus au cours de la préparation de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Mme BENDIMERED N., Professeur à l'Université de Tlemcen, pour sa bonne humeur, son aide et ses encouragements, ainsi que pour l'attention qu'elle a bien voulu porter à ce travail, en acceptant de le juger en qualité de membre de jury.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur BOUAZZA M., Professeur à l'Université de Tlemcen ainsi que son équipe : Mme STAMBOLI H. et Mr HASSANI F., Monsieur le Professeur MAROUF A., et Monsieur BENHASSAINI H., Professeur à l'Université de Sidi-Bel-Abbes, pour m'avoir aidé à identifier les espèces végétales étudiées.

Mes remerciements vont aussi à l'égard de Monsieur BOUABDALLA H., Maître assistant à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir donnée les coordonnées géographiques de nos stations d'étude.

Ce travail n'aurait pu se faire sans le soutien de Mr GHERIB M. et Mr MASSAOUD ainsi que les membres de la conservation de la forêt de Tlemcen qui m'ont accompagné durant les sorties de cueillette de nos plantes sahariennes. Je les remercie vivement pour m'avoir orientée et guidée sur terrain.

Je remercie mes collègues et amies pour leur soutien et plus précisément BELASKRI Asma et BEKHECHI Chahrazed pour leur aide et son amitié.

Je n'oublie pas nos techniciens Mr AMEL Slimane et Mr DAHMANI Abdelkader pour leur aide matérielle.

J'adresse encore mes remerciements à tous les doctorants et les membres du laboratoire de produits naturels qui contribuent par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.

Pour terminer, je dédie ce manuscrit à ma famille, tout particulièrement mes parents pour leur soutien, leur amour et leur sagesse qui m'ont permis d'aboutir au grade de Docteur en biologie et de devenir la personne que je suis. Mes pensées vont à mes frères, mes sœurs et mes belles sœurs pour leur présence de tous les instants, leur sympathie et leur encouragements qu'ils m'ont apporté.

J'adresse un clin d'œil à mes neveux et mes nièces pour tous les moments de joie et de rigolade.

Un grand merci à mon mari Larbi pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable et le sourire dans les moments difficiles et à mon fils Imad Eddine pour la joie qu'il nous procure. Je vous aime de tout mon cœur.

ملخص

المركبات المضادة للأكسدة هي موضوع دراسات عديدة لأنه بالإضافة إلى استخدامها كمواد حافظة في المواد الغذائية عن طريق استبدال المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية، إنها تتدخل في علاج الكثير من الأمراض.

في إطار اكتشاف مواد جديدة مضادة للأكسدة من المصادر الطبيعية، إهتمنا في هذا العمل بدراسة المركبات الفينولية وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة لمستخلصات عشرة (10) نباتات طبية من الغرب و الجنوب الغربي الجزائري :

Pistacia atlantica, *Thymelaea microphylla*, *Marrubium deserti*, *Atriplex halimus*,
Anabasis articulata, *Helianthemum lippii*, *Zygophyllum album*, *Cotula cinerea*,
Inula montana و *Pentzia monodiana*

يعتني الجزء الأول من هذه الدراسة باستخراج و تقييم كمية الفينولات الكلية، الفلافونويدات و التانات عن طريق كاشف Folin-Ciocalcu، بواسطة ثلاثي كلوريد الألومنيوم واختبار الفانيلين ، على التوالي. أما الجزء الثاني فهو يخص دراسة النشاط المضادة للأكسدة لمستخلصات النبات باستخدام خمسة طرق : محاصرة الجذر DPPH^{*} ، محاصرة الهيدروكسيل (OH^{*})، إرجاع الحديد، تثبيط الأكسدة ل-β كاروتين و تقدير القدرة المضادة للأكسدة الإجمالية.

النتائج التي تم الحصول عليها تظهر ثراء *P. atlantica* ، *T. microphylla* و *M. deserti* بالبوليفينول حيث تتراوح القيمة ما بين 27.353 ± 133.74 و 285.956 ملغ / EAG / غ MS. بالنسبة للنباتات الأخرى، يتراوح محتوى البوليفينول بين 3.776 و 74.211 ± 1.188 ملغ/غ. مستويات الفلافونويدات و التانات المعرب عنها بنظائر كاتشين هي في حدود 0.564 و 12.441 ملغ/غ و 1.421 و 25.021 ملغ/غ، على التوالي.

تظهر اختبارات النشاط المضاد للأكسدة أن كل المستخلصات النباتية المدروسة تظهر خصائص مضادة للأكسدة في مستويات مختلفة. يحتوي جزء خلات الإيثيل من ثمار *P. atlantica* على أفضل قدرة إرجاعية (IC₅₀ = 0.055 ± 0.002 ملغ / مل) مقارنة بحمض الأسكوربيك (IC₅₀ = 0.063 ± 0.002 ملغ / مل) ، و هي قوية المحاصرة لجذور DPPH^{*} (EC₅₀ = 14.641 ملغ مضاد للأكسدة / غ DPPH^{*}) و (OH^{*} EC₅₀ = 0.271 ملغ / مل) مقارنة بـ BHA (EC₅₀ = 0.271 ملغ / مل) على التوالي، ولكن قدرة تثبيط التبييض ضعيفة ل-β كاروتين (EC₅₀ = 3.524 ملغ / مل). هذا الجزء لديه قدرة مضادة للأكسدة كلية نحو 31.209 ± 1.874 ملغ / EAA / غ. فيما يخص المستخلصات الأخرى، *P. atlantica* و جزئها البيتانولي، *H. lippii* (سيقان ، أوراق و ثمار) ، *I. montana* و *A. articulata* أظهرت قدرات مضادة للأكسدة أقل أهمية ولكن مثيرة للاهتمام بالمقارنة مع مستخلصات *A. halimus* ، *Z. album* ، *C. cinerea* ، *P. monodiana* ، *M. deserti* و *T. microphylla* والتي لديها نشاطات منخفضة.

سجلنا وجود علاقة إيجابية بين التجارب الخمس، وهو ما يفسر مساهمة أكثر من 20 ٪ من المواد المضادة للأكسدة للنبات و بصفة خاصة التانات (R² = 0.7337-0.9393) و الفلافونويدات (R² = 0.5917-0.9221).

الكلمات المفتاحية : النباتات الطبية، البوليفينول ، الفلافونويدات، التانات، النشاطات المضادة للأكسدة، CAT، إرجاع الحديد، DPPH^{*}، OH^{*} ، β-كاروتين.

Résumé

Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car, en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies.

Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des composés phénoliques et l'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits de dix (10) plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien : *Pistacia atlantica*, *Thymelaea microphylla*, *Marrubium deserti*, *Atriplex halimus*, *Anabasis articulata*, *Helianthemum lippii*, *Zygophyllum album*, *Cotula cinerea*, *Pentzia monodiana* et *Inula montana*.

La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins par le réactif du Folin-Ciocalcu, par le trichlorure d'aluminium et par le test de vanilline respectivement.

La deuxième partie est l'étude de l'activité antioxydante des extraits de plantes en utilisant ainsi cinq techniques : piégeage du radical DPPH[•], piégeage de l'hydroxyle ([•]OH), réduction de fer, inhibition de l'oxydation du β-carotène et la quantification de la capacité antioxydante totale.

Les résultats obtenus montrent la richesse de *P. atlantica*, *T. microphylla* et *M. deserti* en polyphénols dont la teneur varie entre 133.744 ± 27.353 et 285.956 mg EAG/ g MS. Pour les autres plantes, le contenu en polyphénols est compris entre 3.776 et 74.211 ± 1.188 mg EAG/ g MS. Les teneurs en flavonoïdes et tannins exprimées en équivalent de catéchine sont de l'ordre de 0.564 à 12.441 mg/ g et 1.421 à 25.021 mg/ g respectivement.

Les méthodes de l'activité antioxydante montrent que tous les extraits des plantes étudiées présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux. La fraction acétate d'éthyle des fruits de *P. atlantica* possède une meilleure capacité réductrice ($IC_{50} = 0.055 \pm 0.002$ mg/ ml) par rapport à l'acide ascorbique (0.063 ± 0.002 mg/ ml), un fort piègeur des radicaux DPPH[•] ($EC_{50} = 14.641$ mg Antioxydant/ g DPPH) et [•]OH ($EC_{50} = 0.271$ mg/ ml) par rapport aux BHT ($EC_{50} = 13.468$ mg/g) et BHA ($EC_{50} = 0.306$ mg/ ml) respectivement, mais un faible pouvoir inhibiteur du blanchiment du β-carotène ($EC_{50} = 3.524$ mg/ ml). Cette fraction a une capacité antioxydante totale de l'ordre de 31.209 ± 1.874 mg EAA/ g. Concernant les autres extraits, *P. atlantica* et sa fraction butanolique, *H. lippii* (tiges, feuilles et fruits), *I. montana* et *A. articulata* montrent des pouvoirs antioxydants moins importants mais intéressants comparativement aux extraits d'*A. halimus*, *Z. album*, *C. cinerea*, *P. monodiana*, *M. deserti* et *T. microphylla* qui ont des activités faibles.

Nous avons enregistré une corrélation positive entre les cinq tests, ce qui explique la contribution de plus de 20 % des antioxydants de la plante particulièrement les tannins ($R^2 = 0.7337- 0.9393$) et les flavonoïdes ($R^2 = 0.5917 - 0.9221$).

Mots clés : Plantes médicinales ; Polyphénols ; Flavonoïdes ; Tannins ; Activités antioxydantes ; CAT ; Réduction de fer ; DPPH[•] ; [•]OH ; β-carotène.

Abstract

The antioxidant compounds are the subject of many works because, in addition to their use as conservatives in the foodstuffs by replacing synthesis antioxidants, they intervene in the treatment of many diseases.

Within the framework of discovered new antioxidants from the natural sources, we have investigated in this work, the study of phenolic compounds and the evaluation of the antioxidant properties of extracts from ten (10) medicinal plants in the west and south-west Algeria : *Pistacia atlantica*, *Thymelaea microphylla*, *Marrubium deserti*, *Atriplex halimus*, *Anabasis articulata*, *Helianthemum lippii*, *Zygophyllum album*, *Cotula cinerea*, *Pentzia monodiana* et *Inula montana*.

The first part of this study concerns the extraction and the quantification of total phenolics, flavonoids and tannins by the Folin-Ciocalciu reagent, the aluminium trichloride and the vanillin test respectively.

The second part is the study of the antioxidant activity of the plants extracts using five techniques: DPPH radical scavenging, hydroxyl radical scavenging ($\cdot\text{OH}$), iron reducing power, β -carotene bleaching method and quantification of total antioxidant capacity.

The results obtained showed the richness of *P. atlantica*, *T. microphylla* and *M. deserti* of phenolic compounds which the content varies between 133.744 ± 27.353 and 285.956 mg GAE/g DM. For the other plants, the polyphenol contents ranged from 3.776 to 74.211 ± 1.188 mg GAE/g DM. The flavonoids and tannins contents expressed as catechine equivalent were about 0.564 to 12.441 mg/g and 1.421 to 25.021 mg/g respectively.

The antioxidant activity methods showed that all the plant extracts present the antioxidant properties at various levels. The ethyl acetate fraction from *P. atlantica* fruits has a better reducing capacity ($\text{IC}_{50} = 0.055 \pm 0.002$ mg/ml) compared to the ascorbic acid (0.063 ± 0.002 mg/ml), a strong scavenging of radicals DPPH \cdot ($\text{EC}_{50} = 14.641$ mg Antioxidant /g DPPH) and $\cdot\text{OH}$ ($\text{EC}_{50} = 0.271$ mg/ ml) compared to BHT ($\text{EC}_{50} = 13.468$ mg/g) and BHA ($\text{EC}_{50} = 0.306$ mg/ ml) respectively, but a weak inhibiting capacity of β - carotene bleaching ($\text{EC}_{50} = 3.524$ mg/ ml). This fraction has a total antioxidant capacity of 31.209 ± 1.874 mg AAE/ g. Concerning the other extracts, *P. atlantica* and its butanolic fraction, *H. lippii* (stems, leaves and fruits), *I montana* and *A. articulata* showed a less significant antioxidant capacities but interesting comparatively to the extracts of *A. halimus*, *Z. album*, *C. cinerea*, *P.monodiana*, *M. deserti* and *T. microphylla* which have weak activities.

We recorded a positive correlation between the five tests, which explains the contribution of more than 20 % of plant antioxidants particularly the tannins ($R^2 = 0.7337-0.9393$) and the flavonoids ($R^2 = 0.5917 - 0.9221$).

Keywords: Medicinal plants; Polyphenols; Flavonoids; Tannins; antioxidant activity; TAC; Reducing power; DPPH \cdot ; $\cdot\text{OH}$; β -carotene.

Table des matières

<i>Introduction</i>	2
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE 1 : Composés phénoliques	5
1. Généralités.....	5
2. Biosynthèse	6
3. Classes des poly phénols	7
3.1. Flavonoïdes	8
3.2. Anthocyanosides	11
3.3. Tannins	11
3.4. Phénols simples et les acides phénoliques	12
3.5. Coumarines.....	13
3.6. Quinones.....	13
3.7. Stilbène.....	13
3.8. Lignanes	13
4. Propriétés biologiques des poly phénols	14
CHAPITRE 2 : Présentation des plantes étudiées	17
1. <i>Pistacia atlantica</i> (Photo 1).....	17
1.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).....	17
1.2. Description botanique de <i>Pistacia atlantica</i>	17
1.3. Propriétés et usages thérapeutiques.....	18
1.4. Travaux antérieurs.....	19
2. <i>Thymelaea microphylla</i> (Photo 2).....	20
2.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).....	20
2.2. Description botanique de <i>Thymelaea microphylla</i>	20
2.3. Propriétés et usages thérapeutiques.....	21
2.4. Travaux antérieurs.....	21
3. <i>Marrubium deserti</i> (Photo 3).....	21
3.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).....	21
3.2. Description botanique de <i>Marrubium deserti</i>	21

3.3. Propriétés et usages thérapeutiques.....	22
3.4. Travaux antérieurs.....	22
4. <i>Atriplex halimus</i> (Photo 4)	23
4.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).....	23
4.2. Description botanique d' <i>Atriplex halimus</i>	23
4.3. Propriétés et usages thérapeutiques d' <i>A. halimus</i>	24
4.4. Travaux antérieurs.....	24
5. <i>Anabasis articulata</i> (Photo 5)	25
5.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).....	25
5.2. Description botanique d' <i>Anabasis articulata</i>	25
5.2. Propriétés et usages thérapeutiques.....	26
5.3. Travaux antérieurs.....	26
6. <i>Helianthemum lippii</i> (Photo 6).....	26
6.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).....	26
6.2. Description botanique d' <i>Helianthemum lippii</i>	27
6.3. Propriétés et usages thérapeutiques.....	27
6.4. Travaux antérieurs.....	28
7. <i>Zygophyllum album</i> (Photo 7)	28
7.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).....	28
7.2. Description botanique de <i>Zygophyllum album</i>	28
7.3. Propriétés et usages thérapeutiques.....	29
7.4. Travaux antérieurs.....	29
8. <i>Cotula cinerea</i> (Photo 8).....	30
8.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).....	30
8.2. Description botanique de <i>Cotula cinerea</i>	30
8.3. Propriétés et usages thérapeutiques.....	31
8.4. Travaux antérieurs.....	31
9. <i>Pentzia monodiana</i> (Photo 9).....	31
9.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).....	31
9.2. Description botanique de <i>Pentzia monodiana</i>	31
9.3. Propriétés et usages thérapeutiques.....	32
9.4. Travaux antérieurs.....	32
10. <i>Inula montana</i> (Photo 10)	32
10.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).....	32
10.2. Description botanique d' <i>Inula montana</i>	32

10.3. Propriétés et usages thérapeutiques.....	33
10.4. Travaux antérieurs.....	33
CHAPITRE 3 : Radicaux libres et pouvoir antioxydant	34
1. Généralités.....	34
2. Différents types des radicaux libres	34
3. Origine de production des ERO	34
4. Dommages oxydatives des radicaux libres	35
5. Moyens de défense contre les radicaux libres.....	35
5.1. Prévention à plein temps	35
5.2. Détoxification active suite à une attaque oxydante.....	36
5.3. Détoxification passive	36
6. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes <i>in vitro</i>	38
<i>PARTIE EXPERIMENTALE</i>	40
CHAPITRE 1 : Extraction et teneurs en composés phénoliques	41
1. Introduction.....	41
2. Matériel végétal.....	42
2.1. Choix des plantes.....	42
2.2. Situation géographique des stations d'étude	42
2.3. La récolte du matériel végétal	45
2.4. Identification botanique.....	45
3- Extraction des composés phénoliques	45
3. 1. Préparation des extraits bruts (composés phénoliques).....	45
3.2. Extraction des flavonoïdes des fruits rouges de <i>Pistacia atlantica</i>	46
3.2.1. Extraction par le méthanol	46
3. 2. 2. Extraction des flavonoïdes par l'acétate d'éthyle et n-butanol	46
4. Dosage des phénols totaux	46
5. Dosage des flavonoïdes.....	47
6. Dosage des tannins condensés.....	47
CHAPITRE 2 : Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes ..	48
1. Activité antioxydante totale (TAC).....	48
2. Réduction de fer	48

3. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)	49
4. Piégeage du radical hydroxyle	50
5. Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique	51
6. Analyse statistique.....	52
<i>PARTIE RESULTATS</i>	53
CHAPITRE 1 : Rendements et teneurs des composés phénoliques	54
1. Rendements des extraits bruts	54
2. Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins.....	55
CHAPITRE 2 : Pouvoir antioxydant des composés phénoliques	58
1. Introduction	58
2. Méthode de la Capacité antioxydante totale (CAT).....	58
3. Réduction de fer	61
4. Piégeage du radical libre DPPH [•]	65
4.1. -Fraction résiduelle du DPPH [•] (DPPH [•] _{res}) en fonction du temps	65
4.2. Fraction résiduelle du DPPH [•] (DPPH [•] _{res}) en fonction des concentrations des antioxydants	71
5. Piégeage du radical hydroxyle	79
6. Méthode du blanchiment du β -carotène.....	83
<i>PARTIE DISCUSSION</i>	87
1. Rendements et teneurs des composés phénoliques	88
2. Activité antioxydante	89
<i>CONCLUSION GENERALE</i>	93
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	97
<i>COMMUNICATIONS & PUBLICATIONS</i>	109

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier <i>et al.</i> , 2006)	8
Tableau 2 : Lieu de récolte des plantes et caractéristiques géographiques et bioclimatiques des stations d'étude (Encarta, 2009)	43
Tableau 3 : Rendements des extraits bruts méthanoliques	54
Tableau 4 : Teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes des dix plantes.....	56
Tableau 5 : Valeurs de la concentration IC ₅₀ des extraits des plantes étudiées	62
Tableau 6 : Comportements cinétiques des extraits bruts et des contrôles.....	69
Tableau 7 : Détermination des concentrations EC ₅₀ , le temps et l'efficacité antiradicalaire des extraits et des contrôles	75

Liste des figures

Figure 1 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier <i>et al.</i> , 2006). PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase	7
Figure 2 : Structure du 2-phényle chromane	9
Figure 3 : Structure générale des flavonoïdes	9
Figure 4 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen, 2002)	10
Figure 5 : Structure des anthocyanosides	11
Figure 6 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)	12
Figure 7 : Structure de l'acide lipoïque et l'acide dihydrolipoïque (Valko <i>et al.</i> , 2006)	37
Figure 8 : Situation géographique des stations d'étude (Encarta, 2009).....	44
Figure 9 : Protocole d'extraction des flavonoïdes (Bekkara <i>et al.</i> , 1998).....	46
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux	55
Figure 11 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	55
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.....	55
Figure 13 : Comparaison de la capacité antioxydante totale des extraits des plantes étudiées...	58
Figure 14 : Relation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et les tannins (B)	60
Figure 15 : Pouvoir réducteur des extraits des plantes étudiées.....	61
Figure 16 : Corrélation entre la réduction de fer exprimée en valeur IC ₅₀ et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et les tannins (B).....	64
Figure 17 : Réduction de l'absorbance en fonction du temps des fruits de <i>P. atlantica</i> (la fraction acétate d'éthyle).....	65
Figure 18 : Courbe d'étalonnage du radical DPPH [•]	66
Figure 19 : Fraction résiduelle du DPPH [•] des extraits des plantes étudiées et des contrôles positifs en fonction du temps.....	68
Figure 20 : Fractions résiduelles du DPPH [•] (DPPH [•] _{res}) à la phase stationnaire en fonction des concentrations des extraits et des contrôles (mg d'antioxydant/g DPPH [•])	73
Figure 21 : Détermination du temps nécessaire à aboutir à la phase stationnaire de la concentration EC ₅₀ pour l'extrait brut des fruits de <i>P. atlantica</i>	74

Figure 22 : Corrélation entre l'efficacité antiradicalaire et les teneurs en flavonoïdes et les tannins	78
Figure 23 : Pourcentages d'inhibition de l'oxydation du désoxyribose induits par le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton en fonction des concentrations	79
Figure 24 : Comparaison des concentrations EC ₅₀ des extraits des plantes étudiées.....	80
Figure 25 : Corrélation entre la capacité du piégeage du radical hydroxyle exprimée en valeur EC ₅₀ et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et les tannins (B).....	82
Figure 26 : Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β-carotène en fonction des concentrations des extraits des plantes étudiées.....	83
Figure 27 : Activité antioxydante exprimée en valeurs EC ₅₀ par le système β-carotène/ acide linoléique des extraits.....	84
Figure 28 : Corrélation entre les valeurs EC ₅₀ du test du blanchiment du β-carotène et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et tannins (B)	85
Figure 29 : Corrélation entre la CAT et les valeurs EC ₅₀ , IC ₅₀ et AE.....	86
Figure 30 : Principaux éléments de l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	92

Liste des photos

Photo 1 : Fruits de <i>Pistacia atlantica</i> Desf.....	18
Photo 2 : <i>Thymelaea microphylla</i> Coss et Dur.....	20
Photo 3: <i>Marrubium deserti</i> De Noé. (A* : www.sahara-nature.com).....	22
Photo 4 : <i>Atriplex halimus</i> L.....	24
Photo 5 : <i>Anabasis articulata</i> (Forsk.) Moq.....	25
Photo 6 : <i>Helianthemum lippii</i> (L) Pers. (A* : www.sahara-nature.com)	27
Photo 7 : <i>Zygophyllum album</i> L	29
Photo 8 : <i>Cotula cinerea</i> L (A* : www.sahara-nature.com)	30
Photo 9 : <i>Pentzia monodiana</i> (A* : www.sahara-nature.com)	32
Photo 10 : <i>Inula montana</i> L.....	33

Abréviations

ABTS : acide 2,2'-azinobis 3-ethylbenzo-triazoline-6-sulphonate

ADN : acide désoxiribonucléique

AE : efficacité antiradicalaire

AMP cyclique : Adénosine monophosphate cyclique

ATP : Adénosine triphosphate

β -CLAMS : Système Modèle β -Carotène-Acide Linoléique (*β -carotene-linoleate model system*)

BHA : butylhydroxyanisole

BHT : butylhydroxytoluène

CAT : capacité antioxydante totale (*Total antioxidant capacity*)

C4H : cinnamate 4-hydroxylase.

ClO^- : hypochlorite

DMPD : N, N- dimethyl- ρ -phenylenediamine

DO : densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EAA : équivalents d'acide ascorbique

EAG : équivalent d'acide gallique

EC : équivalent de catéchine

EC_{50} (IC_{50}) : concentration inhibitrice à 50 %

EC-SOD : superoxyde dismutase extracellulaire

EDTA : acide éthylène diamine tétracétique

ERO : espèces réactives de l'oxygène

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

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

HOCl : acide hypochloreux

GSH : glutathion réduit

GSH-Px : glutathion peroxydes

GSSG : glutathion oxydé

GST : glutathion-S-transférase

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

MDA : malonaldéhyde

min : minute

MS : matière sèche

NADPH : nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (sous sa forme réduite)

NO[•] : monoxyde d'azote

O₂^{•-} : anion superoxyde

[•]O₂ : oxygène singulet

OH : groupe hydroxyle

[•]OH : radical hydroxyle

ONOOH : nitroperoxyde

ORAC : Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

PAL : phénylalanine ammonia-lyase

PCL : photochimiluminescence (*Photochemiluminescence assay*)

ROO[•] : radical peroxyde

ROOH : peroxydes organiques

TEAC : capacité antioxydante équivalente de Trolox (*trolox-equivalent antioxidant capacity*)

T_{EC50} : temps nécessaire pour aboutir la concentration EC₅₀

TOSC : Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux (*Total Oxyradical Scavenging Capacity*)

Trolox : un analogue de vitamine E (Acide 6-hydroxy-2, 5, 7, amidinopropane)

UV : ultraviolet

XO : xanthine oxydase

Introduction générale

Introduction générale

Depuis la nuit des temps, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Ni le hasard, ni la religion et ni la superstition qui a guidé la médecine traditionnelle à employer une plante plutôt qu'une autre. Certainement, c'est l'expérience où les gents apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes (**Iserin, 2001**).

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Iserin, 2001**). Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l'efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé publique.

Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO). Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires. Quelque soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides. En appuyant sur cette vision, un renouveau de la phytothérapie vers cette vague verte qui produit une foule des antioxydants à fin de contrer et piéger ces oxydants.

En effet, les antioxydants naturels font l'objet de nombreuses recherches et une nouvelle haleine vers l'exploitation des métabolites secondaires généralement et les polyphénols particulièrement tant dans la santé et vis-à-vis des maladies pernicieuses (cancer) que dans l'industrie agro-alimentaire. Ces composés qui sont représentés par la famille des flavonoïdes (flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes et anthocyanidines), sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques : antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-carcinogènes. Notant que l'efficacité puissante de ces substances à stopper les réactions radicalaires en neutralisant les radicaux libres est due principalement à leurs structures phénoliques avec la présence des groupements hydroxyles.

Pour cela, les progrès dans le domaine des antioxydants sont accentués d'où le nombre de plantes médicinales disponibles commercialement est de l'ordre de 1800 espèces aux Etats-Unis (**Small et Catling, 2000**). Entre 1940 et 2002, 40 % des médicaments anticancéreux étaient des produits naturels et leurs dérivés, par contre seulement 8 % ont été synthétiques et même imités de ces produits (**Newman et al., 2003**).

Comparativement des pays du Maghreb, la flore algérienne est représentée par 3000 espèces et 1000 genres (**Hanifi, 1991**), celle de la Tunisie compte 2103 espèces et 742 genres (**Nabli, 1991**), alors que la flore totale marocaine est représentée par 4200 espèces et sous-espèces avec 940 genres et 135 familles (**Ibn Tatou et Fennane, 1991**).

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des antioxydants naturels en évaluant les propriétés antioxydantes des polyphénols de dix (10) plantes médicinales d'origine saharienne et méditerranéennes (*Pistacia atlantica*, *Thymelaea microphylla*, *Marrubium deserti*, *Atriplex halimus*, *Anabasis articulata*, *Helianthemum lippii*, *Zygophyllum album*, *Cotula cinerea*, *Pentzia monodiana* et *Inula montana*).

Dans la première partie et en premier chapitre de ce manuscrit, nous avons commencé par une étude bibliographique des composés phénoliques, leur biosynthèse et quelques activités biologiques attribués à différentes familles de ces composés.

Dans le deuxième chapitre, nous rappelons la description (les caractères botaniques et la systématique) des différentes espèces végétales, l'intérêt biologique et quelques travaux antérieurs réalisés sur ces plantes.

Le troisième chapitre portera sur l'étude des radicaux libres, ceci est suivi par un rappel de quelques méthodes les plus utilisées (piégeage du radical DPPH, réduction de fer...) pour évaluer le pouvoir antioxydant *in vitro*.

Dans la deuxième partie, nous avons envisagé la partie expérimentale qui se déroule en deux axes :

Dans le premier axe, nous avons réalisé l'extraction et la détermination des teneurs en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tannins). Dans le deuxième axe, nous sommes intéressés à évaluer le pouvoir antioxydant des extraits des plantes par cinq techniques chimiques.

Enfin, dans la troisième partie, nous avons rapporté les résultats obtenus entre autre les rendements, les teneurs des composés phénoliques et l'étude de l'activité antioxydante des extraits des différentes plantes.

Partie bibliographique

CHAPITRE 1 : Composés phénoliques

1. Généralités :

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton, 1993**). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés (**Mompon et al., 1998**). Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle et al., 2004**). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (**Harbone, 1993**).

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthonés et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué (**Figure 1**). La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (**Bruneton, 1993**).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportant le reste (**Middleton et al., 2000**).

Les recherches des dix à quinze dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans des processus vitaux les plus divers. Le mode de leur action et sa signification physiologique ne sont pas encore toujours claires. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement, la verticilliose. Le phénomène d'accumulation des substances phénoliques dans

les tissus végétaux infectés ou dans les zones proximales est également observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques (**Brzowska et al., 1973**) et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre (**Loche, 1966**).

Des travaux plus anciens (**Nitsch et Nitsch, 1961; Alibert et al., 1977**) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ces propriétés antifongique et antibactérienne (**Heimeur et al., 2004**). Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons : les flavanones sont responsables de l'amertume des *Cistus* et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée (**Dubois et al., 1977**), les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs.

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

2. Biosynthèse :

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (**Figure 1**). Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïque, acétophénone, lignanes et lignines, coumarines (**Bruneton, 1993**).

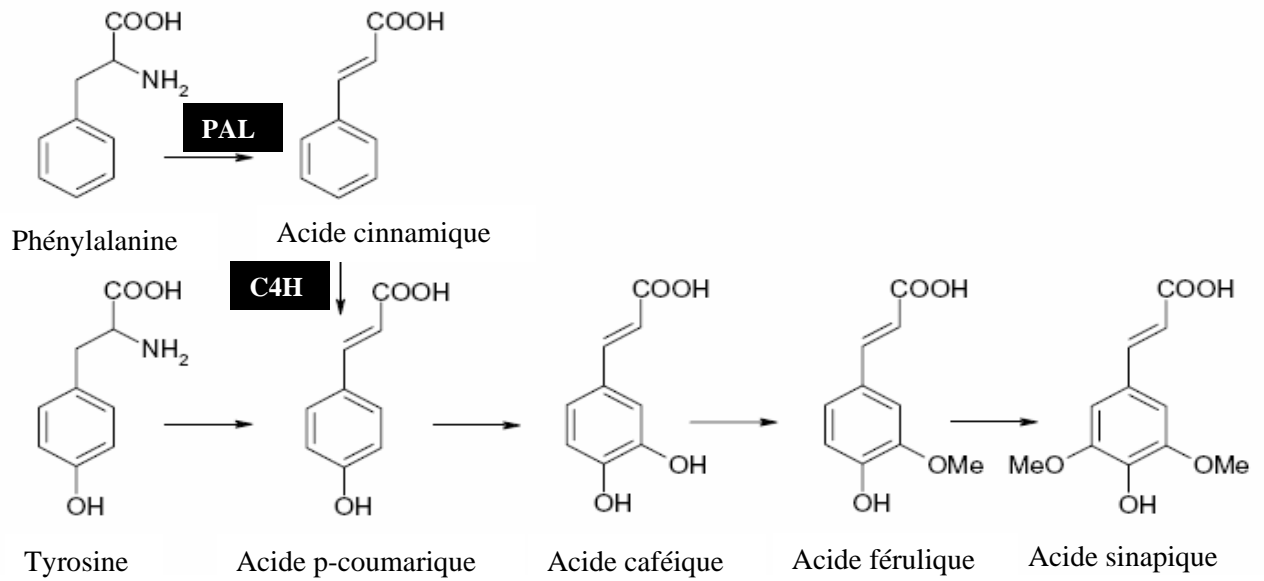

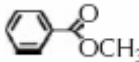
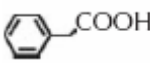
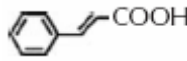
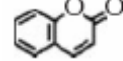
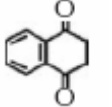
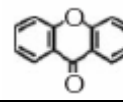
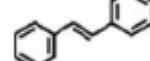
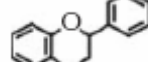


Figure 1 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier *et al.*, 2006). PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase.

3. Classes des polyphénols :

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 1). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	acétophénonés	Gallacetophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphénylacétique	
9	C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinamiques	Acide p-coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculitine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

3.1. Flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata *et al.*, 1978), dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C₆-C₃-C₆ de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao *et al.*, 2004) (Figures 2 et 3).

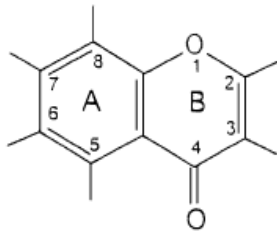


Figure 2 : Structure du 2-phényle chromane

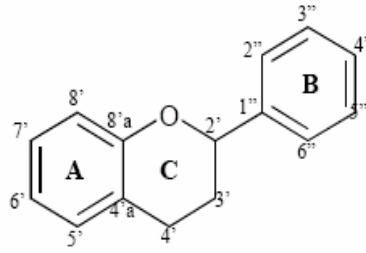


Figure 3 : Structure générale des flavonoïdes

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C₂-C₃, du groupe 3-Oet la fonction 4-oxo (Yao *et al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003) (Figure 4).

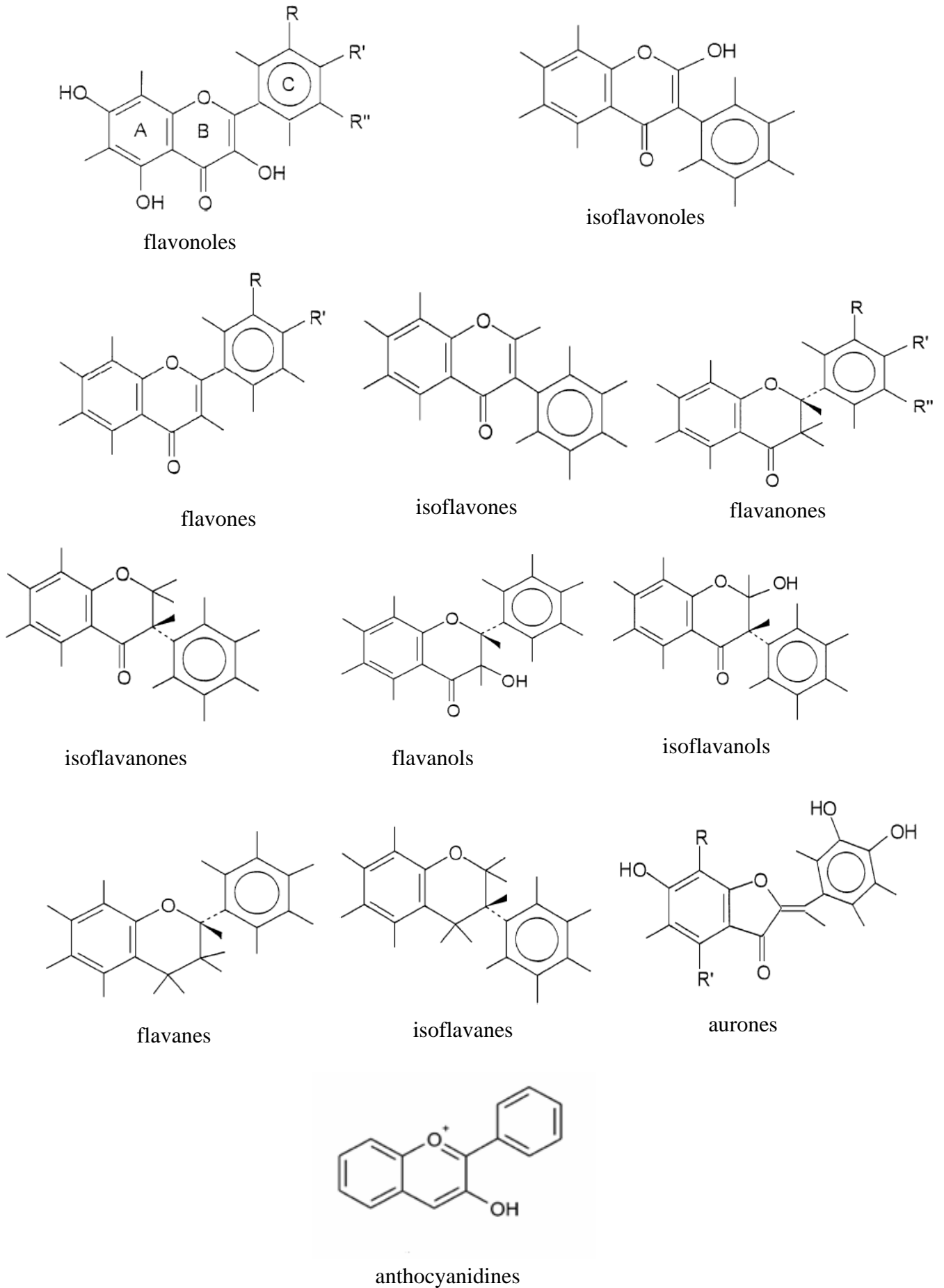


Figure 4 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen, 2002)

3.2. Anthocyanosides :

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (**Bruneton, 1993**). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (**Brouillard et al., 1997 in Bahorum, 1997**).

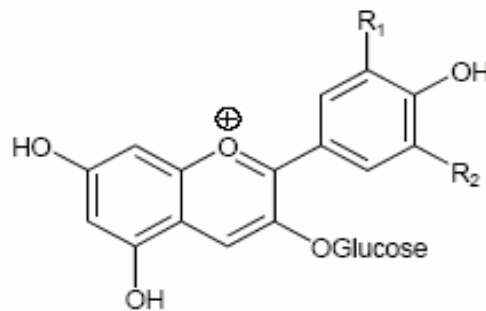


Figure 5 : Structure des anthocyanosides

3.3. Tannins :

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Haslam, 1996 ; Cowan, 1999**). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (**Scalbert, 1991**). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

3.3.1. Tannins hydrolysables qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (**Figure 6**) (**Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999**).

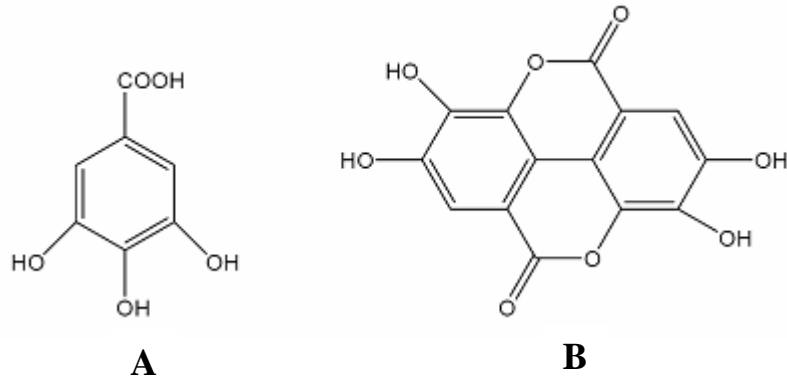


Figure 6 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

3.3.2. Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (Bruneton, 1999).

3.4. Phénols simples et les acides phénoliques :

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

3.4.1. Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque : les acides phénols en C₆-C₁, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique (Bruneton, 1993).

3.4.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique : la plupart des acides phénols en C₆-C₃ (acides p-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large ; les autres (acides o-coumarique, o-férulique) sont peu fréquents (Bruneton, 1993). Les acides cinnamique et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés

phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation (**Cowan, 1999**).

3.4.3. Phénols simples : tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montrés pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes (**Cowan, 1999**).

3.5. Coumarines :

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C₆-C₃, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone (**O'Kennedy et Thornes, 1997**) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (**Cowan, 1999**).

3.6. Quinones :

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (**Cowan, 1999**).

3.7. Stilbène :

Les membres de cette famille possèdent la structure C₆-C₂-C₆ comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (**Crozier et al., 2006**).

3.8. Lignanes :

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C₆-C₃). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante dix familles.

4. Propriétés biologiques des polyphénols :

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (**Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007**). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (**Nijveldt *et al.*, 2001**).

Les effets bénéfiques **des polyphénols** intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (**Leong et Shui, 2002**). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (**Hennebelle *et al.*, 2004**).

En ce qui concerne **les flavonoïdes**, ces composés peuvent empêchés les dommages oxydatifs par différentes mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (**Hodek *et al.*, 2002**) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (**Van Acker *et al.*, 1996 ; Benavente-Garcia *et al.*, 1997**). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des

allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (**Anderson et al., 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao et al., 2004**). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-œstrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion. D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers *Citrus*) et le fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (**Hennebelle et al., 2004**).

Les anthocyanes sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire (vigne rouge, *Vitis vinifera* L.), mais aussi comme diurétiques, voire même antiseptiques urinaires. Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (myrtille, *Vaccinium myrtillus* L. ; cassis, *Ribes nigrum* L.) (**Hennebelle et al., 2004**). Présente comme des couleurs brillant dans les fruits et les légumes, les anthocyanidines ont montré leur effet inhibiteur de la croissance des lignées cellulaires humaines (**Zhang et al., 2005**).

Les tanins sont considérés comme des anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie (**Chung et al., 1998**). Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (chêne, *Quercus* spp.). Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus* spp.) seraient de bons sédatifs cardiaques (**Hennebelle et al., 2004**). Concernant le pouvoir antioxydant des tannins, cette propriété est très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tannins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres (**Rahman et al., 2006**), ils inhibent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages *in vitro* (**Yoshida et al., 1999**).

Les **coumarines** sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives (**Hennebelle et al., 2004**). Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (**Anderson et al., 1996**).

Les **acides phénols et ces dérivés** sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (**Hennebelle *et al.*, 2004**). Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (**Bossokpi, 2002**). Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (**Cowan, 1999**). Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuse du poumon chez les souris *in vitro* et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer (**Kawada *et al.*, 2001 in Rangkadilok *et al.*, 2007**). Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux (**Lee *et al.*, 2005**).

Certaines **quinones**, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula* L.), les sénés (*Cassia* spp.) et les aloès (*Aloe* spp.). D'autres activités antidépressives (hypericin), anti-protozoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites et plusieurs molécules du groupe ont une toxicité non négligeable. (**Bruneton, 1993 ; Hennebelle *et al.*, 2004**).

CHAPITRE 2 : Présentation des plantes étudiées

1. Pistacia atlantica (Photo 1) :

1.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Rosidées

Ordre : Sapindales (Rutales)

Famille : Anacardiacees- Térébinthacées

Genre Espèce : *Pistacia atlantica* Desf.

Noms vernaculaires : betoum en arabe local et Iggh en berbère (Quezel et Santa, 1963 ; Ozenda, 2004).

1.2. Description botanique de *Pistacia atlantica* :

Le pistachier de l'Atlas (ou *Pistacia atlantica* Desf) est un bel arbre à odeur simplement résineuse (Belhadj, 2001 ; Quezel et Santa, 1963).

Les feuilles sont caduques, composées, imparipennées ; 3 à 5 folioles ovales acuminées. Les fruits sont appelés Elkhodiri par les populations locales, appellation due à la prédominance de la couleur vert foncé maturité. Ce sont des drupes comestibles de la grosseur d'un pois, légèrement ovales et aplaties, riches en huile dense très énergétique. Ils sont récoltés en septembre octobre.

L'écorce produit une résine mastic qui exsude naturellement de façon abondante par temps chaud (Belhadj, 2001).

La floraison a lieu en été en panicule de petites fleurs apétales (1 à 3) et 1 à 5 sépales. Elle peut atteindre 15 à 20 m de la hauteur dont la croissance est lente et ne produit qu'à partir de 5 à 7 ans (Atli *et al.*, 2001).

Il existe à l'état disséminé dans toute l'Algérie : régions semi-arides et arides, dans la région de Djelfa (Senalba, Ain Oussera, Messaad), Laghouat (partie sud) et Ghardaia (dans l'oued m'zab) (Belhadj, 2001). Aussi, il préfère les rocailles, pâturages arides, sauf dans les zones très arrosées (Quezel et Santa, 1963).



Photo 1 : Fruits de *Pistacia atlantica* Desf

1.3. Propriétés et usages thérapeutiques :

Les espèces du genre *Pistacia* occupent une place appréciable dans la médecine traditionnelle et pharmaceutique depuis l'antiquité. Elles attirent l'attention des chercheurs grâce à ces potentiels antioxydants et ces activités antimicrobienne, anti-inflammatoire, antipyrétique, antidiabétique, antiradicalaire et cytotoxique (**Hamdan et Afifi, 2004 ; Topçu et al., 2007; Benhammou et al., 2007, Benhammou et al., 2008**). Elles sont employées dans le traitement d'eczéma, les infections de la gorge, la lithiase rénale, l'asthme, l'estomac et comme un stimulant (**Kordali et al., 2003**).

P. atlantica constitue avec *P. lentiscus* des espèces principales de la production d'oléorésine (**Delazar et al., 2004**). Cette résine qui est produit par l'écorce et exsudé naturellement de façon abondante par temps chaud est utilisée comme antiseptique du système respiratoire (**Duru, 2003**) et aussi pour d'autres usages médicaux (**Belhadj, 2001**). Chez les marocains, la décoction des feuilles est largement employée pour traiter les infections de l'œil (**El-Hilaly et al., 2003**). Les fruits trouvent leur application dans la cuisine et les pratiques médicinales algériennes en particulier, dans la région de Djelfa, Laghouat et Ghardaïa. L'huile de ces fruits comestibles est souvent mélangée aux dattes écrasées et peut être consommé à toute heure de la journée avec du petit lait. L'huile a un goût très proche de celui du beurre, elle est très appréciée dans la région. Les graines sont séchées, écrasées ou moulues et ramassées avec de l'eau sucrée et consommées en boulettes ou bien séchées et croquées telles quelles comme des cacahuètes (**Belhadj, 2001**).

1.4. Travaux antérieurs :

L'analyse phytochimique de différentes parties de la plante a été l'objet de quelques études. Les potentiels antioxydants des espèces du *Pistacia* sont du en particulier à la présence des flavonoïdes et des flavones (**Kawashty et al., 2000 ; Topçu et al., 2007**), des gallotannins (**Wei et al., 2002 ; Zhao et al., 2005**) et des phénols simples tels que l'acide gallique et l'acide ρ -coumarique (**Benhammou et al., 2008**).

D'autres groupes chimiques caractérisent l'huile des fruits du pistachier de l'Atlas : les triterpénoïdes, les acides gras insaturés tels les acides oléique (46 %), linoléique (27.5 %), palmitique (24 %), palmitoléique (1.23–5.73 %), stéarique (1.48–2.61 %), linoléique (0.95–1.5 %), et les stéroïdes et les triglycérides (**Yousfi et al., 2002 ; Yousfi et al., 2003, Yousfi et al., 2005; Benhassaini et al., 2007; Tavakoli et Pazhouhanmehr, 2010**). Cependant, la composition chimique de l'huile essentielle d'oléorésine révèle sa richesse en α -pinène (70 %) et β -pinène (1.94 %) (**Delazar et al., 2004; Benhassaini et al., 2008**). Les composés de l'huile essentielle de différentes parties de *P. atlantica* du Maroc sont : le terpinen-4-ol (21.7%) et l'elemol (20.0%) comme des principaux constituants dans les feuilles avec des quantités faibles en β -eudesmol (8.4%), γ -eudesmol (7.0%) et en p-cymène (5.0%). Réciproquement, les fruits ont été dominés par le bornyl acétate (21.5%) et l'acide octanoïque (8.2%) d'une part, et le α -pinène (42.9%), β -pinène (13.2%) et p-cymen-8-ol (8.7%) dans la gomme d'autre part (**Barrero et al., 2005**). Les monoterpènes hydrocarbonés tels le α -pinène (32.6–54.7%) et le β -pinène (8.0–20.2%) constituent la classe majoritaire suivie par les sesquiterpènes dans les feuilles, les fruits et les écorches de cette plante (**Mecherara-Idjeri et al., 2008**). Une étude similaire sur les feuilles permet à **Gourine et al (2010)** de confirmer la dominance de ces deux classes.

Peu de travaux ont été consacrés sur l'étude des teneurs en polyphénols et les propriétés antioxydantes de différentes parties de *P. atlantica* (**Benhammou et al., 2007; Yousfi et al., 2009**). Les résultats de ces travaux ont montré la richesse de cette plante en composés phénoliques et l'identification d'un nouveau antioxydant le 1 (méthyl 5-(3,4-dihydroxyphényl)-3-hydroxypenta-2,4- dienoate) (**Yousfi et al., 2009**). Une autre étude réalisée par **Adams et al (2009)** a mis en évidence une nouvelle substance anti- *Plasmodium falciparum*, le flavone 3-méthoxycarpachromène dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *P.atlantica*.

2. *Thymelaea microphylla* (Photo 2) :

2.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Rosidées

Ordre : Malvales

Famille : Thyméléacées

Genre Espèce : *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur.

Noms vernaculaires : Methnane, el Abiod (Quezel et Santa, 1963) ou metnen dans le sud de l'Oranais, Tiout et environs, ou metnân dans l'Oriental marocain et methnène en Tunisie (Aît Youssef, 2006).

2.2. Description botanique de *Thymelaea microphylla* :

C'est un arbrisseau dioïque à rameaux effilés canescents. Les feuilles sont très petites (1-4 mm) ovoïdes, éparses et distantes sur les rameaux. Les fleurs glomérulées par 2- 5 à l'aisselle des feuilles et bien plus longues qu'elles jaunâtres à lobes très courts (Quezel et Santa, 1963). Cette espèce endémique est commune sur les Hauts Plateaux et dans l'Atlas saharien et dans le nord du Sahara ; elle pousse surtout dans les pâturages arides et désertiques (Aît Youssef, 2006).



A*

Photo 2 : *Thymelaea microphylla* Coss et Dur. (A* : <http://www.teline.fr>)

2.3. Propriétés et usages thérapeutiques :

Suite à une étude ethnobotanique de Thyméléacées (*Thymelaea microphylla*) menée auprès des populations locales d'El-Mechria et Nâama, cette plante est utilisée contre certaines infections microbiennes. D'autres espèces appartiennent à la même famille sont largement employées pour ces propriétés diurétique, hypotensive et anti-inflammatoire (**Djeridane et al., 2006**).

2.4. Travaux antérieurs :

Peu de travaux ont été réalisés sur cette plante. **Cheriti et Sekkoum (1995)** ont identifié l'acide oléanolique, β -sitostérol et 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -sitostérol dans les parties aériennes de *T. microphylla*. D'autres composés tels que les flavones, les saponosides, les diterpènes, les alcaloïdes et les glucosides caractérisent la famille des Thyméléacées (**Evans et Taylor, 1983 ; Touati, 1985 ; Le Floc'h, 1983 in Dohou et al., 2003**). A propos des activités biologiques, le pouvoir antioxydant des extraits de *T. microphylla* est reporté par **Benhammou et al (2009)** et **Djeridane et al (2010)**.

3.1. Marrubium deserti (Photo 3) :

3.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Astéridées

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées ou Labiées

Genre Espèce : *Marrubium deserti* De Noé.

Noms vernaculaires : Djaïdi (**Quezel et Santa, 1963**).

3.2. Description botanique de *Marrubium deserti* :

C'est une espèce endémique saharienne trouvée en Algérie et au Maroc, sous forme d'arbrisseau blanchâtre très rameux à poils laineux. Les tiges et les feuilles sont blanchâtres à pilosité apprimée très courte. Les épis sont grêles, lâches, interrompus et larges de 12-15 mm. Les fleurs rose pâle en tube sont entourées par un calice vert et disposées au dessus de chaque paire de feuilles. C'est une plante broutée par les herbivores. Elle est commune dans le nord

du Sahara et le Sahara central, où on la trouve surtout dans les pâturages désertiques (**Quezel et Santa, 1963**).



A*



Photo 3: *Marrubium deserti* De Noé. (A* : www.sahara-nature.com)

3.3. Propriétés et usages thérapeutiques :

Dans la médecine traditionnelle Européenne, les extraits aqueux et hydro-alcoolique de la partie aérienne fleuris de *Marrubium* sp. sont employés contre le toux, comme neurosédatif, cholérétique dans les troubles digestives et biliaires et pour ces propriétés anti-inflammatoire et antimicrobienne (**Rigano et al., 2007**). Cependant, les feuilles, les rameaux et les jeunes bourgeons de *Marrubium deserti* sont utilisés en décoction, infusion et macération contre les troubles intestinaux, les maladies respiratoires, la fièvre, la toux, la dysménorrhée, la piqûre de scorpion et les allergies (**Ould El Hadj et al., 2003; Hammiche et Maiza, 2006**).

3.4. Travaux antérieurs :

Les espèces du *Marrubium* sont riche en composés phénoliques, flavonoïdes et en phenylethanoides mais le genre est mieux connu à produire les diterpénoïdes tels que le marrubiine qui est étudié pour ces propriétés chimiques, thérapeutiques (antitumoral) et pharmacologiques (**Hatam et al., 1995 ; El Bardai et al., 2003 ; Karioti et al., 2005 ; Hennebelle et al., 2007 ; Sarikurkcu et al., 2008**). D'autres auteurs ont montré l'activité antioxydante des extraits méthanoliques et aqueux de *M. deserti* (**Benhammou et al., 2009 ; Djeridane et al., 2010**).

4. *Atriplex halimus* (Photo 4) :

4.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Préastéridées

Ordre : Caryophyllades

Familles : Amaranthacées

Genre Espèce : *Atriplex halimus* L.

Noms vernaculaires : Pourpier de mer, Aramass (Quezel et Santa, 1963), Gtaf en Algérie (Ozenda, 2004) et Chenane en Maroc.

NB : Récemment, la famille des Chénopodiacées est remplacée par la famille des Amaranthacées.

4.2. Description botanique d'*Atriplex halimus* :

Atriplex halimus L est une espèce de formation steppique salée qu'on rencontre dans les hauts plateaux et sur le littoral, où les conditions favorables sont réunies avec les polymorphismes en fonction de salinité, elle est caractérisée par des feuilles qui sont assez grandes de 2-5 cm, en général 2 fois plus longues que larges, un peu épaisse et charnue. Elles sont ovales et entières peu sinuées et dentées. La fleur est monoïque formée d'épis denses et courtes nus groupés (Ozenda, 2004). Les tiges sont blanchâtres dressées et ligneuses avec des buissons très rameux. Cette plante se trouve dans toute l'Algérie, les rocaille, talus argileux et dans les zones d'épandage plus ou moins salées (Quezel et Santa, 1963).



Photo 4 : *Atriplex halimus* L

4.3. Propriétés et usages thérapeutiques d'*A. halimus* :

Atriplex halimus L. est un arbuste fourrager autochtone qui tolère bien les conditions d'aridité (sécheresse, salinité,...). Cette espèce peut contribuer à la valorisation des sols marginaux et dégradés et à l'amélioration des productions végétale et animale dans plusieurs régions démunies (**Le Houérou, 1992**).

Son utilisation dans la médecine traditionnelle est largement connue pour ces propriétés hypoglycémiantes et hypolipémiants (**Yaniv et al., 1987 ; Mirsky et Nitsa, 2001**).

4.4. Travaux antérieurs :

Les métabolites secondaires chez *Atriplex* montrent la présence des phénols totaux, des saponines glycosidiques, des alcaloïdes, des tannins, des résines, des betaines et des flavonoïdes dont les flavonols constituent la classe chimique majeure chez la plupart des espèces *Atriplex* (**Bylka et al., 2001; Bylka et al., 2004; Abd El-Rahman et al., 2006; Benhammou et al., 2009**). Parmi les flavonols aglycones identifiés : kaempferol, quercétine, isorhamnetine, parfois patuletine, spinacétine et tricéline. Le kaempférol 3-O-sulphate-7-O-arabinopyranoside et quercétine 3-O-sulphate-7-O-arabinopyranoside ont été isolés dans les feuilles d'*A. hortensis* (**Bylka et al., 2001**) et la naringine, naringénine 7-O-glucoside, isorhamnetine 3-O-rhamnosyl (1-6) glucopyranoside et isorhamnetine 7-O-glucopyranoside dans l'espèce *A. farinosa* (**Al-Jaber et al., 1991**).

5. *Anabasis articulata* (Photo 5) :

5.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Préastéridées

Ordre : Caryophyllades

Familles : Amaranthacées

Genre Espèce : *Anabasis articulata* (Forsk.) Moq.

Noms vernaculaires : Belbel, Djell (Quezel et Santa, 1963), Ajrem en arabe

5.2. Description botanique d'*Anabasis articulata* :

C'est une plante endémique saharienne à buisson bas, à souche épaisse et tortueuse, de couleur vert bleuté très clair. Les rameaux articulés et presque sans feuille ; pendant les périodes de grande sécheresse les rameaux sont caducs et tombent au pied de la plante. Les feuilles opposées, ont une partie libre très courte, obtuse ou terminée par une pointe blanchâtre. Les fleurs blanches rosées sont isolées à l'aisselle de chaque feuille. Le fruit est entouré par trois ailes dues à la dilatation de trois de ces sépales. Elle est commune dans les sols pierreux de tout le Sahara, jusqu'au Sahara méridional (Ozenda, 2004).



Photo 5 : *Anabasis articulata* (Forsk.) Moq

5.2. Propriétés et usages thérapeutiques :

Grâce à ces vertus précieuses, *Anabasis articulata* comme d'autres plantes Amaranthacées est largement employée dans la médecine traditionnelle algérienne contre le diabète (**Kambouche et al., 2009**). Les parties aériennes sont utilisées en décoction et sous forme de cataplasme pour soigner les dermatoses, les maladies de la peau (eczéma), les maux de la tête et la fièvre (**Hammiche et Maiza, 2006**). D'autres propriétés cholinergiques ont été aussi signalées chez cette espèce (**Tilyabaev et Abduvakhobov, 1998**)

5.3. Travaux antérieurs :

Peu d'études ont été réalisées sur la phytochimie d'*A. articulata* (**Batanouny, 1999 ; Kambouche et al., 2009 ; Eman, 2011**). Ces auteurs ont mis en évidence la présence des flavonoïdes, des tannins, des saponines, des alcaloïdes, des carbohydrates et/ou des glycosides, des coumarines et des triterpènes dans les extraits de cette espèce. D'autres constituants chimiques ont été identifiés chez *A. brevifolia* : 2- O- beta- D- glucopyranosyloxy- 4, 6- dimethoxy phenylenthanone ; 2- O- (2) - beta-D-glucopyranosyloxy -4, 6-diméthoxy phénylenthane ; acide 3-méthyle-but-2-énoïque-[2-(4-méthoxyphényl)-éthyl]- amide ; 5, 6, 7, 2'- tétraméthoxy-isoflavonoïde ; 2'- hydroxy-5, 6, 7-triméthoxy-isoflavonoïde (**Chen et al., 2005**). Dans la partie aérienne d'*A. aphylla*, **Du et al (2009)** ont pu identifier trois alcaloïdes : N-méthylanabasine, anabasamine et isonicotine et d'autres classes de flavonoïdes tels que la piceine, l'isorhamnetine, la quercétine, la rutine et l'isorhamnetine-3-rutinoside (**Yang et al., 2010**).

6. *Helianthemum lippii* (Photo 6) :

6.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Rosidées

Ordre : Malvales

Famille : Cistacées

Genre Espèce : *Helianthemum lippii* (L) Pers.

Noms vernaculaires : Rguig, Hashma, Khudhr, Rugrug, Jaraid, Jaraid achchima et Jerait (**Mandeel et Al-Laith, 2007**).

6.2. Description botanique d'*Helianthemum lippii* :

C'est une plante polymorphe en buisson imbriqué ne dépassant guère 50 cm. un arbrisseau vivace très rameux à feuilles sessiles couvertes de très courts poils ce qui donne une couleur blanchâtre à la plante. L'écorce des rameaux est également blanchâtre. Les feuilles comportent deux stipules. Les fleurs sont petites, jaunes et sessiles. C'est une espèce qui se répartit dans tout le Sahara, les pâturages désertiques, les rocailles et les sables (**Quezel et Santa, 1963**).

C'est au pied de cette plante que pousse la terfas (*Terfezai ovalispora*), délicieuse truffe blanche.

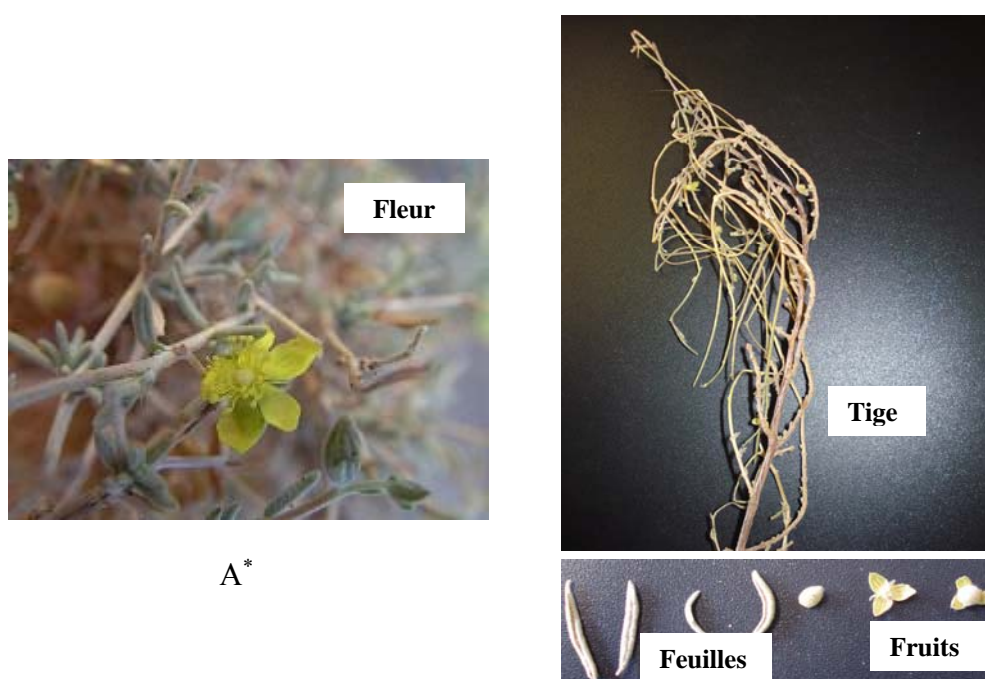


Photo 6 : *Helianthemum lippii* (L) Pers. (A* : www.sahara-nature.com)

6.3. Propriétés et usages thérapeutiques :

D'après notre enquête ethnobotanique auprès de la population de la région d'étude, cette plante est employée pour calmer les douleurs des règles menstruelles. Comparativement à d'autres espèces, *H. glomeratum* a montré ces effets antibactérien, antiprotozoaire et anti-giardiale et pour traiter les troubles gastro-intestinaux comme les diarrhées et les dysenteries (**Barbosa et al., 2006 ; Buzzini et al., 2007**). Concernant l'activité antioxydante, cette propriété a été prouvée par la littérature chez *H. ledifolium* (**Tawaha et al., 2007**).

6.4. Travaux antérieurs :

Il n'y a pas de travaux sur la composition chimique sur cette plante, mais la littérature est limitée sur quelques espèces. **Barroso et al (2001)** ont montré que les espèces du genre tel *H. almeriensis* sont très riches en tannins. Chez *H. glomeratum*, certains auteurs ont pu isolés quelques flavonoïdes du type flavan-3-ols : (-)-épicatéchine et (-)-épigallocatechine gallate (**Meckes et al., 1999**) et du type flavonols: kaempferol, tiliroside et quercétine (**Calzada et al., 1999**).

7. *Zygophyllum album* (Photo 7) :

7.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Rosidées

Ordre : Sapindales

Famille : Zygophyllacées

Genre Espèce : *Zygophyllum album* L.

Noms vernaculaires : Aggaya

7.2. Description botanique de *Zygophyllum album* :

C'est un petit buisson ramifié. Les feuilles à deux folioles charnues. Le pétiole est aussi long et charnu que les deux folioles. Les feuilles deviennent oranges en séchant. Les fleurs sont petits blanc-jaune ou crème. Le fruit non cornu à l'apex, simplement dilaté comprend 5 lobes plus ou moins saillants. Le pédicule du fruit est plus court que le fruit.

C'est une espèce commune dans les terrains salés ou gypseux et les pâturages désertiques (**Quezel et Santa, 1963**).



Photo 7 : *Zygophyllum album* L

7.3. Propriétés et usages thérapeutiques :

Comme la plupart des plantes appartenant au genre *Zygophyllum* possédant plusieurs effets biologiques, en Algérie, *Zygophyllum album* est employée pour traiter le diabète, les spasmes, les coliques, le rhumatisme et les dermatoses (Ould El Hadj *et al.*, 2003 ; Smati *et al.*, 2004 ; Hammiche et Maiza, 2006). D'autres vertus telles que les activités anti-inflammatoire, antipyrétique et antivirale sont très connues à ces espèces (Saad *et al.*, 1967).

7.4. Travaux antérieurs :

Les principaux constituants chimiques décrits chez les espèces *Zygophyllum* : l'acide quinovique, ses dérivés glycosidiques et le zygophylline sont connus pour leurs activités anti-inflammatoire et antipyrétique (Saad *et al.*, 1967). D'autres métabolites tels que les saponines tritérpénoïdes ont été isolés à partir des racines (Pöllman *et al.*, 1997). La présence des flavonoïdes, des tanins et des alcaloïdes a été mise en évidence chez *Z. geslini*, le Kaempferol chez *Z. dumosum* et l'isorhamnetine, l'isorhamnetine-3-*O*-glucoside et l'isorhamnetine-6''-(2-*E*-butenoyl)-3-*O*-glucoside chez *Z. simplex* (Hassanean et Desoky, 1992 ; Ouf *et al.*, 1994). Smati *et al* (2004) ont pu identifier le 3 β -(3,4-dihydroxycinnamoyl) - erythrodiol qui a révélé son activité cytotoxique chez *Z. geslini*.

8. *Cotula cinerea* (Photo 8) :

8.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Astéridées

Ordre : Astérales

Famille : Astéracées ou Composées

Genre Espèce : *Cotula cinerea* Del., syn. *Brocchia cinerea* (Del.) Vis.

Noms vernaculaires : Chiria ou Robita (Quezel et Santa 1963), Al gartoufa.

8.2. Description botanique de *Cotula cinerea* :

C'est une petite plante annuelle d'aspect laineux de 5 à 15 cm entièrement tomenteuse. Les tiges sont dressées ou diffuses. Les feuilles et les tiges vert-blanchâtre sont recouvertes de petits poils denses qui forment comme un manteau de velours. Les feuilles petites, entières épaisses et veloutées sont découpées en trois à sept dents ou 'doigts' qui se présentent comme une main légèrement refermée. Les fleurs sont de petits demi pompons jaune d'or au bout d'une courte tige. C'est une espèce Saharo-arabique commune dans tout le Sahara et les lieux sablonneux désertiques (Quezel et Santa 1963).



A*



Photo 8 : *Cotula cinerea* L (A* : www.sahara-nature.com)

8.3. Propriétés et usages thérapeutiques :

Cette espèce est largement utilisée en médecine traditionnelle marocaine pour ses propriétés biologiques comme les activités anti-inflammatoire, analgésique, antiseptique, antibactérienne, antipyrétique et contre les larves, (Markouk *et al.*, 1999 ; Markouk *et al.*, 2000 ; Larhsini *et al.*, 2002). Dans le Sahara algérien plus précisément à Ouargla, cette plante est destinée contre la colique, la diarrhée, la toux, le rhumatisme et la stérilité (Ould El Hadj *et al.*, 2003 ; Hammiche et Maiza, 2006).

8.4. Travaux antérieurs :

Les flavonoïdes isolées chez *Cotula cinerea* sont : flavone O- et C-glycosides, flavonols glycosides et quercetagétine 3, 6, 7-triméthyl éther (Ahmed *et al.*, 1987), lactones sesquitérpéniques, les glaucolides (Metwally *et al.*, 1986) et les coumarines sesquitérpéniques (Greger et Hofer, 1985).

9. *Pentzia monodiana* (Photo 9) :

9.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Astéridées

Ordre : Astérales

Famille : Astéracées ou Composées

Genre Espèce : *Pentzia monodiana* Maire.

9.2. Description botanique de *Pentzia monodiana* :

C'est une herbe de 20 à 35 cm, à tiges très rameuses et un peu ligneuses à la base, donnant des rameaux dressés blanchâtres velus, ciliés et couverts de poils appliqués comme sur les feuilles, celles-ci sessiles, auriculées à la base, de taille moyenne profondément divisées, capitules petits, 5-8 mm, isolés au sommet des rameaux, à fleurs toutes tubuleuses jaunes d'or ou un brunâtre. Cette espèce endémique du Sahara présente dans les oueds pierreux (Hoggar, Tassili des Ajjer Tibesti) et dans l'étage supérieur où cette plante constitue des peuplements importants (Ozenda, 2004).



A*



Photo 9 : *Pentzia monodiana* (A* : www.sahara-nature.com)

9.3. Propriétés et usages thérapeutiques :

Aucun travail n'a été réalisé sur cette espèce.

9.4. Travaux antérieurs :

Peu d'étude porte sur la composition chimique du genre *Pentzia*. Des lactones sesquiterpènes, glaucolides et fulvenoguaianolides ont été isolés de la partie aérienne de plusieurs espèces (Bohlmann et Zdero, 1978 ; Zdero et Bohlmann, 1990).

10. *Inula montana* (Photo 10) :

10.1. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Astéridées

Ordre : Astérales

Famille : Astéracées ou Composées

Genre Espèce : *Inula montana* L.

Noms vernaculaires : Boutelilis (Quezel et Santa, 1963).

10.2. Description botanique d'*Inula montana* :

C'est une plante polymorphe à tige simple, blanchâtre laineuse de 15-35 cm qui porte des feuilles entières ou denticulées, soyeuses et blanchâtres en dessous, pubescentes en dessus, caulinaires toutes simplement rétrécies à la base. Les inférieures atténuées en pétiole.

Gros capitules de 4-5 cm, solitaires au sommet de la tige, à grandes ligules jaunes et linéaires. Les bractées externes de l'involucre sont herbacées et lancéolées, les inférieures sont ciliées et linéaires. C'est une espèce ubiquitaire dans toute l'Algérie qui croît sur les pentes rocailleuses arides des montagnes à partir de 500 m d'altitude (**Quezel et Santa, 1963**).



Photo 10 : *Inula montana* L

10.3. Propriétés et usages thérapeutiques :

Plusieurs espèces du genre *Inula* sont employées en médecine traditionnelle pour ses propriétés antipyrétique, anti-inflammatoire et hépatoprotéctive (**Gonzalez-Romero et al., 2001**). En France, cette espèce est parfois utilisée contre les maladies inflammatoires (**Reynaud et Lussignol, 1999**).

10.4. Travaux antérieurs :

Comme toutes les espèces appartenant à la famille des Astéracées, les composés terpéniques sont doués de plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques telles que les activités cytotoxique, anti-tumorale, antimicrobienne et phytotoxique (**Rodrigue et al., 1976**). Parmi ces substances, les cinq lactones sesquiterpéniques (isoinuviscolide, gaillardine, 1 beta-hydroxy-3beta-acetoxy-eudesme-4(15),11(13)-dien-12-8beta-olide, pulchelline-C et pulchelline- E) ont été identifiées dans la partie aérienne d'*I. montana* (**Gonzalez-Romero et al., 2000**). D'autre étude a montré la présence des 4 flavonoïdes aglycones : luteoline (5, 7,3',4'-hydroxyflavone), hispiduline (5, 7,4'-hydroxy-6-méthoxyflavone), nepetine (5, 7,3'-hydroxy-6-méthoxyflavone) et cirsimaritrine (5,4'-hydroxy-6,7-diméthoxyflavone) (**Reynaud et Lussignol, 1999**).

CHAPITRE 3 : Radicaux libres et pouvoir antioxydant

1. Généralités :

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène (**Walker et al., 1982**).

2. Différents types des radicaux libres :

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /où un pouvoir oxydant fort, il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe.

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les **radicaux primaires** à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), le radical peroxyde (ROO^{\bullet}) et le radical alkoxyde (RO^{\bullet}).

Les autres radicaux libres, dits **radicaux secondaires** telles que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**).

3. Origine de production des ERO :

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (**Gauche et Hausswirth, 2006**). Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons :

- des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (**Aurausseau, 2002**) ;
- des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées (**Milan, 2004 ; Van Antwerpen, 2006**) ;
- du système xanthine déshydrogénase/ oxydase activé lors d'ischémie-reperfusion (**Li et al., 2002 ; Valko et al., 2004 ; Valko et al., 2006**) ;

- d'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et le rayonnement (**Tamer, 2003**).

4. Dommages oxydatives des radicaux libres :

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » (**Rahman, 2002**). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (**Aurousseau, 2002 ; Valko et al., 2006**). Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies (**Aruoma, 1998**). Parmi les, nous citons, les maladie d'Alzheimer (**Smith et al., 1996 ; Smith et al., 2004**), de Parkinson (**Bolton et al., 2000**), de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites (**Ali et al., 2008**), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (**Jha et al., 1995**), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (**Georgetti et al., 2003**) et le cancer (**Ali et al., 2008**).

5. Moyens de défense contre les radicaux libres :

D'après **Halliwel (1994)**, un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules.

Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés dans 3 catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (**Viroit, 2004**).

5.1. Prévention à plein temps :

Ce type est un système qui agit en permanence pour but de prévenir la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (Fe, Cu) ou exogènes (quinone) susceptibles de les générer. Par exemple, la liaison de la transferrine (protéine chélatrice) avec deux atomes de fer ferrique par molécule à pH physiologique rend ce métal incapable d'être impliqué dans les mécanismes d'oxydoréduction générateurs de radicaux libres.

5.2. Détoxification active suite à une attaque oxydante :

Ce système de défense repose principalement sur 3 enzymes (**Valko et al., 2006**).

5.2.1. Super oxyde dismutase (SOD) :

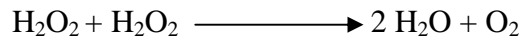
Il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène peroxyde (H₂O₂) et en oxygène.



Dans l'être humain, il y a 3 isoformes des SOD à cofacteurs métallique (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) et sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie (**Landis et Tower, 2005**).

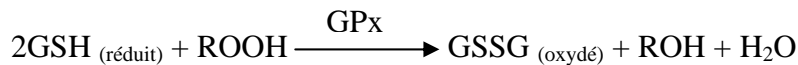
5.2.2. Catalase :

Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (**Valko et al., 2006**). Elle permet de convertir deux molécules de H₂O₂ en H₂O et O₂.



5.2.3. Glutathion peroxydase :

Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Valko et al., 2006**).



5.3. Détoxification passive :

Elle permet la réduction des radicaux oxygénés qui ont pu passer les deux premières lignes de la défense. Elle incluse tous les antioxydants non enzymatiques capables de neutraliser seulement un radical libre par molécule tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes, l'albumine, l'acide urique, les polyamines, l'acide lipoïque, etc.... (**Svoboda et Hampson, 1999 ; Valko et al., 2006**).

5.3.1. Vitamine E (tocophérol) :

Elle est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique (Pryor, 2000 ; Valko *et al.*, 2006). Durant la réaction antioxydante, le α -tocophérol est converti en radical α -tocophérol beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxy).

5.3.2. Vitamine C (acide ascorbique) :

Ses propriétés antioxydantes sont attribuées à sa capacité d'être réduit en radical ascorbyle après la perte d'un électron ou d'un proton. Ce radical peut facilement s'oxyder en captant l'anion superoxyde et certaines espèces radicalaires (perhydroxyles et peroxyles) (Valko *et al.*, 2006, Van Antwerpen, 2006).

5.3.3. Caroténoïdes :

L'activité antioxydante de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure (Mortensen *et al.*, 2001). Généralement, elles interagissent avec les radicaux libres (ROO^\bullet , R^\bullet) par 3 mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition du radical (El-Agamey *et al.*, 2004).

5.3.4. Acide lipoïque (acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque ; $C_8H_{14}O_2S_2$) :

Cet acide est aisément absorbé et converti rapidement dans de nombreux tissus à la forme réduite dithiol, l'acide dihydrolipoïque (Figure 7) (Smith *et al.*, 2004). Il joue un rôle important dans le piégeage des ERO, la régénération des antioxydants endogènes et exogènes tels que les vitamines C et E et le glutathion, la chélation des métaux Cu^{2+} et Fe^{2+} (Valko *et al.*, 2006).

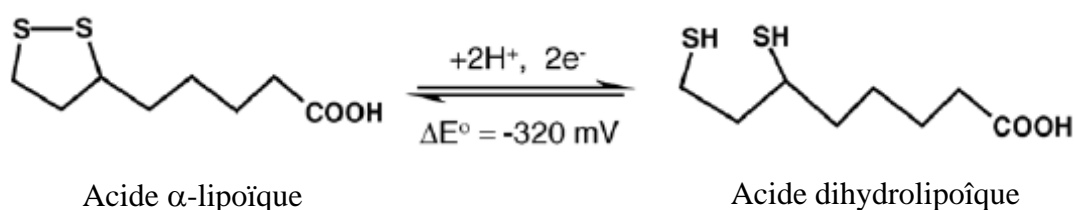


Figure 7 : Structure de l'acide lipoïque et l'acide dihydrolipoïque (Valko *et al.*, 2006)

5.3.5. Alumine :

Il se trouve en grande quantité dans le plasma possède une fonction thiol qui lui permet de jouer un antioxydant puissant à fixer les différents métaux (Cu^{2+} , Fe^{3+} ...) et de prévenir leur effets oxydants (**Halliwel et Gutteridg, 1990 ; Quinla et al., 1992**).

5.3.6. Composés phénoliques :

Ces substances sont très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes (**Rice-Evans et al., 1996 ; Kolesnikov et Gins, 2001**). Vue leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions (**Rice-Evans et al., 1995; Cook et Samman, 1996; Valko et al., 2006**).

6. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro* :

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques (**Ali et al., 2008 ; Scherer et Godoy, 2009**). Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (**Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang et al., 2005**).

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (**Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998**).

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), des anions superoxyde ($\text{O}^{\bullet-}_2$), du peroxyde (ROO^\bullet) et de l'oxyde nitrique (NO^\bullet) (**Sanchez-Moreno, 2002**). .

Parmi ces techniques, nous citons :

- ✓ la méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (**Cao et al., 1993**) ;
- ✓ la méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) (**Miller et al., 1993**) ;
- ✓ la méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) (**Benzie et Strain, 1996**) ;

- ✓ la méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (**Brand-Williams *et al.*, 1995**) ;
- ✓ la méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- diméthyl-*p*-phénylènediamine) (**Li *et al.*, 1994**) ;
- ✓ la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) (**Winston *et al.*, 1998**) ;
- ✓ la méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) (**Wayner *et al.*, 1985**) ;
- ✓ la méthode photochimiluminescence (PCL) (**Popov *et al.*, 1987**) ;
- ✓ la méthode d'hémolyse (**Charfi, 1995**).

Partie expérimentale

CHAPITRE 1 : Extraction et teneurs en composés phénoliques

1. Introduction :

La famille des polyphénols devient le point de départ de toutes les recherches scientifiques en particulier la découverte des molécules naturelles à très forte activité antioxydante. Notant que, les oxydants quel que soit leurs origines constituent un très grave problème non seulement au niveau de la santé publique mais aussi au niveau de l'industrie agro-alimentaire.

Dans le contexte de recherche des antioxydants naturels, nous nous sommes intéressés à évaluer quelques propriétés antioxydantes de dix (10) espèces végétales à savoir : *Pistacia atlantica* (Desf.), *Inula montana* (L.), *Marrubium deserti* (de Noé), *Thymelaea microphylla* (Coss. et Dur.), *Helianthemum lippii* (L.) Pers., *Atriplex halimus* (L.), *Anabasis articulata* (Forsk.) Moq., *Cotula cinerea* (Del.), *Zygophyllum album* (L.) et *Pentzia monodiana* Maire.

Dans cette partie expérimentale, deux axes ont été envisagés :

Le premier axe concerne l'extraction des composés phénoliques par le méthanol suivi par la quantification des teneurs de ces composés. Les dosages obtenus exprimés en mg/g sont déterminés en utilisant les réactifs suivants : le Folin-Ciocalteu pour les polyphénols, le trichlorure d'alumine pour les flavonoïdes et la vanilline pour les tannins condensés.

Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés par le pouvoir antioxydant des extraits des plantes étudiées. Cinq méthodes complémentaires ont été choisies :

- ✓ Méthode de mesure de l'activité antioxydante totale (Prieto *et al.*, 1999) qui permet de quantifier toutes les substances de l'extrait y ont une capacité à empêcher l'oxydation.
- ✓ Méthode de réduction de fer (Oyaizu, 1986) est une technique indicatrice de la présence des effets réductives de l'anion hexacyanoférate (III) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ à l'anion hexacyanoférate (II) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.
- ✓ Méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998) est la plus simple à réaliser *in vitro*. Le DPPH est largement employé pour évaluer le balayage de divers produits naturels et considéré comme un composé modèle pour les radicaux libres produits dans la peroxydation lipidique.
- ✓ Méthode du piégeage du radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) (Halliwell *et al.*, 1987) a pour but de mesurer la capacité des antioxydants à inhiber l'oxydation du désoxyribose ;
- ✓ Méthode du blanchiment de β -carotène (Sun et Ho, 2005) permet de mesurer l'ampleur de la destruction du β -carotène (décoloration) par les hydroperoxydes formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique en présence des antioxydants.

Enfin, les données obtenues des teneurs et de l'activité antioxydante de dix plantes ont été soumises à des analyses statistiques.

2. Matériel végétal :

2.1. Choix des plantes :

Le choix des dix (10) plantes est basé sur une enquête ethnopharmacologique auprès de la population ayant connaissance de leur usage en médecine traditionnelle.

2.2. Situation géographique des stations d'étude :

La récolte des différentes espèces a été effectuée dans l'Ouest (Tlemcen) et le Sud-Ouest de l'Algérie, dans différentes stations, à savoir : Ain Fezza (Tlemcen), Oum El Alou (Tlemcen), Aïn Ben Khelil (Naâma), Ladjdar (la frontière marocaine), Béchar et Adrar (**Tableau 2, Figure 8**).

Les situations géographiques ainsi les étages bioclimatiques des différentes stations (confirmés par **Mr. Bouabdellah H**, membre du laboratoire d'Ecologie et de Gestion des Ecosystèmes Naturels, au département de Biologie et Environnement) sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Lieu de récolte des plantes et caractéristiques géographiques et bioclimatiques des stations d'étude (Encarta, 2009).

Plantes	Stations	Période de la récolte	Partie étudiée	Longitude (Ouest)	Latitude (Nord)	Altitude (m)	Etage bioclimatique
<i>Pistacia atlantica</i>	Aïn Fezza (Tlemcen)	Mai 2007	Fruits rouges	1° 17'	34° 55'	730	Semi-aride tempéré
<i>Inula montana</i>	Oum El Alou (Tlemcen)	Novembre 2008	Partie fleurie	1° 16'	34° 54'	800	Semi-aride tempéré
<i>Marrubium deserti</i>	Aïn Ben Khelil (Naâma)	Mai 2007	Tiges, Feuilles	0° 45'	33° 15'	1156	Arde-froid
<i>Thymelaea microphylla</i>	Aïn Ben Khelil (Naâma)	Mai 2007	Tiges, Feuilles	0° 45'	33° 15'	1156	Arde-froid
<i>Helianthemum lippii</i>	Aïn Ben Khelil (Naâma)	Mai 2007	Tiges, Feuilles, Fruits	0° 45'	33° 15'	1156	Arde-froid
<i>Atriplex halimus</i>	Béchar	Avril 2008	Tiges, Feuilles	2° 14'	31° 38'	807	Arde chaud
<i>Anabasis articulata</i>	Béchar	Novembre 2007	Tiges	2° 14'	31° 38'	807	Arde chaud
<i>Cotula cinerea</i>	Adrar	Décembre 2007	Partie fleurie	0° 10'	28° 50'	300-400	Arde chaud
<i>Zygophyllum album</i>	Adrar	Décembre 2007		0° 10'	28° 50'	300-400	Arde chaud
<i>Pentzia monodiana</i>	Ladjar (la frontière marocaine)	Novembre 2007	Partie fleurie	0° 55'	33°05'	1200	Arde-froid

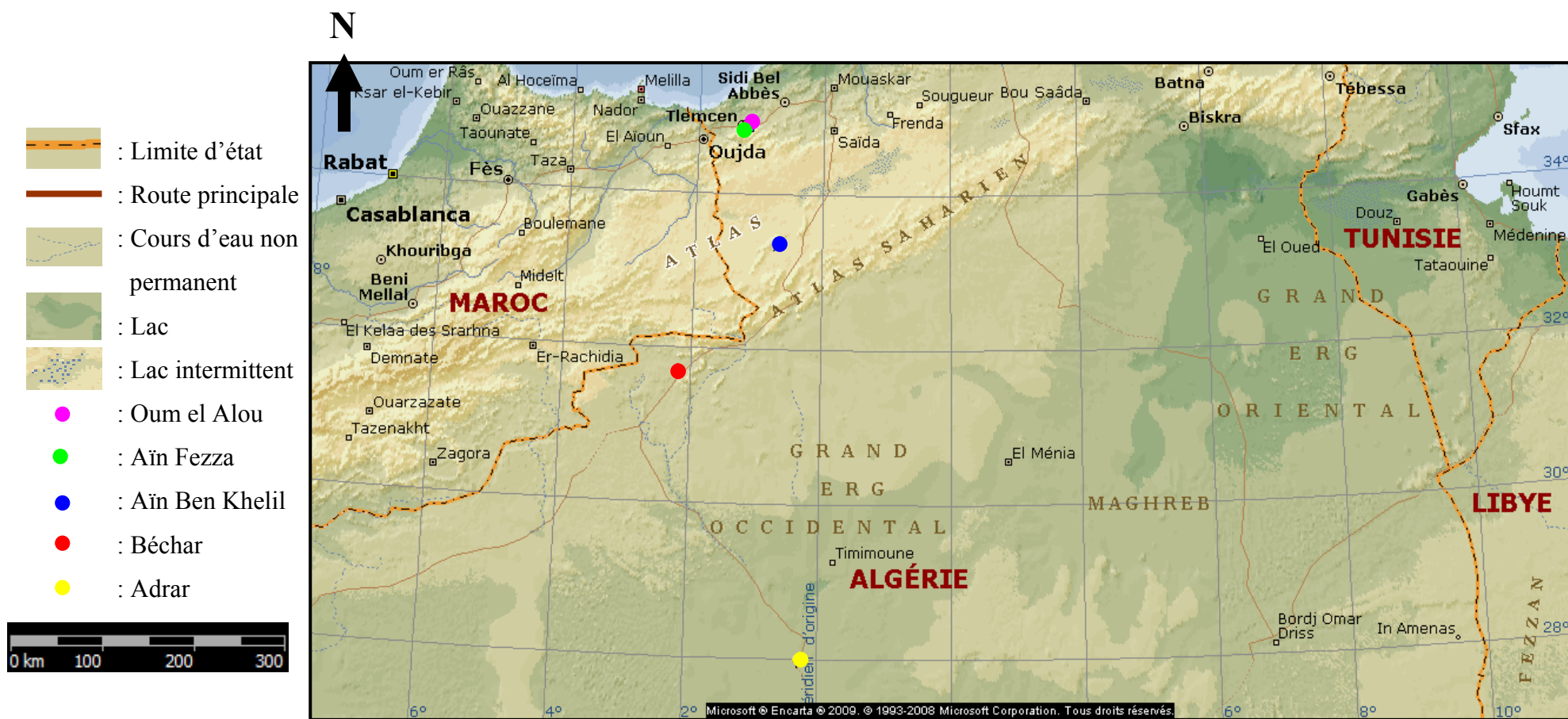


Figure 8 : Situation géographique des stations d'étude (Encarta, 2009).

2.3. La récolte du matériel végétal :

Le matériel végétal est séché à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante. Le séchage est de 7 jours en moyenne pour les différentes plantes, puis conservées dans des sacs en papier.

2.4. Identification botanique :

Les différentes espèces ont été identifiées par Monsieur le Professeur **Bouazza M.**, et son équipe (**Hassani F.** et **Dr Stamboli H.**) au département de Biologie, Faculté des SNV/STU de Tlemcen.

Les différentes plantes ont été classées dans le laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) et ont été enregistrées sous les références suivantes :

- L. 1784 pour *Pistacia atlantica* (**Desf.**)
- L. 2766 pour *Inula montana* (**L.**)
- L. 2351 pour *Marrubium deserti* (**de Noé**)
- Scop. 1843 pour *Thymelaea microphylla* (**Coss. et Dur.**)
- Mill. 2086 pour *Helianthemum lippii* (**L.**) **Pers.**
- L. 727 pour *Atriplex halimus* (**L.**)
- L. 754 pour *Anabasis articulata* (**Forsk.**) **Moq.**
- Vis. 2885 pour *Cotula cinerea* (**Del.**)
- L. 1705 pour *Zygophyllum album* (**L.**)
- *Thunb. 30* pour *Pentzia monodiana* (**Maire**)

3- Extraction des composés phénoliques :

3. 1. Préparation des extraits bruts (composés phénoliques) :

Une quantité de 1 g du matériel végétal broyé est macérée dans 20 ml du méthanol pendant 48 h. Après filtration, les solutions méthanoliques des parties concernées (tiges, feuilles, fruits) (**Tableau 1**) sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif type Buchi R-200 à 60°C. Les résidus secs pesés sont repris par 3 ml du méthanol (**Benhammou et al., 2008**).

3. 2. Extraction des flavonoïdes des fruits rouges de *Pistacia atlantica* :

3. 2. 1. Extraction par le méthanol :

Les fruits ont été séchés à l'étuve à 40°C pendant 24 heures, ils ont été ensuite broyés à l'aide d'un mortier. L'extraction des composés phénoliques s'est effectuée par la même technique citée auparavant.

3. 2. 2. Extraction des flavonoïdes par l'acétate d'éthyle et n-butanol :

Le protocole d'extraction des fractions flavoniques d'acétate d'éthyle et du n-butanol est réalisé selon la méthode de **Bekkara et al (1998)**

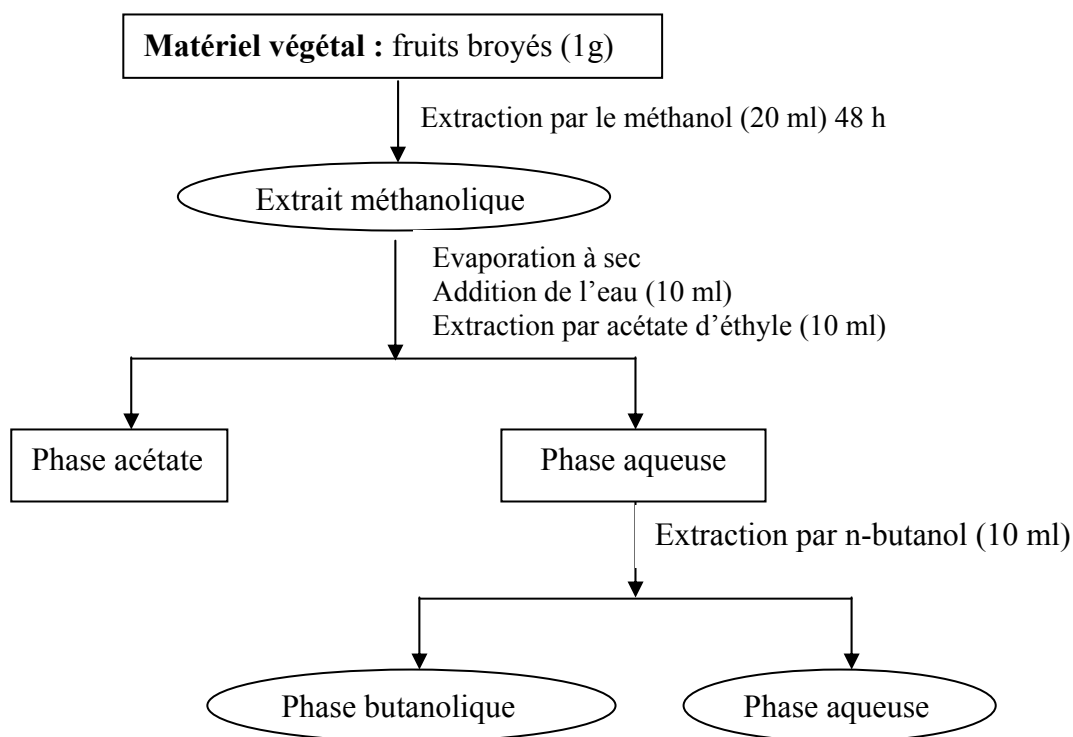


Figure 9 : Protocole d'extraction des flavonoïdes (**Bekkara et al., 1998**)

4. Dosage des phénols totaux :

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes a été déterminée par la méthode de **Singleton et Ross (1965)** utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu.

Un volume de 200 µl pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min.

L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre Jenway 6405 UV/ Vis. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée.

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

5. Dosage des flavonoïdes :

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

Une quantité de 500 µl de solution méthanolique de catéchine à différentes concentrations ou de l'extrait méthanolique dilués est ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % (m/v) est rajouté. Après l'incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des plantes médicinales est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g). Chaque échantillon est répété trois fois.

6. Dosage des tannins condensés :

Les quantités des tannins condensés sont estimées en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide (**Julkunen-Titto, 1985**).

Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v) et puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné et laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance à 550 nm est mesurée contre un blanc. La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g) à partir de la courbe d'étalonnage.

CHAPITRE 2 : Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits des composés phénoliques a été réalisée par cinq techniques chimiques à savoir : capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer, le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical hydroxyle et le test de blanchiment de β -carotène.

1. Activité antioxydante totale (TAC) :

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Prieto *et al* (1999)**. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide.

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait méthanolique est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS). Les expériences sont répétées en 3 fois.

2. Réduction de fer :

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'**Oyaizu (1986)**. Les différentes concentrations des extraits dans l'eau distillée (1 ml) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min.

A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

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_{50} 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.

3. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) :

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez-Moreno *et al* (1998)**.

Un volume de 50 μ l de différentes concentrations de chaque extrait exprimées en g/l est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH[•] (0.025 g/l) fraîchement préparée. L'absorbance à 515 nm est mesurée à des intervalles différents de temps jusqu'à l'obtention du plateau. La concentration du DPPH[•] en g/l dans le milieu réactionnel est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à des concentrations variées du DPPH[•] par une régression linéaire.

$$A_{515nm} = a \times [DPPH^{\bullet}]_t + b$$

Où : $[DPPH^{\bullet}]_t$ est exprimé en g/l; a : représente la pente; b : représente l'intersection de la courbe avec l'axe des y.

Le pourcentage du DPPH[•] résiduel (% DPPH[•]_{res}) est calculé par la formule suivante :

$$\% DPPH^{\bullet}_{res} = [DPPH^{\bullet}]_t / [DPPH^{\bullet}]_{t=0}$$

Où : $[DPPH^{\bullet}]_{t=0}$: représente la concentration initiale du radical stable sans extrait.

$[DPPH^{\bullet}]_t$: est la concentration du radical restant dans la réaction au niveau du plateau.

Les pourcentages du DPPH[•] résiduels 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_{50} et parfois notée IC_{50} . Elle est exprimée en milligramme d'extrait par rapport au gramme DPPH[•] dans le milieu

réactionnel (**Sanchez-Moreno et al., 1999**). Le temps nécessaire pour aboutir à cette valeur est noté T_{EC50} (**Sanchez-Moreno et al., 1998**).

On peut déterminer un nouveau paramètre noté l'efficacité antiradicalaire (AE), il est donné par la formule suivante :

$$AE = 1/EC50 * T_{EC50}$$

4. Piégeage du radical hydroxyle :

Le $\bullet\text{OH}$ est le radical libre extrêmement réactif formé dans les systèmes biologiques à partir d'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques comme le fer et le cuivre suivant la réaction de Haber Weiss (**Castro et Freeman, 2001**). Ce radical possède un électron libre avec un potentiel de réduction plus élevé (2310 mV) lui permet de réagir avec les lipides, les protéines les polypeptides et l'ADN particulièrement la thiamine et la guanine (**Siddhuraju et Becker, 2007**).

In vitro, la capacité à piéger le radical hydroxyle par les extraits des plantes est basée sur la réaction de Fenton en mesurant la génération du radical $\bullet\text{OH}$ et son effet sur l'oxydation et la dégradation des molécules biologiques tels que le désoxyribose de l'ADN. Dans cette technique le système implique l'autoxydation du complexe Fe^{2+} -EDTA dans un milieu aqueux pour former $\text{O}_2^{\bullet-}$, qui est rapidement dismuté en H_2O_2 à pH 7.4. Après, ce dernier est interagit avec Fe^{2+} pour former les radicaux $\bullet\text{OH}$ en présence de l'acide ascorbique comme catalyseur (réaction de Fenton) ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}\text{-EDTA} \longrightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}\text{-EDTA}$)

La dégradation du désoxyribose par $\bullet\text{OH}$ dégage certains produits estimés en malonaldéhyde (MDA), d'un chromogène rose lors du chauffage avec l'acide thiobarbiturique et dans un milieu acide. La présence des anti-radicaux protège et diminue la production des MDA (**Halliwell et al., 1987**). Notant que, le rôle d'ascorbate est la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et cela provoque la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{3+}\text{-EDTA} + \text{ascorbate} \longrightarrow \text{Fe}^{2+}\text{-EDTA} + \text{ascorbate oxydé}$).

La méthode de désoxyribose adoptée dans cette étude est celle de **Halliwell et al (1987)**. Le mélange réactionnel contient les réactifs suivants : 0.4 ml de la solution tampon phosphate (50 mmol/l, pH = 7.4), 0.1 ml de l'extrait à différentes concentrations, 0.1 ml de l'EDTA (1.04 mmol/l), 0.1 ml de FeCl_3 (1 mmol/l) et 0.1 ml de 2-désoxyribose (60 mmol/l). La réaction est commencée par l'addition de 0.1 ml de l'acide ascorbique (2 mmol/l) et 0.1 ml de H_2O_2 (10 mmol/l). Après l'incubation à 37°C pendant 1 heure, 1 ml de l'acide thiobarbiturique (TBA) (10 g/l) est ajouté dans le milieu réactionnel suivi par 1 ml de l'acide

chlorhydrique (HCl) (25%). Les mélanges sont placés au bain marie à 100°C pendant 15 min et puis sont refroidit avec de l'eau. L'absorbance des solutions est mesurée à 532 nm avec le spectrophotomètre contre le blanc. La capacité du piégeage du radical hydroxyle est évaluée avec le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de 2-désoxyribose par les radicaux hydroxyles.

Le pourcentage du piégeage est calculé en basant sur la formule suivante :

$$\text{Pourcentage du piégeage (\%)} = [A_0 - (A_1 - A_2)] * 100 / A_0$$

Où :

A_0 : représente l'absorbance du contrôle sans extrait ; A_1 : représente l'absorbance après l'addition de l'extrait et de désoxyribose ; A_2 : représente l'absorbance de l'extrait sans désoxyribose.

Le contrôle positif utilisé est celui du BHA. Les expériences sont répétées en 3 fois.

5. Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique :

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

Le test de blanchiment de β -carotène utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de nos plantes est celui du **Sun et Ho (2005)**.

Une quantité de 2 mg de β -carotène est dissous dans 10 ml de chloroforme. On prélève 1 ml de cette solution dans une fiole contenant préalablement 200 mg Tween 20 et 20 μ l d'acide linoléique. Cette solution est évaporée au rotavapor jusqu'à disparition de l'odeur du chloroforme. Puis, un volume de 100 ml de l'eau oxygénée diluée est ajouté dans la fiole et le mélange résultant est agité vigoureusement. Dans des tubes à vis, l'émulsion β -carotène/acide linoléique de 4 ml est additionnée à 200 μ l des solutions méthanoliques de l'extrait ou de

l'antioxydant de synthèse BHA de différentes concentrations. Après une agitation proprement dite, l'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm ce qui correspond à $t = 0$ min contre le blanc contenant l'émulsion sans β -carotène. Les tubes bien fermés sont placés dans un bain marie à 50°C pendant 120 min. Ensuite, l'absorbance de chaque extrait est mesurée à 470 nm à $t = 120$ min. Pour le control positif, l'échantillon est remplacé par le BHA. Le control négatif est constitué par 200 μ l de méthanol au lieu de l'extrait où de l'antioxydant de synthèse. Tous les échantillons sont répétés en deux essais.

L'activité antioxydante (%) des extraits est évaluée en termes de blanchiment de β -carotène en employant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \left[\frac{(A_{A(120)} - C_{C(120)})}{(C_{C(0)} - C_{C(120)})} \right] * 100$$

Où : $A_{A(120)}$: représente l'absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 120 min ;
 $C_{C(120)}$: représente l'absorbance du contrôle à 120 min ; $C_{C(0)}$: représente l'absorbance du contrôle à 0 min.

La valeur EC_{50} (ou IC_{50}) est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

6. Analyse statistique :

Les données expérimentales du dosage et l'évaluation de l'activité antioxydante obtenues ont été exprimés par une moyenne et plus ou moins l'écart type. Le coefficient de corrélation des propriétés antioxydante a été déterminé en utilisant les programmes Origin 6 et l'Excel 2003.

Partie résultats

CHAPITRE 1 : Rendements et teneurs des composés phénoliques

1. Rendements des extraits bruts :

L'extraction des composés phénoliques par le méthanol des plantes étudiées, nous a permis de déterminer les rendements de leurs extraits bruts (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Rendements des extraits bruts méthanoliques.

Extraits des plantes		Rendements (%)	Familles
<i>Pistacia atlantica</i>	PAF	33.43 ± 2.704	Anacardiacees
	Fraction Acétate	9.855 ± 1.817	
	Fraction butanolique	11.365 ± 0.035	
<i>Thymelea microphylla</i>	TMFe	9.533 ± 2.345	Thyméléacées
	TMT	7.45 ± 0.636	
<i>Marrubium deserti</i>	MDFe	10.88 ± 0.169	Lamiacées ou Labiées
	MDT	7.18 ± 1.041	
<i>Helianthemum lippii</i>	HLFe	10.453 ± 0.710	Cistacées
	HLF	9.203 ± 0.690	
	HLT	3.43 ± 0.559	
<i>Atriplex halimus</i>	AHFe	24 ± 1.414	Chénopodiacées
	AHT	7.5 ± 0.707	
<i>Anabasis articulata</i>	AAT	9.365 ± 2.665	
<i>Zygophyllum album</i>	ZAT	14.305 ± 3.811	Zygophyllacées
<i>Inula montana</i>	IMPf	10.195 ± 1.803	Astéracées ou Composées
<i>Cotula cinerea</i>	CCPf	15.79 ± 4.539	
<i>Pentzia monodiana</i>	PMPf	6.93 ± 2.299	

F : fruits ; Fe : feuilles ; T : tige ; Pf : partie fleurie.

Nous constatons que l'extrait brut des fruits de *P. atlantica* enregistre un fort rendement de l'ordre de 33.43 % suivi par l'extrait des feuilles d'*A. halimus* à raison de 24 %. D'autres

rendements plus au moins considérables ont été observés dans les extraits de *Z. album* (14.305 %) et *C. cinerea* (15.79 %). En ce qui concerne les autres extraits, les valeurs varient entre 3.43 à 11.365 % correspondant à l'extrait des fruits d'*H. lippii* et la fraction d'acétate d'éthyle des fruits de *P. atlantica*. Ces rendements sont d'autant plus élevés dans les feuilles par rapport aux autres parties de la plante.

2. Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins :

Les analyses quantitatives des phénols totaux, des tannins et des flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en mg équivalent d'acide gallique et mg équivalent de catéchine par g de la matière sèche (**Figures 10, 11 et 12**).

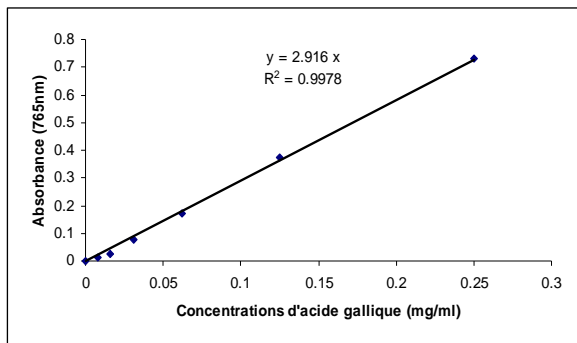


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

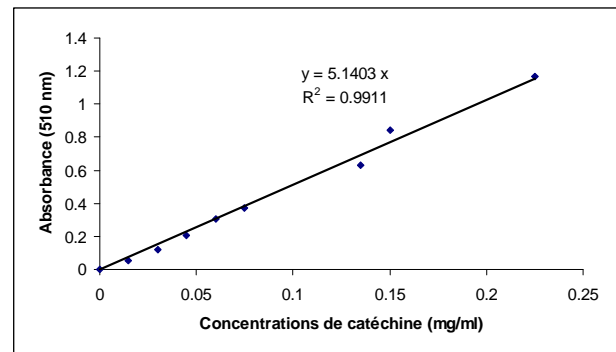


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

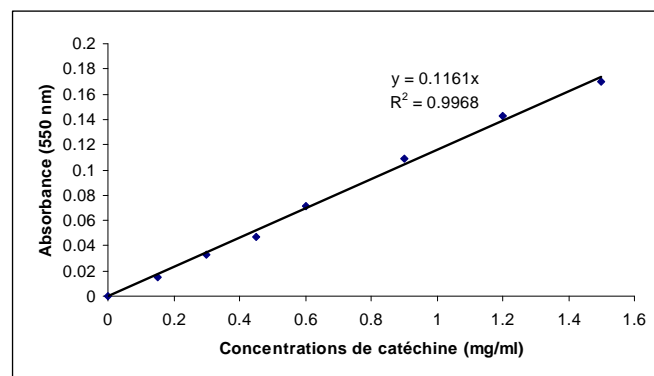


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.

Le tableau 4 résume les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes des extraits bruts méthanoliques des plantes.

Tableau 4 : Teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes des dix plantes.

Extraits méthanoliques		Phénols totaux (mg EAG/g MS) ^a	Flavonoïdes (mg EC/g MS) ^b	Tannins (mg EC/g MS) ^c
<i>Pistacia atlantica</i>	PAF	285.956 ± 10.257	12.441 ± 0.256	3.066 ± 0.151
<i>Thymelea microphylla</i>	TMFe	257.407 ± 89.334	4.184 ± 0.040	6.916 ± 0.440
	TMT	201.646 ± 4.655	2.979 ± 0.133	4.134 ± 0.317
<i>Marrubium deserti</i>	MDFe	235.185 ± 6.110	5.871 ± 0.200	25.021 ± 3.442
	MDT	133.744 ± 27.353	3.173 ± 0.123	13.944 ± 1.377
<i>Helianthemum lippii</i>	HLFe	60.956 ± 2.549	4.184 ± 0.206	10.378 ± 1.087
	HLF	74.211 ± 1.188	3.573 ± 0.154	4.677 ± 0.341
	HLT	46.090 ± 6.456	1.669 ± 0.026	9.293 ± 1.389
<i>Atriplex halimus</i>	AHFe	10.127 ± 2.244	2.485 ± 0.017	9.118 ± 0.684
	AHT	3.776 ± 0.067	0.564 ± 0.035	1.421 ± 0.169
<i>Anabasis articulata</i>	AAT	43.141 ± 0.628	4.854 ± 0.2154	7.260 ± 0.364
<i>Zygophyllum album</i>	ZAT	6.927 ± 0.628	1.610 ± 0.020	4.349 ± 0.569
<i>Inula montana</i>	IMPf	20.246 ± 1.064	6.523 ± 0.110	9.293 ± 0.690
<i>Cotula cinerea</i>	CCPf	22.222 ± 0.411	3.931 ± 0.061	8.613 ± 0.186
<i>Pentzia monodiana</i>	PMPf	9.876 ± 0.823	2.292 ± 0.046	4.480 ± 0.470

F : fruits ; Fe : feuilles ; T : tige ; Pf : partie fleurie. ^a mg équivalent d'acide gallique/ g de la matière sèche. ^{b, c} mg équivalent de catéchine/g de la matière sèche.

L'extrait des fruits du *P. atlantica* possède une teneur plus élevée en phénols totaux de l'ordre de 285.956 ± 10.257 mg EAG /g MS. Les teneurs en flavonoïdes et tannins enregistrées égalent à 12.441 ± 0.256 et 3.066 ± 0.151 mg EC/g MS respectivement.

Pour *T. microphylla* et *M. deserti*, les quantités des phénols totaux observées dans les feuilles égalent à 257.407 et 235.185 mg/g respectivement. Ces valeurs sont importantes par rapport à celles trouvés dans les tiges (TMT, 201.646 ± 4.655 mg/g ; MDT, 133.744 ± 27.353 mg/g) (Benhammou *et al.*, 2009a).

Chez *H. lippii*, les teneurs obtenues sont de : 46.090 mg/g dans les tiges, 60.956 dans les feuilles et 74.211 mg/g dans les fruits. Pour les autres plantes, les teneurs varient entre 3.776 ± 0.067 mg/g dans l'extrait brut des tiges *A. halimus* (**Benhammou et al., 2009b**) et 22.222 ± 0.411 mg/g dans l'extrait de *C. cinerea*.

Les tannins de tous les extraits ont des teneurs dans l'intervalle qui varie de 1.421 dans les tiges d'*A. halimus* à 25.021 mg/g dans les feuilles de *M. deserti*. Par contre, les flavonoïdes enregistrent des valeurs de l'ordre 0.564 mg/g dans l'extrait des tiges d'*A. halimus* à 12.44 mg/g dans l'extrait des fruits de *P. atlantica*.

Nous constatons que, les plantes du Sahara possèdent des teneurs élevées en tannins par rapport aux flavonoïdes.

CHAPITRE 2 : Pouvoir antioxydant des composés phénoliques

1. Introduction :

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des plantes a été réalisée par cinq techniques chimiques (la capacité antioxydante totale, la réduction de fer, le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical hydroxyle et le blanchiment du β -carotène).

2. Méthode de la Capacité anioxydante totale (CAT) :

La figure 13 montre que tous les extraits présentent des activités antioxydantes différentes. L'extrait méthanolique des fruits de *P. atlantica* (PAF) possède la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de 45.516 ± 1.635 mg EAA/g MS. Les deux fractions acétate et butanolique du PAF révèlent une activité réductrice de l'ordre de 31.209 ± 1.874 et 20.215 ± 1.026 mg/ g. Les extraits des feuilles de *M. deserti* (20.465 ± 0.061 mg/ g), d'*I. montana* (18.995 ± 0.448 mg/ g), les fruits d'*H. lippii* (17.415 ± 2.547 mg/ g), *C. cinerea* (17.190 ± 1.273 mg/ g) et les tiges *T. microphylla* (16.850 ± 0.809 mg/ g) montrent une activité considérable.

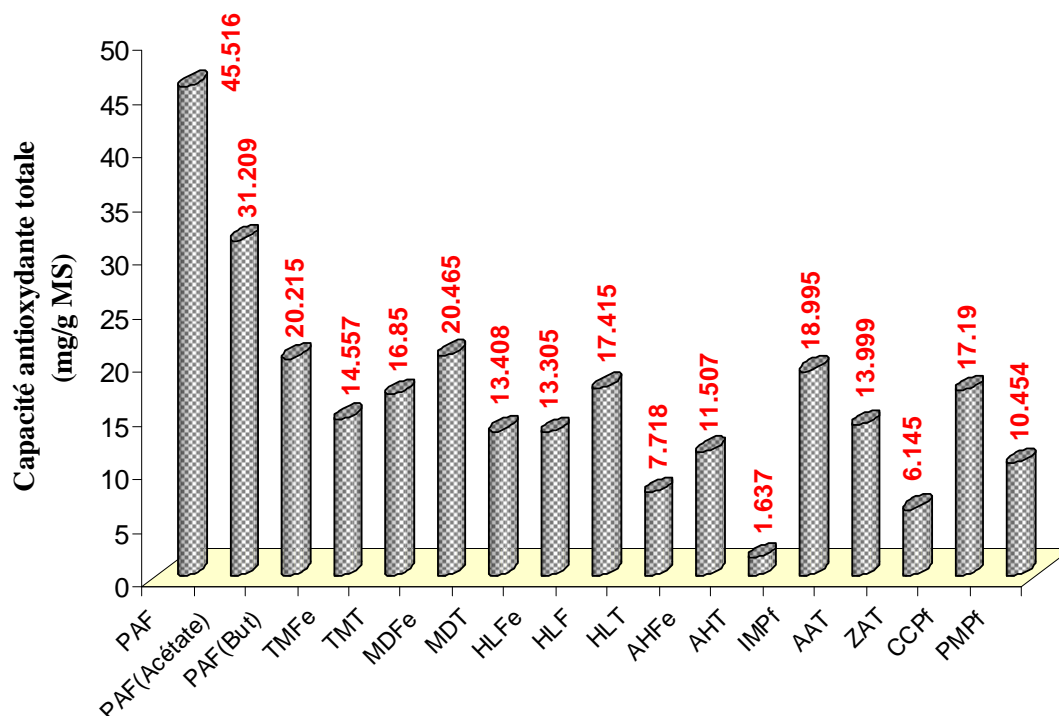


Figure 13 : Comparaison de la capacité antioxydante totale des extraits des plantes étudiées. *P. atlantica* (PAF) ; *T. microphylla* (TMFe, TMT) ; *M. deserti* (MDFe, MDT) ; *H. lippii* (HLFe, HLF, HLT) ; *A. halimus* (AHFe, AHT) ; *A. articulata* (AAT) ; *Z. album* (ZAT) ; *I. montana* (IMPf) ; *C. cinerea* (CCPf) ; *P. monodiana* (PMPf) ; F : fruits ; Fe : feuilles ; T : tige ; Pf : partie fleurie.

Concernant les extraits d'*H. lippii* (feuilles), *M. deserti* (tiges), *A. articulata* et *T. microphylla* (feuilles), les valeurs enregistrés sont comparables et égalent à 13.305 ± 0.598 , 13.408 ± 0.288 , 13.999 ± 0.624 et 14.557 ± 0.696 mg/ g. Pour les autres, l'activité réductrice reste faible de l'ordre de 1.637 ± 0.802 et 11.507 ± 0.604 mg/ g.

A- Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, tannins) et la CAT :

En établissant la relation entre les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins et la capacité antioxydante totale des différents extraits des plantes étudiées, la figure 14 nous montre qu'il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en tannins et la capacité antioxydante totale ($R^2 = 0.003$) mais cette relation est faible avec les phénols totaux avec $R^2 = 0.450$. Par contre, l'activité réductrice est fortement liée à la teneur en flavonoïdes avec $R^2 = 0.992$.

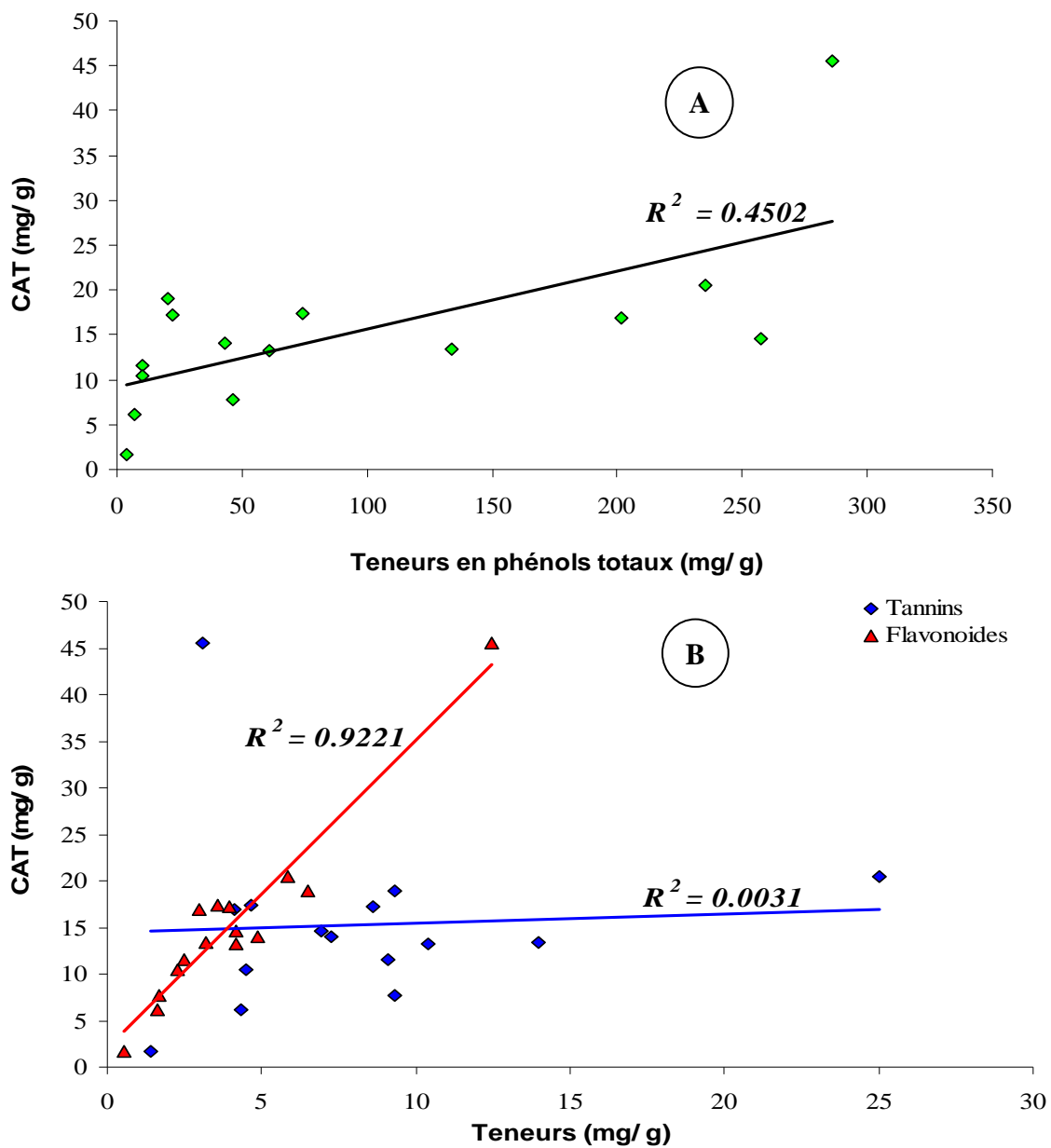


Figure 14 : Relation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et les tannins (B).

3. Réduction de fer :

Les résultats de l'activité réductrice des extraits méthanoliques des plantes étudiées sont représentés dans la figure 15. Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration.

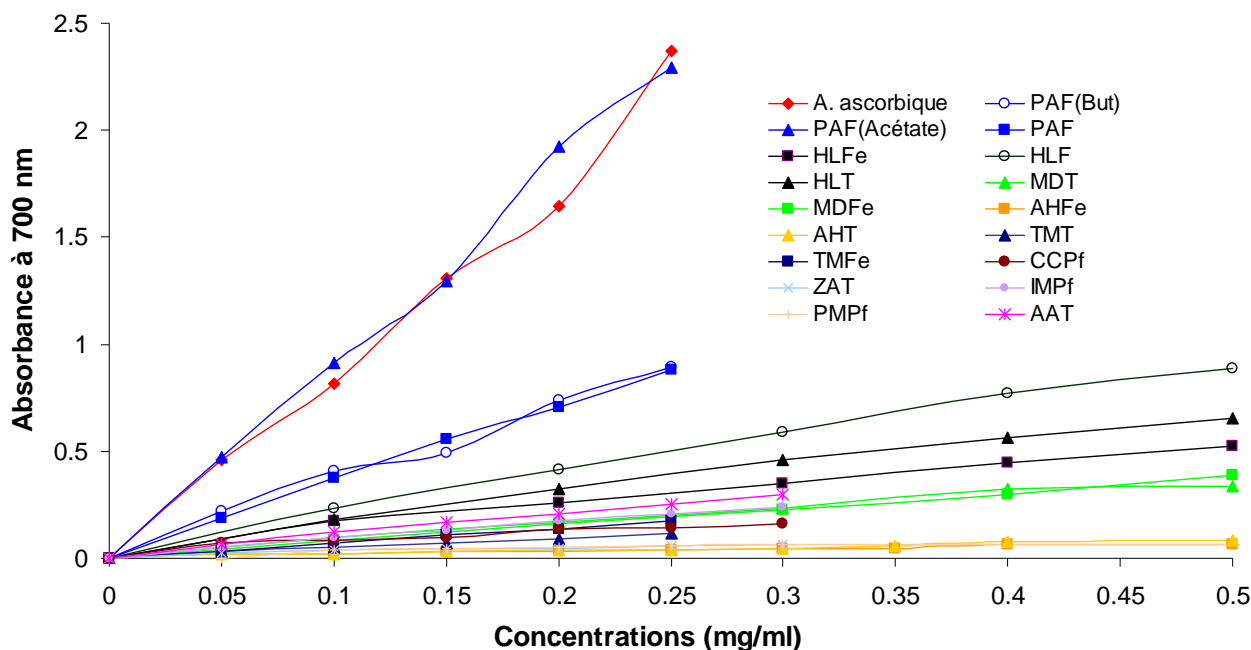


Figure 15 : Pouvoir réducteur des extraits des plantes étudiées.

P. atlantica (PAF) ; *T. microphylla* (TMFe, TMT) ; *M. deserti* (MDFe, MDT) ; *H. lippii* (HLFe, HLF, HLT) ; *A. halimus* (AHFe, AHT) ; *A. articulata* (AAT) ; *Z. album* (ZAT) ; *I. montana* (IMPf) ; *C. cinerea* (CCPf) ; *P. monodiana* (PMPf) ; F : fruits ; Fe : feuilles ; T : tige ; Pf : partie fleurie.

Le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique et les fractions butanolique et acétate d'éthyle des fruits de *P. atlantica* s'élèvent de 0.190, 0.217 et 0.470 à la concentration 0.05 mg/ml à 0.708, 0.739 et 1.922 à la concentration 0.2 mg/ml respectivement. Nous avons constaté que c'est la fraction acétate d'éthyle (2.292) qui présente une forte activité antioxydante comparable à l'acide ascorbique (2.3675) à 0.25 mg/ml.

L'extrait des fruits d'*H. lippii* présente un pouvoir réducteur considérable par rapport aux autres plantes illustrées dans la figure 15.

Nous avons déterminé la concentration IC₅₀ pour comparer l'activité réductrice des extraits, les résultats sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Valeurs de la concentration IC₅₀ des extraits des plantes étudiées.

Extraits méthanoliques		IC ₅₀ (mg/ml)
<i>Pistacia atlantica</i>	PAF	0.137 ± 0.001
	PAF (Acétate)	0.055 ± 0.002
	PAF (But)	0.140 ± 0.010
<i>Thymelea microphylla</i>	TMFe	0.726 ± 0.037
	TMT	1.174 ± 0.078
<i>Marrubium deserti</i>	MDFe	0.656 ± 0.007
	MDT	0.713 ± 0.010
<i>Helianthemum lippii</i>	HlFe	0.466 ± 0.009
	HlF	0.253 ± 0.004
	HlT	0.353 ± 0.009
<i>Atriplex halimus</i>	AHFe	4.558 ± 0.793
	AHT	3.248 ± 0.235
<i>Anabasis articulata</i>	AAT	0.520 ± 0.007
<i>Zygophyllum album</i>	ZAT	3.948 ± 0.770
<i>Inula montana</i>	IMPf	0.635 ± 0.004
<i>Cotula cinerea</i>	CCPf	1.174 ± 0.047
<i>Pentzia monodiana</i>	PMPf	3.640 ± 0.509
Acide ascorbique		0.063 ± 0.002

F : fruits ; Fe : feuilles ; T : tige ; Pf : partie fleurie.

Les concentrations IC₅₀ les plus faibles sont signalées dans la fraction acétate et l'acide ascorbique à raison de 0.055 ± 0.002 et 0.063 ± 0.002 mg/ ml respectivement. Pour les autres extraits, les valeurs de IC₅₀ sont de 0.137 ± 0.001 mg/ ml pour les fruits de *P. atlantica* à 0.726 ± 0.037 mg/ ml pour les feuilles de *T. microphylla*. En effet, la concentration IC₅₀ la plus élevée est enregistrée pour l'extrait méthanolique des feuilles *A. halimus* (AHFe) (4.558 ± 0.793 mg/ ml) comparativement aux extraits de *Z. album*, *P. modiana*, *A. halimus* (tiges), *C. cinerea* et *T. microphylla* (tiges) dont les valeurs IC₅₀ égalent à 3.948 ± 0.770, 3.640 ± 0.509, 3.248 ± 0.235, 1.174 ± 0.047 et 1.174 ± 0.078 mg/ ml respectivement.

L'efficacité de réduction de fer est inversement proportionnelle à la valeur IC₅₀, elle est de l'ordre croissant selon le classement suivant :

PAF (Acétate) > **A. ascorbique** > PAF > PAF (But) > HLF > HLT > HLFe > AA > IM > MDT > TMFe > CC = TMT > AHT > PM > ZA > AHFe.

Ces résultats nous ont permis de conclure que la fraction acétate des fruits de *P. atlantica* présente une meilleure activité antioxydante par rapport à l'acide ascorbique et tous les extraits

A- Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, tannins) et les IC₅₀ :

Dans le but d'établir la relation entre la réduction de fer et les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins, la figure 16 (A et B) illustre la variation d'IC₅₀ en fonction des teneurs. Nous remarquons la présence d'une faible corrélation entre les teneurs en phénols totaux des plantes et les concentrations IC₅₀ de réduction de fer avec un $R^2 = 0.2729$ (**Figure 16**), ceci représente 27.29 % de l'activité antioxydante des composés phénoliques.

La corrélation entre les IC₅₀ et les teneurs (flavonoïdes et tannin) révèle l'existence de deux lots de plantes. Dans le premier lot, *P. atlantica* (fruits), *T. microphylla* (feuilles et tiges), *M. deserti* (feuilles et tiges), *H. lippii* (feuilles, tiges et fruits), *I. montana*, *C. cinerea* et *A. articulata* ne présentent pas de corrélation entre la capacité à réduire le fer et les teneurs en tannins ($R^2 = 0.0125$). Pour les flavonoïdes, nous obtenons une très faible corrélation avec $R^2 = 0.1737$. Le deuxième lot renferme *A. halimus* (feuilles et tiges), *Z. album* et *P. monodiana* avec $R^2 = 0.5917$ et $R^2 = 0.9393$ pour les flavonoïdes et les tannins respectivement, ceci nous permet de déduire que la capacité réductrice est due à la participation de 93.93 % des tannins et 59,17 % des flavonoïdes.

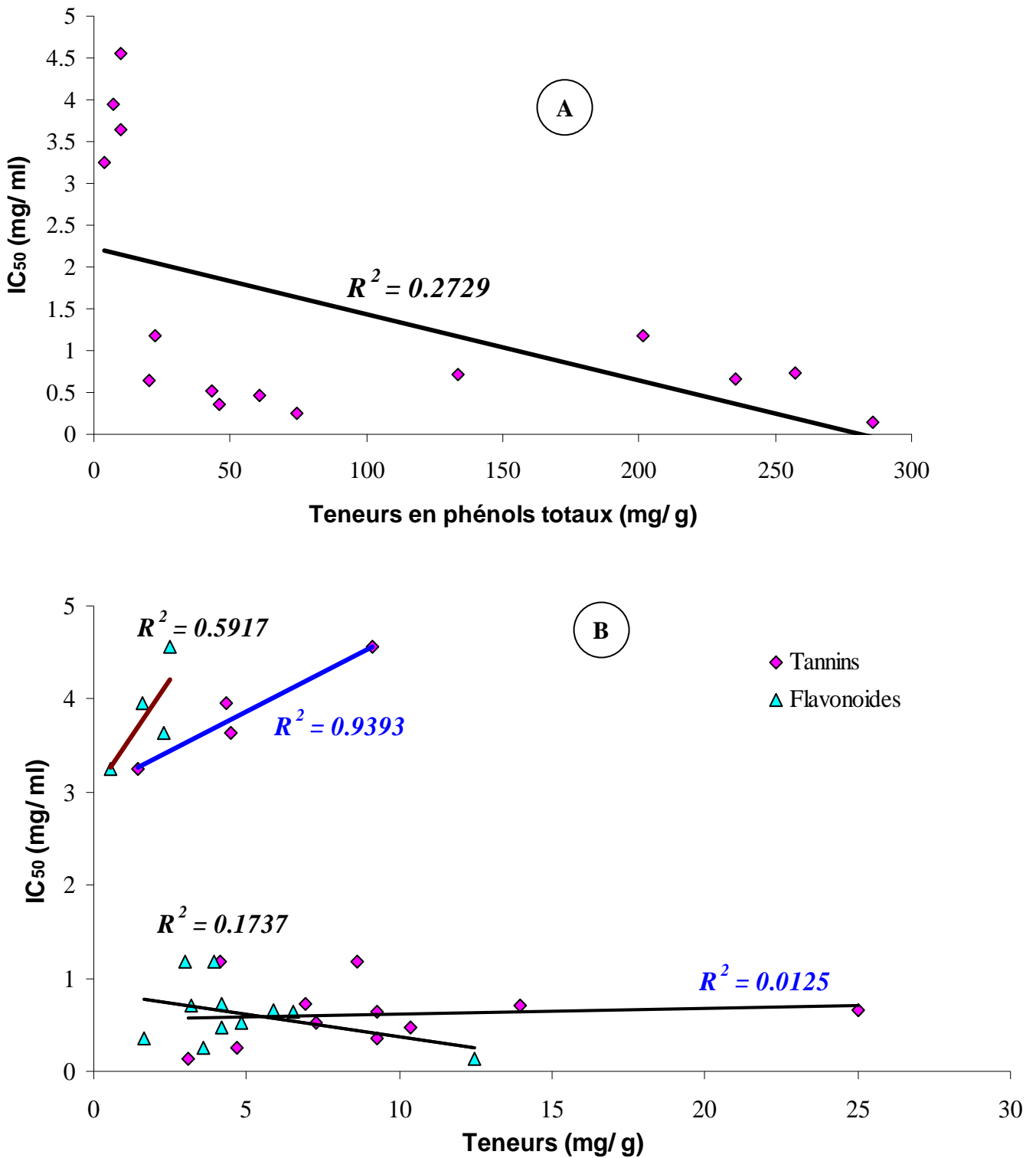


Figure 16 : Corrélation entre la réduction de fer exprimée en valeur IC₅₀ et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et les tannins (B).

4. Piégeage du radical libre DPPH[•] :

4.1. -Fraction résiduelle du DPPH[•] (DPPH[•]_{res}) en fonction du temps :

La présence des composés antioxydants dans les extraits diminue l'absorbance en fonction du temps (Figure 17).

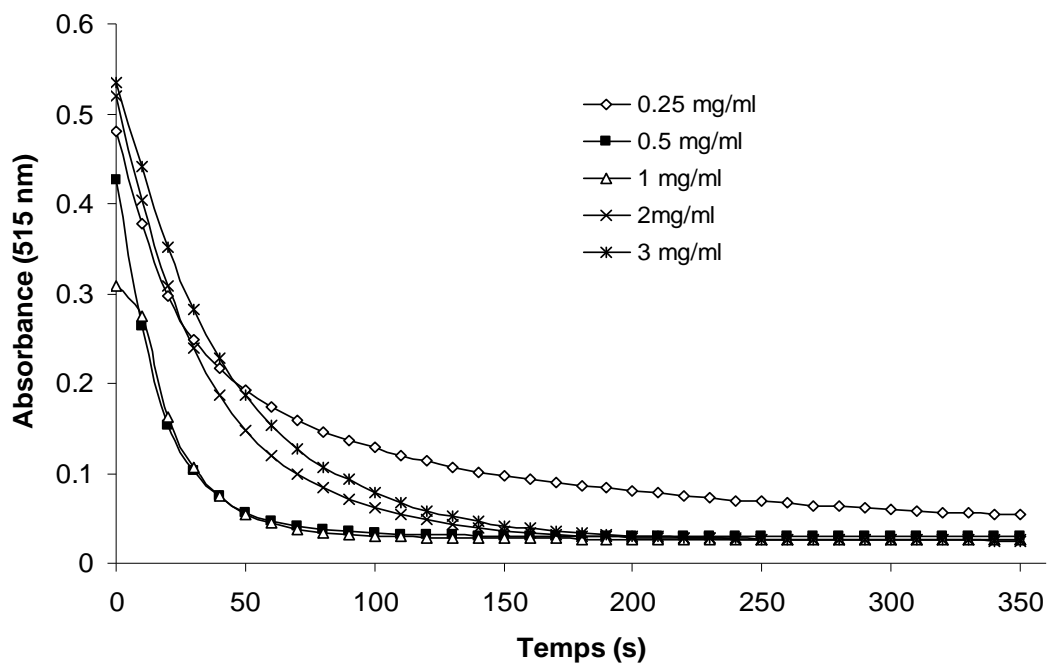


Figure 17 : Réduction de l'absorbance en fonction du temps des fruits de *P. atlantica* (la fraction acétate d'éthyle).

Ces résultats obtenus de l'absorbance en fonction du temps ne nous permettent pas de calculer l'efficacité antioxydante (EA). Pour cela, il est nécessaire de transformer ces données à des fractions résiduelles du DPPH[•] dans les solutions méthanoliques en fonction du temps en adoptant dans notre calcul l'équation de la régression linéaire suivante :

$$A_{515\text{nm}} = 24.41 \times [\text{DPPH}^{\bullet}]_t + 0.0022 \quad / \quad R^2 = 0.999$$

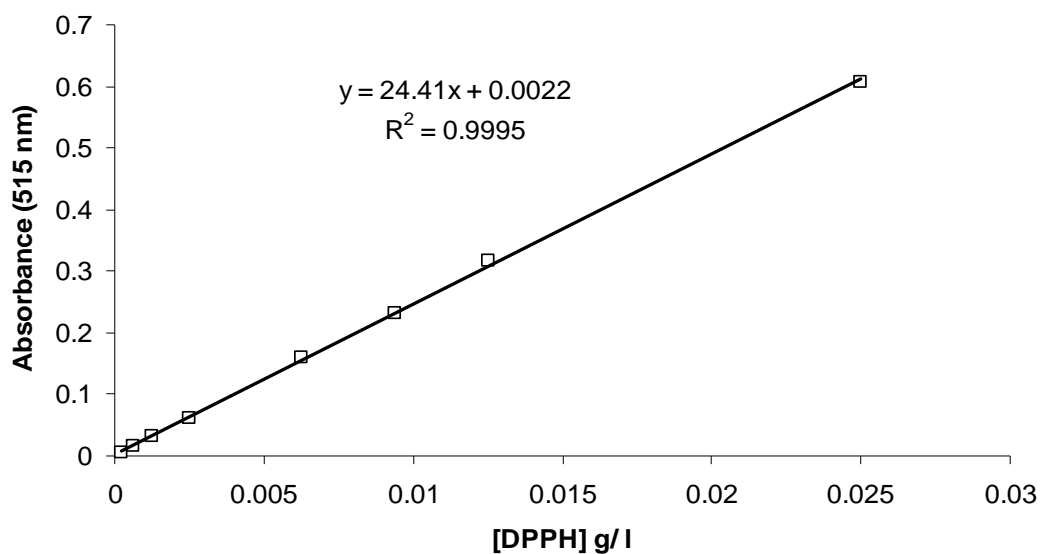
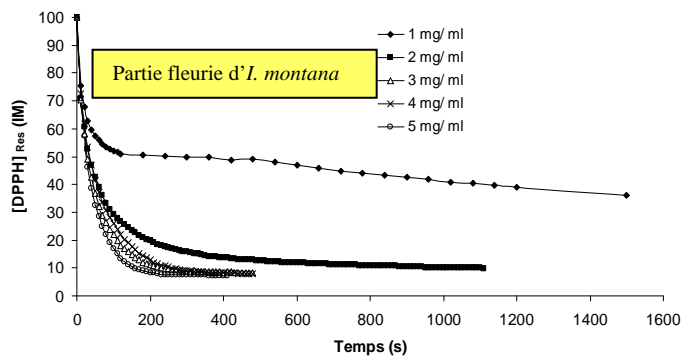
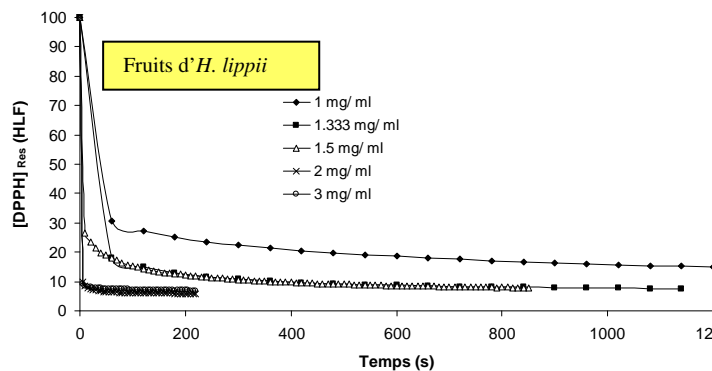
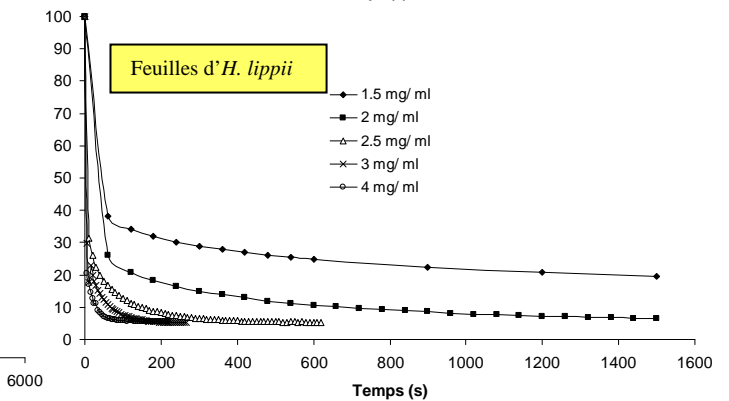
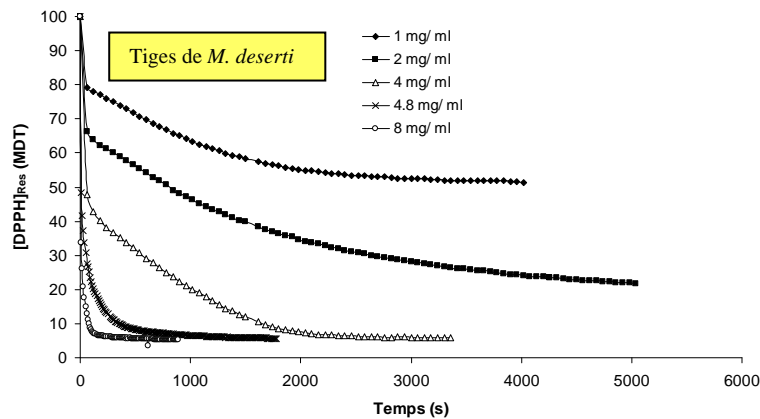
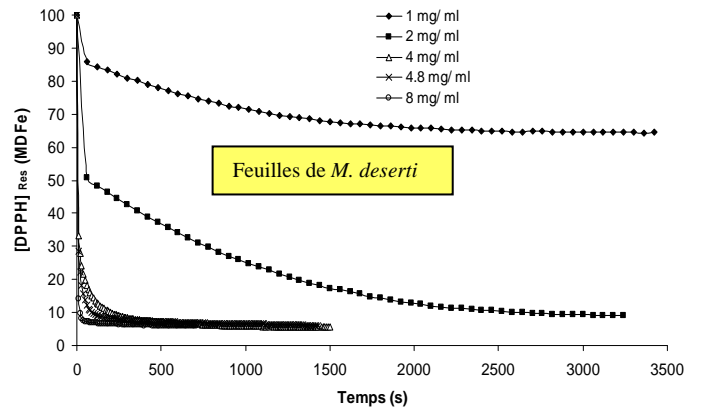
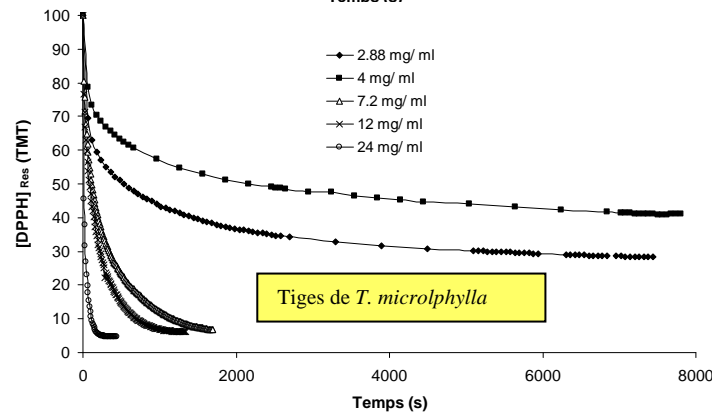
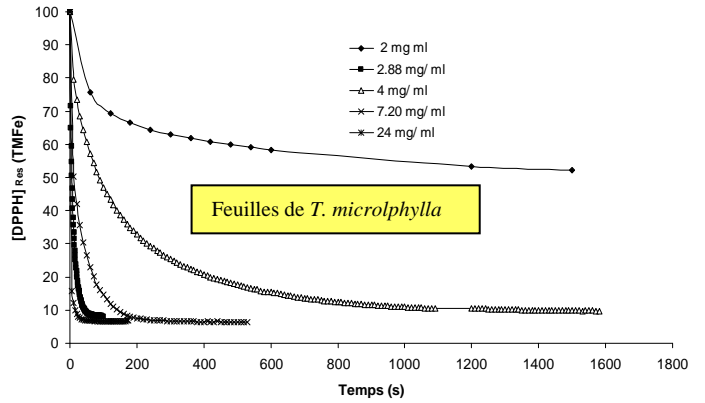
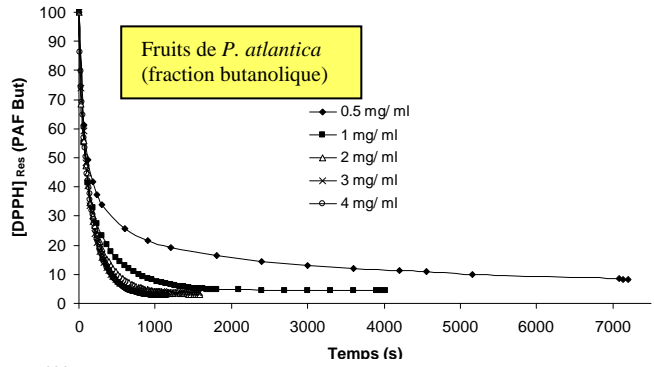
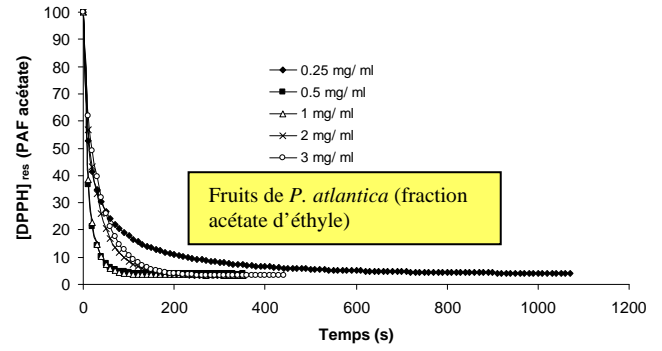
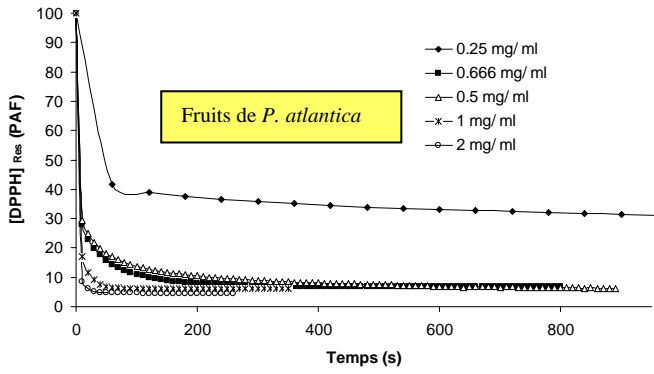


Figure 18 : Courbe d'étalonnage du radical DPPH•

Les courbes illustrées dans la figure 19, nous montrent que tous les extraits testés sont capables de neutraliser le radical DPPH• au cours du temps et en fonction de la concentration des antioxydants, ceci se traduit par la diminution de la concentration initiale de ce radical en comparaison avec les contrôles (l'acide ascorbique, le trolox et le BHT).

Partie résultats : Chapitre 2 : Pouvoir antioxydant des composés phénoliques



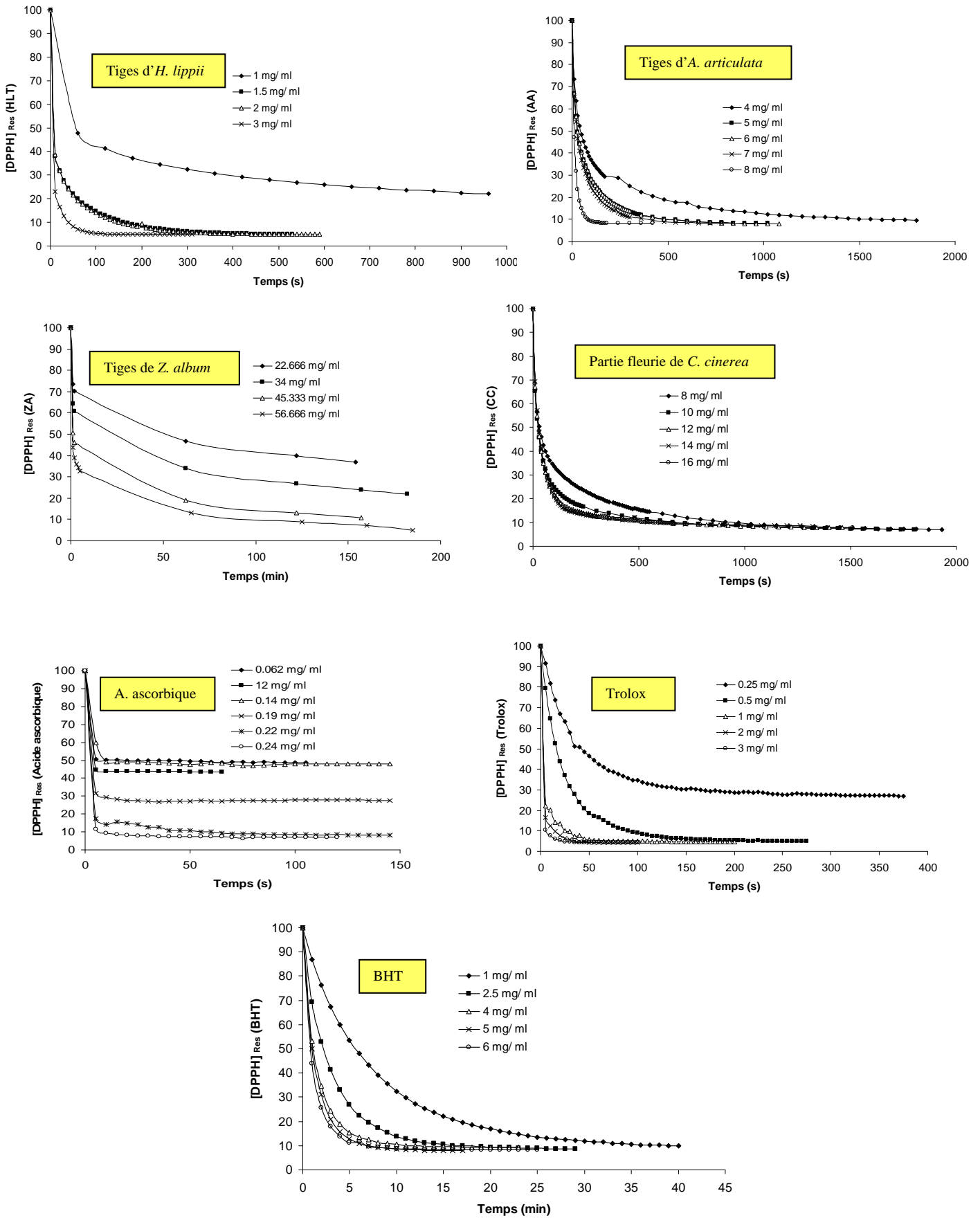


Figure 19 : Fraction résiduelle du DPPH* des extraits des plantes étudiées et des contrôles positifs en fonction du temps.

L'évaluation des pourcentages résiduels du DPPH[•] à la phase stationnaire en fonction des concentrations est résumée dans le tableau 6.

Tableau 6 : Comportements cinétiques des extraits bruts et des contrôles.

Extraits	Concentrations (mg/ml)	Concentrations (mg d'antioxydant/g DPPH [•])	Temps (min) à la phase stationnaire (ts)	% résiduels du DPPH [•] à la phase stationnaire
PAF	0.25	100	89	25.347
	0.5	200	14.5	6.250
	0.666	266.6	8.5	6.828
	1	400	5.33	5.974
	2	800	3	4.431
PAF (Acétate)	0.25	100	16.166	4.110
	0.5	200	4.833	3.875
	1	400	5.166	3.452
	2	800	5.333	3.252
	3	1200	6.166	3.169
PAF (But)	0.5	200	119	8.317
	1	400	65	4.298
	2	800	25.5	3.122
	3	1200	20	3.854
	4	1600	18.166	2.603
TMFe	2	800	98	47.530
	2.88	1152	15	8.119
	4	1600	25	9.834
	7.2	2880	8	6.405
	24	9600	1.833	6.695
TMT	2.88	1152	121	28.290
	4	1600	125	40.949
	7.2	2880	27.833	6.789
	12	4800	21.333	6.174
	24	9600	7	4.606
MDFe	1	400	56	64.366
	2	800	51	9.090
	4	1600	23.833	5.658
	4.8	1920	22.833	5.993
	8	3200	10.5	5.937
MDT	1	400	67	51.452
	2	800	138	17.985
	4	1600	52	5.923
	4.8	1920	28.33	5.678
	8	3200	14.166	5.244
HLFe	1.5	600	135	9.592
	2	800	38	5.653
	2.5	1000	10.333	5.274
	3	1200	4.416	5.158
	4	1600	3.333	5.508

HLF	1	400	86	7.575
	1.333	533.2	27	7.251
	1.5	600	14.166	7.845
	2	800	3	5.902
	3	1200	3.583	6.874
HLT	1	400	120	9.430
	1.5	600	8.166	5.056
	2	800	9	5.005
	3	1200	3.5	5.005
	4	1600	5.5	4.751
IMPf	1	400	129	9.245
	2	800	17.666	10.038
	3	1200	7.166	8.452
	4	1600	7.333	8.112
	5	2000	6	7.258
AAT	4	1600	30	9.548
	5	2000	16	8.230
	6	2400	17	7.890
	7	2800	14	8.204
	8	3200	2.5	8.361
ZAT	22.666	9066.56	154	37.04
	33.999	13599.84	182	21.777
	45.333	18133.12	157	10.874
	56.666	22666.4	185	4.946
CCPf	8	3200	39.166	6.52
	10	4000	28	7.112
	12	4800	21.333	7.952
	14	5600	20	8.646
	16	6400	22.166	7.900
Acide ascorbique	0.062	24.8	1.5	49.03
	0.12	48	0.83	43.64
	0.14	56	2.75	47.88
	0.19	76	3.41	27.49
	0.22	88	2.91	7.98
	0.24	96	1.16	7.18
BHT	1	400	66	8.11
	2.5	1000	26	8.80
	4	1600	20	9.22
	5	2000	16	7.90
	6	2400	18	8.30
Trolox	0.25	100	6.16	26.93
	0.5	200	4.33	5.03
	1	400	2	4.76
	2	800	1.08	4.22
	3	1200	1.25	4.31

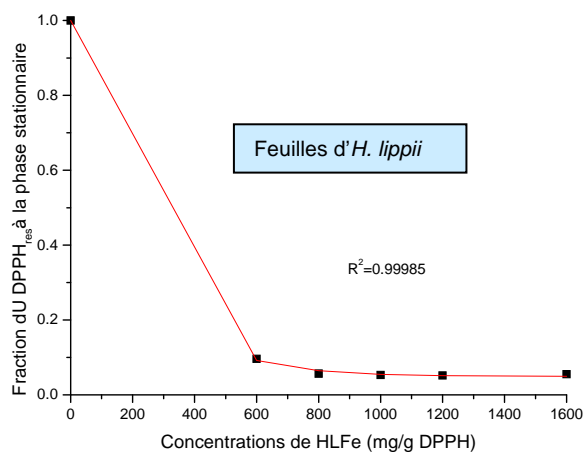
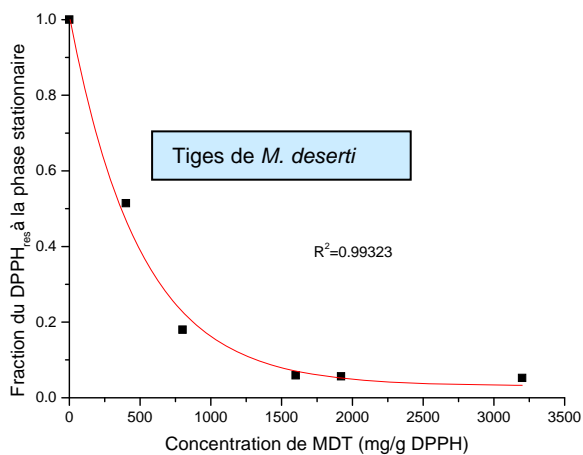
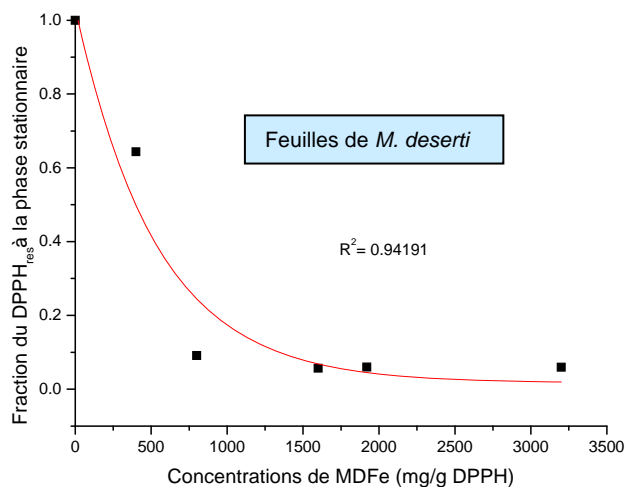
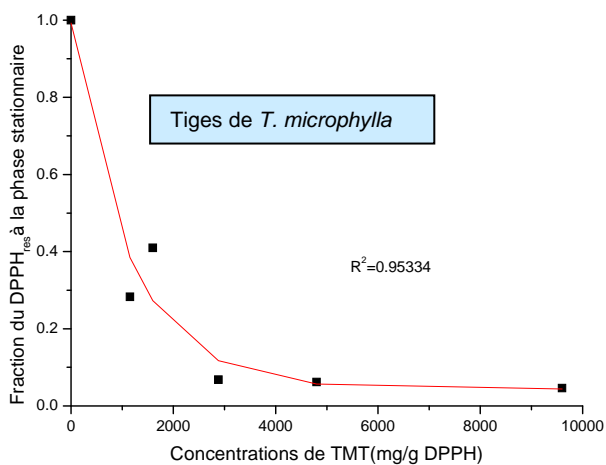
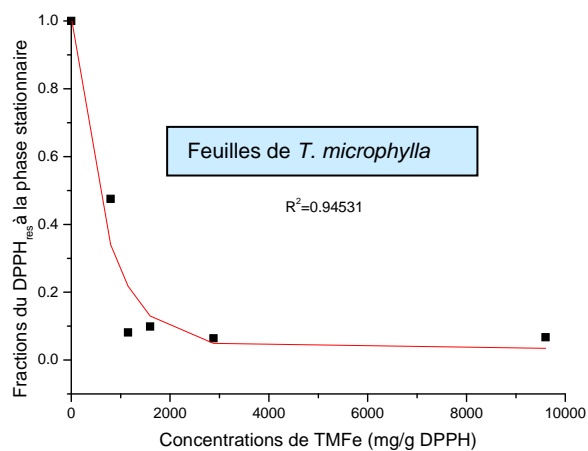
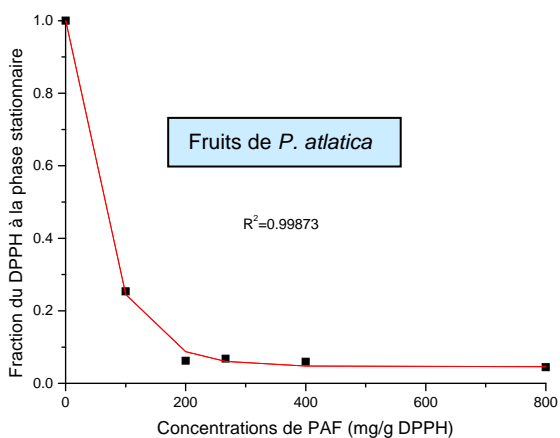
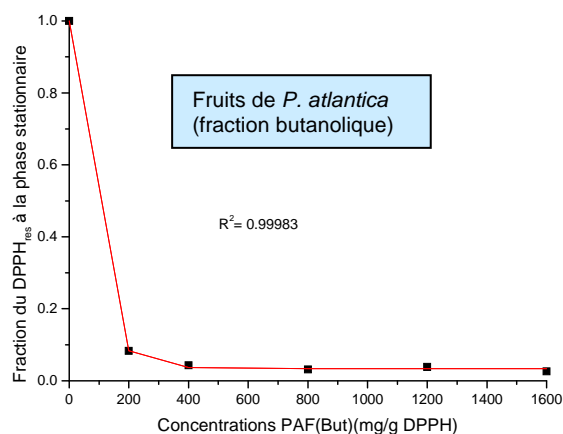
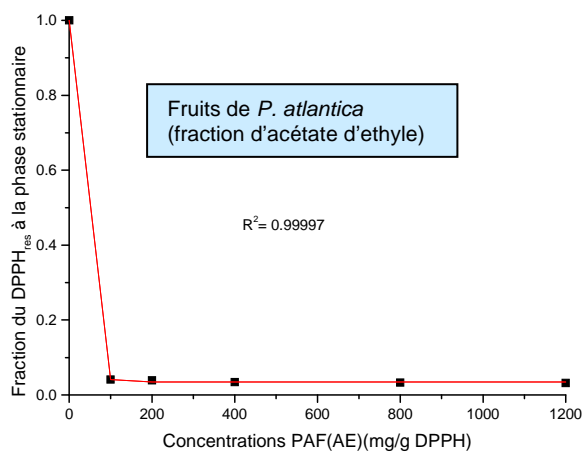
Nous observons que l'augmentation de la concentration de différents extraits des polyphénols et les contrôles révèle une diminution proportionnelle du pourcentage résiduel du

DPPH[•] à un point où il y a presque la réduction totale de ce radical à DPPH-H (cas de l'extrait de PAF (But) avec 2.603 % après 18.166 min).

A la concentration 0.5 mg/ ml, le pourcentage du DPPH résiduel de l'extrait brut de PAF égale à 6.250 % après 14.5 min. Concernant les fractions acétate d'éthyle et butanolique, les pourcentages du DPPH_{Res} sont équivalents à 3.875 et 8.317 % avec un temps à la phase stationnaire (ts) de 4.833 et 119 min respectivement. A la même concentration, le trolox ne laisse que 5.03 % de la concentration initiale du DPPH non réduit à ts = 4.33 min. Pour les autres extraits et à 4 mg/ ml, les pourcentages du DPPH_{Res} varient entre 4.751% pour HLT et 40.949 % pour TMT équivalents à 5.5 et 125 min respectivement. L'extrait de HLF présente un pourcentage de l'ordre de 5.508 % après 3.333 min. Cette valeur révèle une capacité de réduction mieux que celle du BHT qui montre un pourcentage de 9.22 % après 20 min et à 4 mg/ ml mais moins que l'acide ascorbique et le trolox.

4.2. Fraction résiduelle du DPPH[•] (DPPH[•]_{res}) en fonction des concentrations des antioxydants :

Afin d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits en polyphénols par rapport aux antioxydants de synthèse d'une part, et de savoir le comportement de la relation Temps-Concentration en antioxydants-Pourcentage du DPPH_{Res} d'autre part, il faut calculer le paramètre EC₅₀ qui est une mesure quantitative directe pour l'activité antioxydante. Il est défini comme la concentration de l'extrait brut des composés phénoliques nécessaire pour réduire 50 % de la concentration initiale du DPPH[•]. Il est déterminé à partir des pourcentages résiduels du DPPH[•] à la phase stationnaire en fonction des concentrations des extraits exprimés en mg d'antioxydant/g DPPH[•]. Le modèle utilisé est celui d'une équation exponentielle (**Figure 20**).



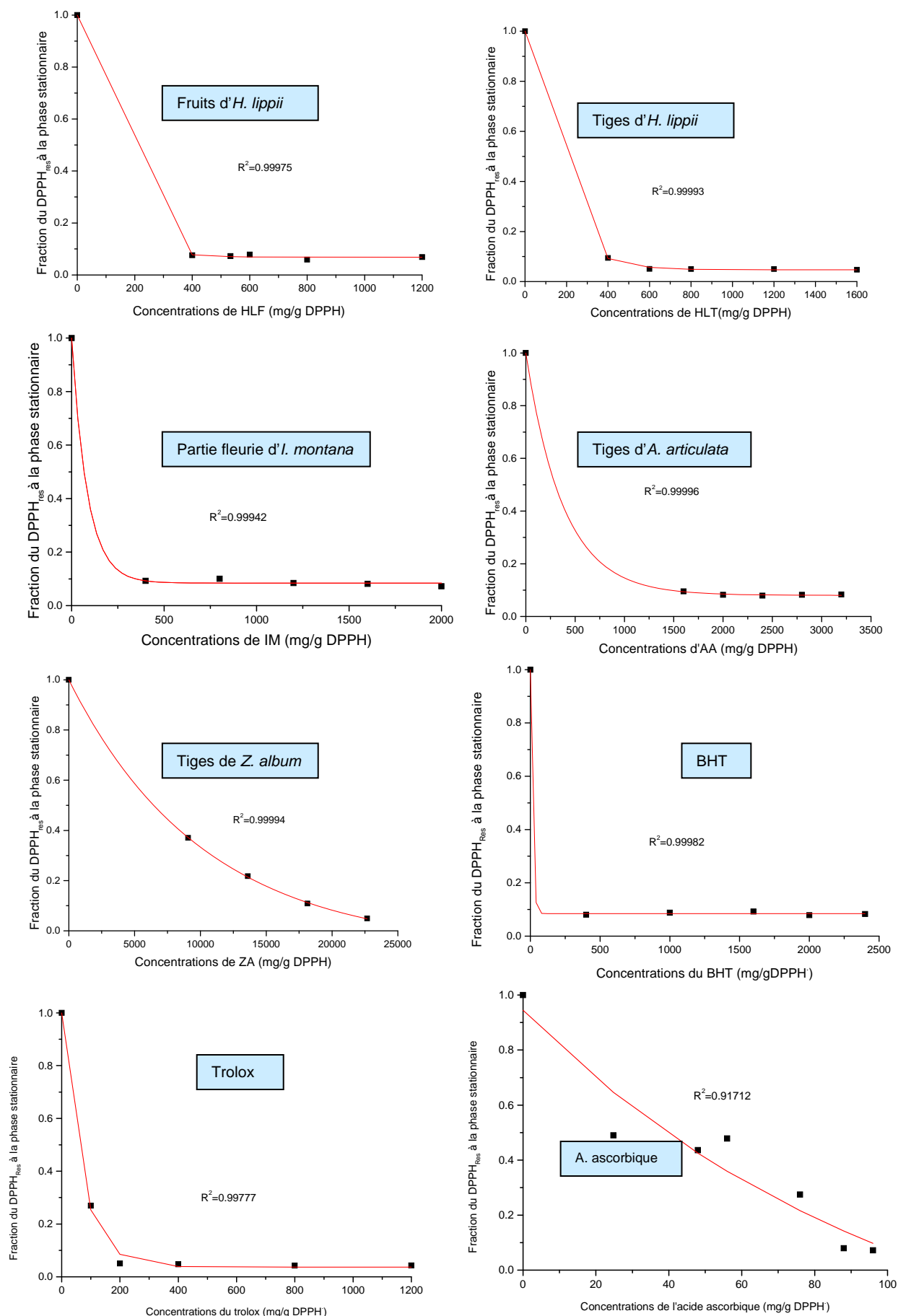


Figure 20 : Fractions résiduelles du DPPH• (DPPH_{res}•) à la phase stationnaire en fonction des concentrations des extraits et des contrôles (mg d'antioxydant/g DPPH•).

Après analyse de nos résultats nous déduisons à partir de ces courbes la concentration EC_{50} (**Tableau 6**). Le temps $T_{EC_{50}}$ est le temps nécessaire pour arriver au plateau de cette concentration. Il est obtenu par la modélisation des temps à la phase stationnaire en fonction des concentrations (**Figure 21, Tableau 6**).

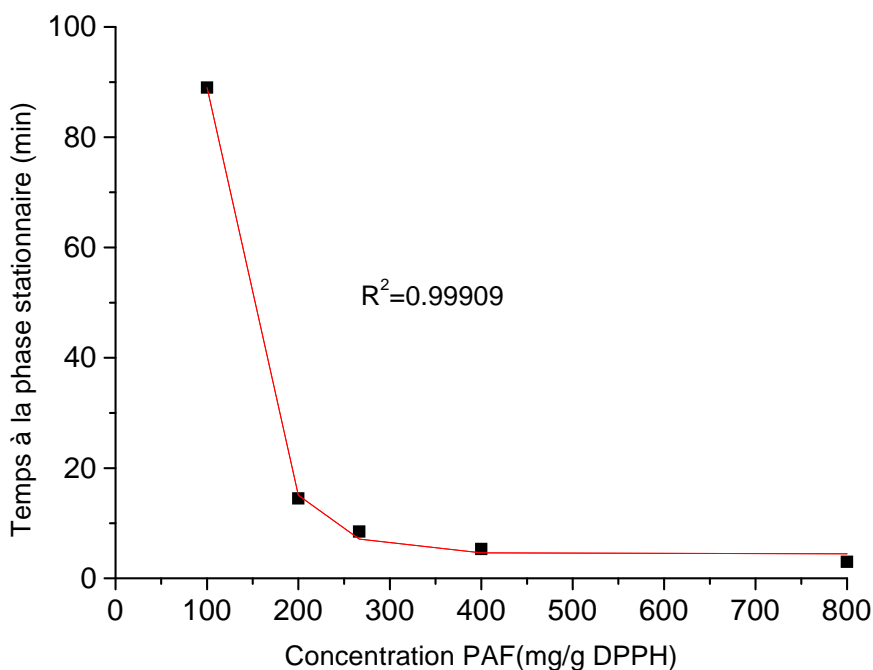


Figure 21 : Détermination du temps nécessaire à aboutir à la phase stationnaire de la concentration EC_{50} pour l'extrait brut des fruits de *P. atlantica*.

Tableau 7 : Détermination des concentrations EC₅₀, le temps et l'efficacité antiradicalaire des extraits et des contrôles

Extraits méthanoliques		EC ₅₀ (mg Antioxydant/ g DPPH)	R ²	Temps (T _{EC50}) (min)	R ²	AE ×10 ⁻⁵	EC ₅₀ (mg/ml)/ 30 min	R ²	AE (1/ EC ₅₀)
<i>P. atlantica</i>	PAF	47.400	0.998	255.935	0.999	8.243			
	PAF(Acétate)	14.641	0.999	232.753	0.800	29.344			
	PAF(But)	49.213	0.999	200.691	0.999	10.126			
<i>T. microphylla</i>	TMFe	512.751	0.945	1468.133	0.911	0.133			
	TMT	830.146	0.954	153.913	0.899	0.783			
<i>M. deserti</i>	MDFe	396.326	0.942	63.841	0.967	3.952			
	MDT	366.364	0.993	18.566	1	14.701			
<i>H. lippii</i>	HLFe	144.104	0.999	2766.490	0.999	0.251			
	HLF	66.284	0.999	1971.344	0.999	0.765			
	HLT	97.731	0.999	40330.405	0.998	0.025			
<i>A. halimus</i>	AHFe	/	/	/	/	/	31.837	0.995	0.031
	AHT	/	/	/	/	/	20.584	0.997	0.048
<i>I. montana</i>	IMPf	66.956	0.999	2017.088	0.999	0.74			
<i>A. articulata</i>	AAT	297.744	0.999	10927.271	1	0.03			
<i>Z. album</i>	ZAT	6310.041	0.999	/	/	/	29.487	0.999	0.034
<i>C. cinerea</i>	CCPf	462.186	0.996	50.732	0.999	4.264			
<i>P. monodiana</i>	PMPf	/	/	/	/	/	10.044	0.998	0.099
A. ascorbique		39.53	0.917	0.606	0.893	4174.462	0.088	0.996	11.363
BHT		13.468	0.999	161.524	0.997	45.969	0.133	0.954	7.518
Trolox		49.21	0.997	7.803	0.994	260.426	0.090	0.997	11.11

F : fruits ; Fe : feuilles ; T : tige ; Pf : partie fleurie

Nous constatons que la modélisation des résultats obtenus dans le tableau 7 est confirmée par le coefficient de corrélation qui varie entre 0,917 et 0.999.

En effet, la faible valeur EC_{50} signifie la forte activité antioxydante. Dans ce cas, la concentration EC_{50} de la fraction acétate d'éthyle des fruits de *P. atlantica* présente une bonne activité du piégeage du radical DPPH[•] de l'ordre de 14.641 mg d'antioxydant/ g DPPH en comparaison à celle de l'extrait brut (47.400 mg/ g) et de la fraction butanolique (49.213 mg/ g) de la même plante. Cette valeur reste plus au moins comparable à celle du BHT (13.468 mg/ g) et inférieure à celles de l'acide ascorbique (39.53 mg/ g) et le trolox (49.21 mg/ g).

Les extraits d'*H. lippii* (HLF, HLT et HLF_e) possèdent une activité antioxydante avec des EC_{50} de l'ordre de 66.284, 97.731 et 144.104 mg/ g respectivement. A propos de l'extrait d'*I. montana*, son activité est aussi considérable avec une EC_{50} de 66.956 mg/ g.

Les autres plantes (*T. microphylla*, *M. deserti*, *A. articulata*, *Z. album* et *C. cinerea*), présentent une faible activité antioxydante, les EC_{50} varient entre 297.744 mg/ g et 6310.041 mg/ g (**Tableau 6**).

Nous avons utilisé le paramètre de l'efficacité antiradicalaire (AE) pour classer les différents extraits qui ont un pouvoir antioxydant. Notant que, la faible concentration EC_{50} à un temps de réaction $T_{EC_{50}}$ court donne une valeur AE élevée (acide ascorbique, trolox et BHT).

En comparant la fraction acétate des fruits de *P. atlantica* et le BHT, les EC_{50} obtenus sont presque identiques, mais la différence du temps $T_{EC_{50}}$ égale à 71.229 min, ceci confirme que les EC_{50} sont indépendants des temps $T_{EC_{50}}$. L'efficacité antiradicalaire est de l'ordre de 29.344×10^{-5} et 45.969×10^{-5} pour la fraction acétate de PAF et le BHT respectivement. Les valeurs de AE des autres extraits varient entre 3.952×10^{-5} et 14.701×10^{-5} , et restent faible à celle du trolox (260.426×10^{-5}) et l'acide ascorbique (4174.462×10^{-5}).

Nous avons choisi la classification de l'efficacité antiradicalaire (AE) établie par **Sanchez-Morano et al (1998)** :

($AE \leq 1 \times 10^{-3}$ faible; $1 \times 10^{-3} < AE \leq 5 \times 10^{-3}$ moyenne; $5 \times 10^{-3} < AE \leq 10 \times 10^{-3}$ élevée ; $AE > 10 \times 10^{-3}$ très élevée).

L'ordre de classification des AE des extraits des dix plantes et des contrôles est le suivant :

Acide ascorbique > Trolox > BHT > PAF (Acétate) > MDT > PAF (But) > PAF > CC > MDT > TMT > HLF > IM > HLF_e > TMFe > AA > HLT.

Les valeurs EC_{50} calculées après 30 min sont égales à 10.044, 20.584, 29.487 et 31.837 mg/ml correspondants aux extraits de PM, AHT, ZA et AHFe respectivement. Cette activité

antioxydante est faible par rapport aux contrôles qui présentent des concentrations de 0.088, 0.090 et 0.133 de l'acide ascorbique, le trolox et le BHT respectivement.

A- Corrélation entre les teneurs (flavonoïdes, tannins) et l'efficacité antiradicalaire :

Nous avons voulu établir une corrélation entre l'efficacité antiradicalaire (AE) et les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins. Le résultat obtenu nous montre la présence d'une corrélation linéaire entre le paramètre AE et la teneur en flavonoïdes à raison de 0.642 (**Figure 22**). Pour les phénols totaux et les tannins, les corrélations de ces composés à piéger le radical DPPH ne représentent que 8.56 et 5.76 % où les coefficients de corrélation égalent à 0.0856 et 0.0576.

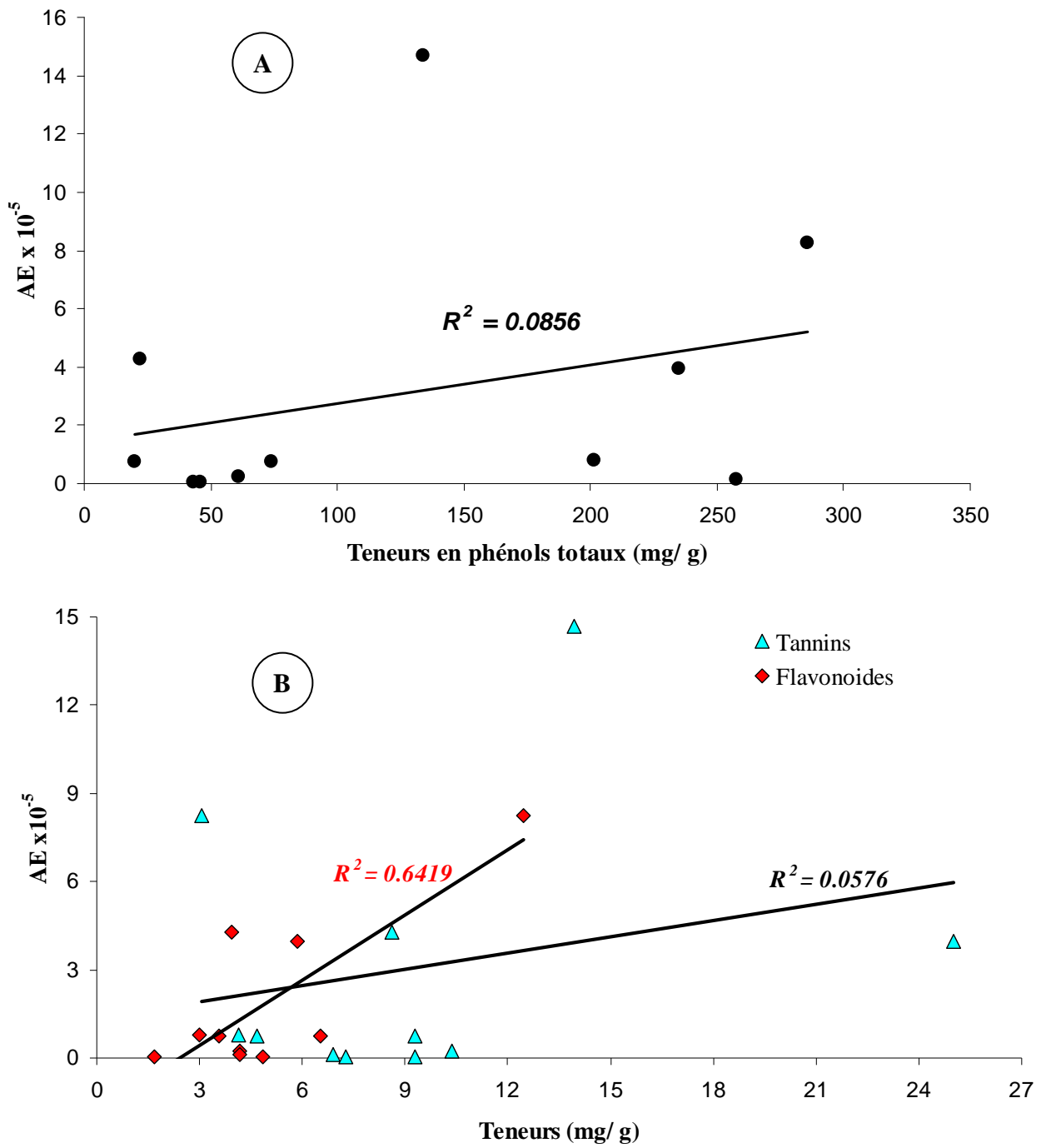


Figure 22 : Corrélation entre l'efficacité antiradicalaire et les teneurs en flavonoïdes et les tannins.

5. Piégeage du radical hydroxyle :

Nous observons une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations (**Figure 23**). Tous les extraits présentent une activité à piéger le radical hydroxyle supérieure à 35.604 % à partir de la concentration 0.5 mg/ml. A 1 mg/ml, ces pourcentages dépassent 50 % à l'exception des extraits de *Z. album* et *A. halimus* (feuilles). Les extraits des tiges de certaines plantes : *H. lippii*, *M. deserti*, *T. microphylla* et *A. halimus* ont une bonne capacité inhibitrice comparée aux extraits des feuilles (HLFe, MDT, TMFe et AHFe). Les fractions butanolique et acétate d'éthyle des fruits de *P. atlantica* (PAF) ont une meilleure activité par rapport à tous les extraits avec des pourcentages égaux à 64.427 et 82.412 % respectivement.

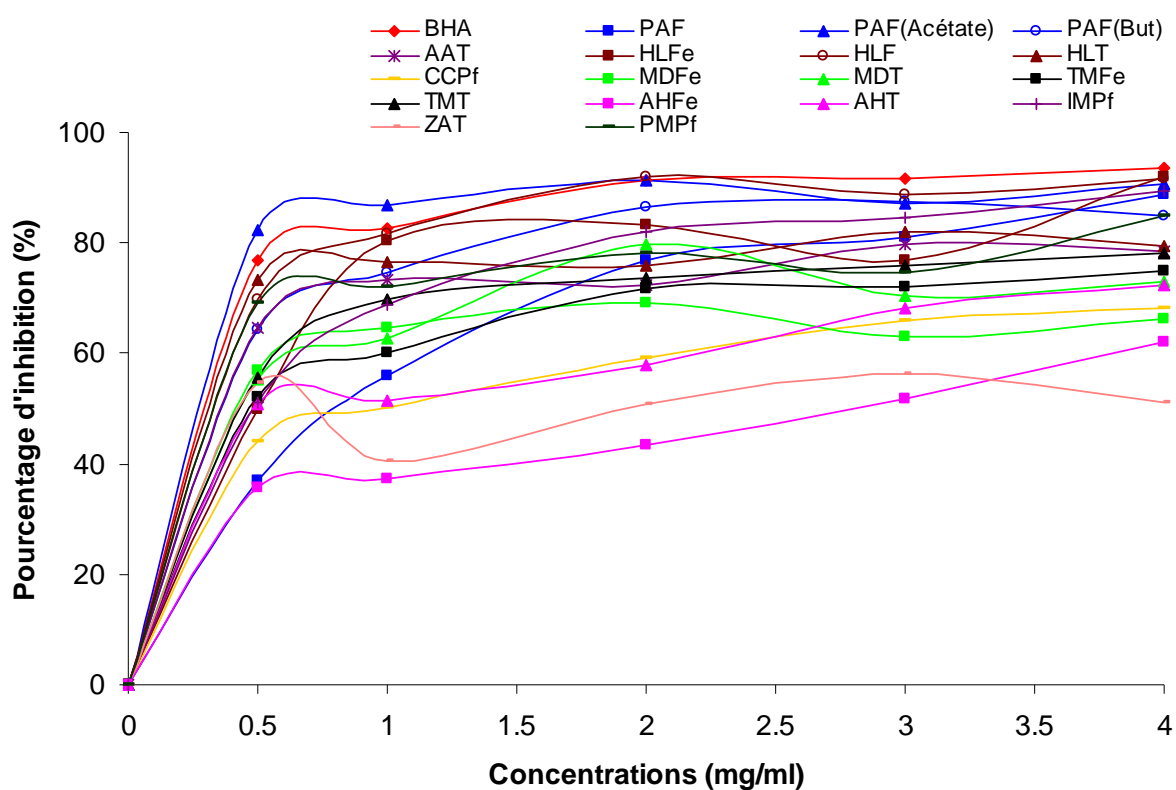


Figure 23 : Pourcentages d'inhibition de l'oxydation du désoxyribose induits par le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton en fonction des concentrations.

Nous avons déterminé les valeurs des concentrations EC_{50} pour comparer la puissance inhibitrice de l'oxydation du désoxyribose (**Figure 24**).

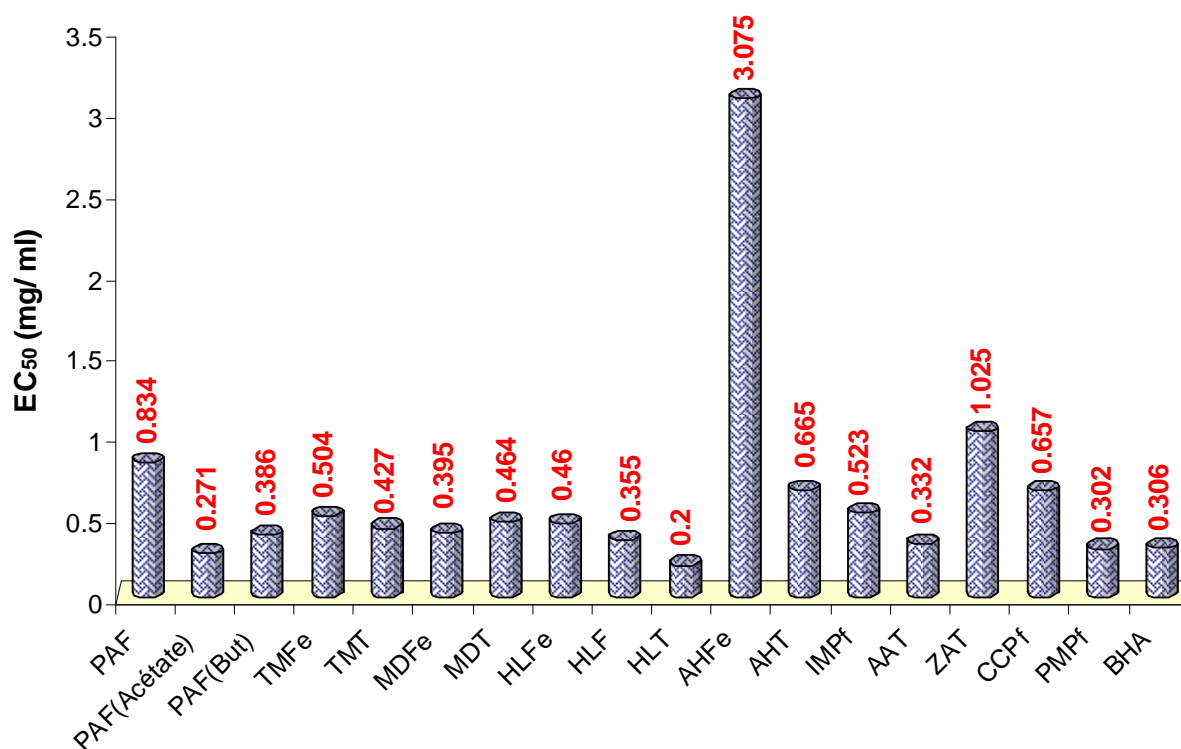


Figure 24 : Comparaison des concentrations EC_{50} des extraits des plantes étudiées. *P.atlantica* (PAF) ; *T. microphylla* (TMFe, TMT) ; *M. deserti* (MDFe, MDT) ; *H. lippii* (HLFe, HLF, HLT) ; *A. halimus* (AHFe, AHT) ; *A. articulata* (AAT) ; *Z. album* (ZAT) ; *I. montana* (IMPf) ; *C. cinerea* (CCPf) ; *P. monodiana* (PMPf).

Les valeurs EC_{50} des extraits d'*H. lippii* (tiges), la fraction acétate des fruits de *P.atlantica* et *P. monodiana* sont égale à 0.200 ± 0.081 , 0.271 ± 0.006 et 0.301 ± 0.047 mg/ml respectivement, et présentent une meilleure activité à piéger le radical $\bullet OH$ par rapport au BHA ($EC_{50} = 0.306 \pm 0.053$ mg/ml). Les EC_{50} des autres extraits sont les suivants : *A.articulata* (0.331 ± 0.064 mg/ml), fruits d'*H. lippii* (0.355 ± 0.016 mg/ml), feuilles de *M.deserti* (0.395 ± 0.115 mg/ml), fraction butanolique des fruits de *P. atlantica* (0.386 ± 0.006 mg/ml), tiges de *T. microphylla* (0.427 ± 0.063 mg/ml), feuilles d'*H. lippii* (0.460 ± 0.137 mg/ml), tiges de *M. deserti* (0.464 ± 0.068 mg/ml), feuilles de *T. microphylla* (0.504 ± 0.057 mg/ml), *I. montana* (0.523 ± 0.047 mg/ml), *C. cinerea* (0.657 ± 0.116 mg/ml) et tiges d'*A. halimus* (0.665 ± 0.428 mg/ml). Ces résultats révèlent des valeurs élevées par rapport au BHA. L'activité la plus faible se trouve dans l'extrait des feuilles d'*A. halimus* (3.075 ± 1.678 mg/ml) (**Figure 24**).

La classification de la capacité des extraits à piéger le $\bullet\text{OH}$ est suivante :

HLT > PAF (Acétate) > PM > BHA > AA > HLF > PAF (But) > MDFe > TMT > HLF_e > MDT > TMFe > IM > CC > AHT > PAF > ZA > AHFe.

A- Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, tannins) et les EC₅₀ de la capacité du piégeage du radical hydroxyle :

Nous avons remarqué qu'il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en phénols totaux et tannins et la capacité du piégeage du radical hydroxyle ($R^2 = 0.0469$ et 0.0027). Pour les flavonoïdes, cette corrélation est de l'ordre de 0.6143 pour la majorité des plantes. Une meilleure corrélation existe dans les extraits des feuilles et tiges d'*A. halimus* et *Z. album* ($R^2 = 0.8218$) (**Figure 25**).

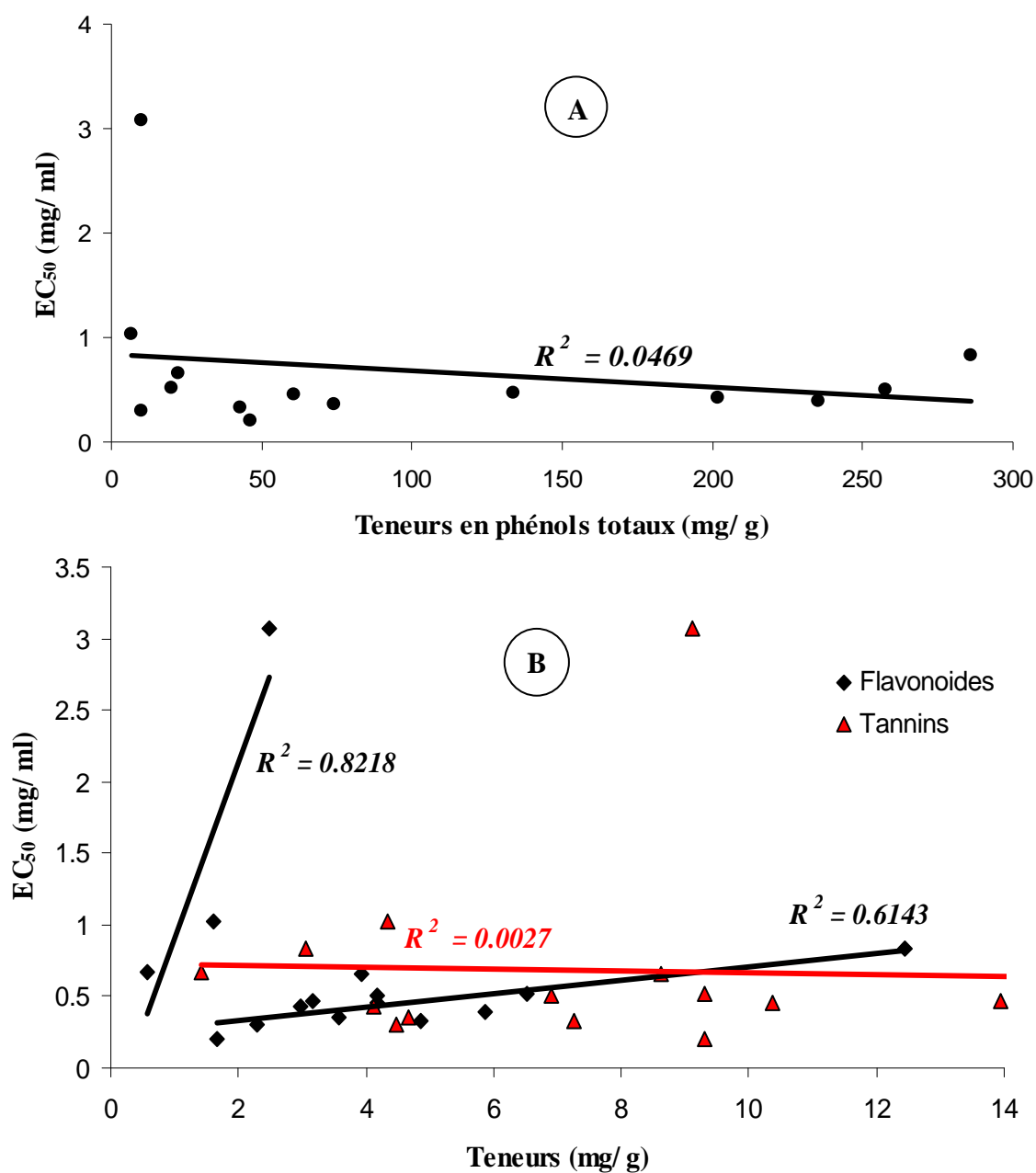


Figure 25 : Corrélation entre la capacité du piégeage du radical hydroxyle exprimée en valeur EC₅₀ et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et les tannins (B).

6. Méthode du blanchiment du β -carotène :

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le système β -carotène/ acide linoléique est proportionnel à la concentration. Tous les extraits des plantes inhibent le blanchiment du β -carotène à différentes valeurs par le piégeage des radicaux libre (**Figure 26**). A 3 mg/ ml, l'extrait des feuilles d'*H. lippii* révèle une puissante activité de l'ordre de 97.647% suivi par les extraits de *T. microphylla* (feuilles) et d'*H. lippii* (tiges) avec des pourcentages d'inhibition de 88.095 % et 86.828 % respectivement. Alors, les extraits d'*A. articulata* (65.134 %), fruits d'*H. lippii* (62.941 %), fraction d'acétate des fruits de *P. atlantica* (60.733 %) et tiges de *T. microphylla* (59.524 %) présentent une activité inhibitrice supérieur à 50 % à 4 mg/ ml. Pour les autres extraits des plantes, les pourcentages varient entre 8.614 et 40.054 % à l'exception de l'extrait des tiges d'*A. halimus* qui montre de très faible activité inférieure à 5 %.

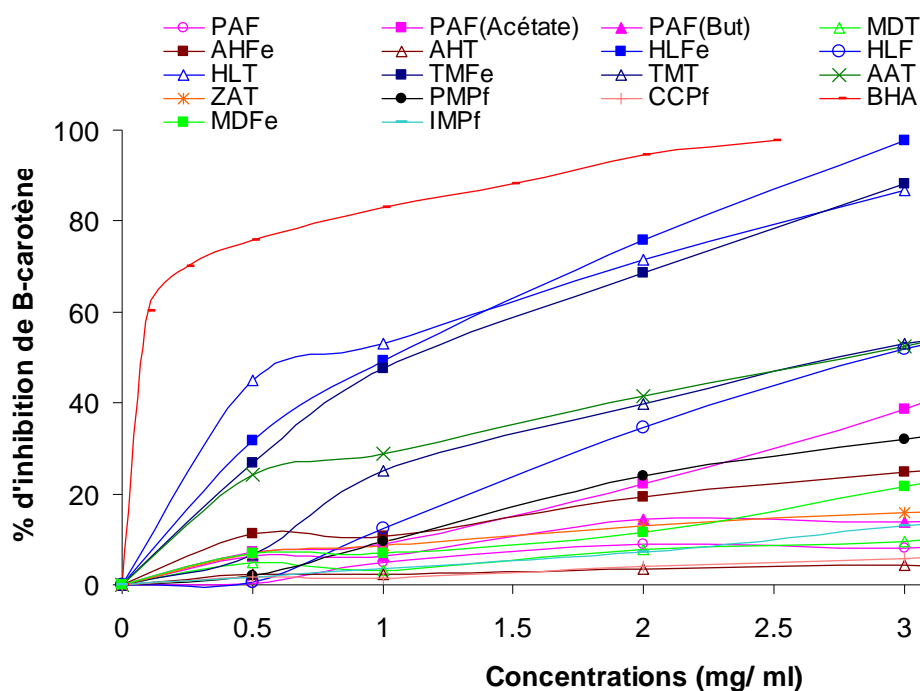


Figure 26 : Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène en fonction des concentrations des extraits des plantes étudiées.

Les valeurs EC_{50} calculées nous a permis d'évaluer et comparer l'efficacité des extraits (**Figure 27**). Plus la valeur est petite, plus l'activité antioxydante à piéger les radicaux libres formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique est élevée. L'extrait des tiges d'*H. lippii* constitue un bon piégeur des radicaux libres en comparant avec les autres extraits. Sa

concentration EC_{50} égale à 0.766 ± 0.131 mg/ ml suivi par les extraits des feuilles d'*H. lippii* (1.028 ± 0.157 mg/ ml) et *T. microphylla* (1.186 ± 0.138 mg/ ml). Concernant les extraits d'*A.articulata*, *T. microphylla* (tiges), *H. lippii* (fruits) et la fraction acétate des fruits de *P.atlantica*, les EC_{50} obtenues sont de l'ordre de 2.594 ± 0.181 , 2.953 ± 0.069 , 3.073 ± 0.25 et 3.524 ± 0.07 mg/ml respectivement. Ces activités restent toujours inférieure à BHA à raison de 0.028 mg/ ml.

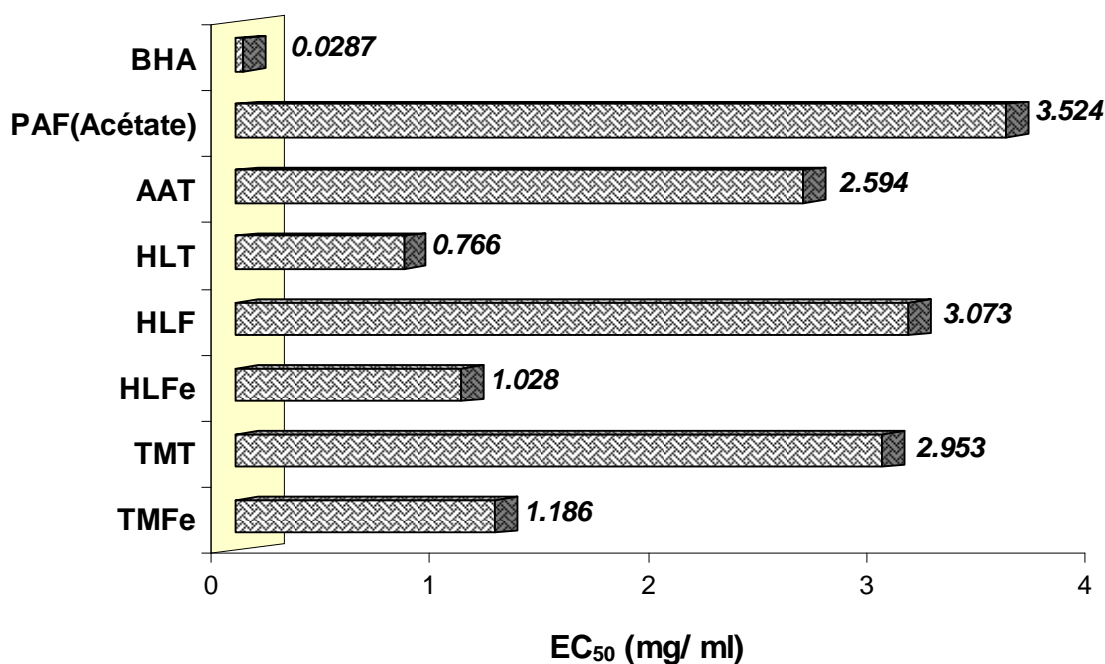


Figure 27 : Activité antioxydante exprimée en valeurs EC_{50} par le système β -carotène/ acide linoléique des extraits.
T. microphylla (TMFe, TMT) ; *H. lippii* (HLFe, HLF, HLT) ; *A. articulata* (AAT).

A- Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, tannins) et les EC_{50} du système β -carotène/ acide linoléique :

Nous constatons qu'il n'y a pas de corrélation avec les phénols totaux ($R^2 = 0.0013$), par contre les deux familles des composés phénoliques flavonoïdes et tannins interviennent de façon importante à piéger les radicaux libres. Les tannins ont un $R^2 = 0.7337$ pour tous les extraits (**Figure 28**). En ce qui concerne les flavonoïdes, les coefficients de corrélation sont de l'ordre de 0.7196 pour les extraits TMT, HLF et AA et 0.8613 pour les extraits TMFe, HLFe et HLT.

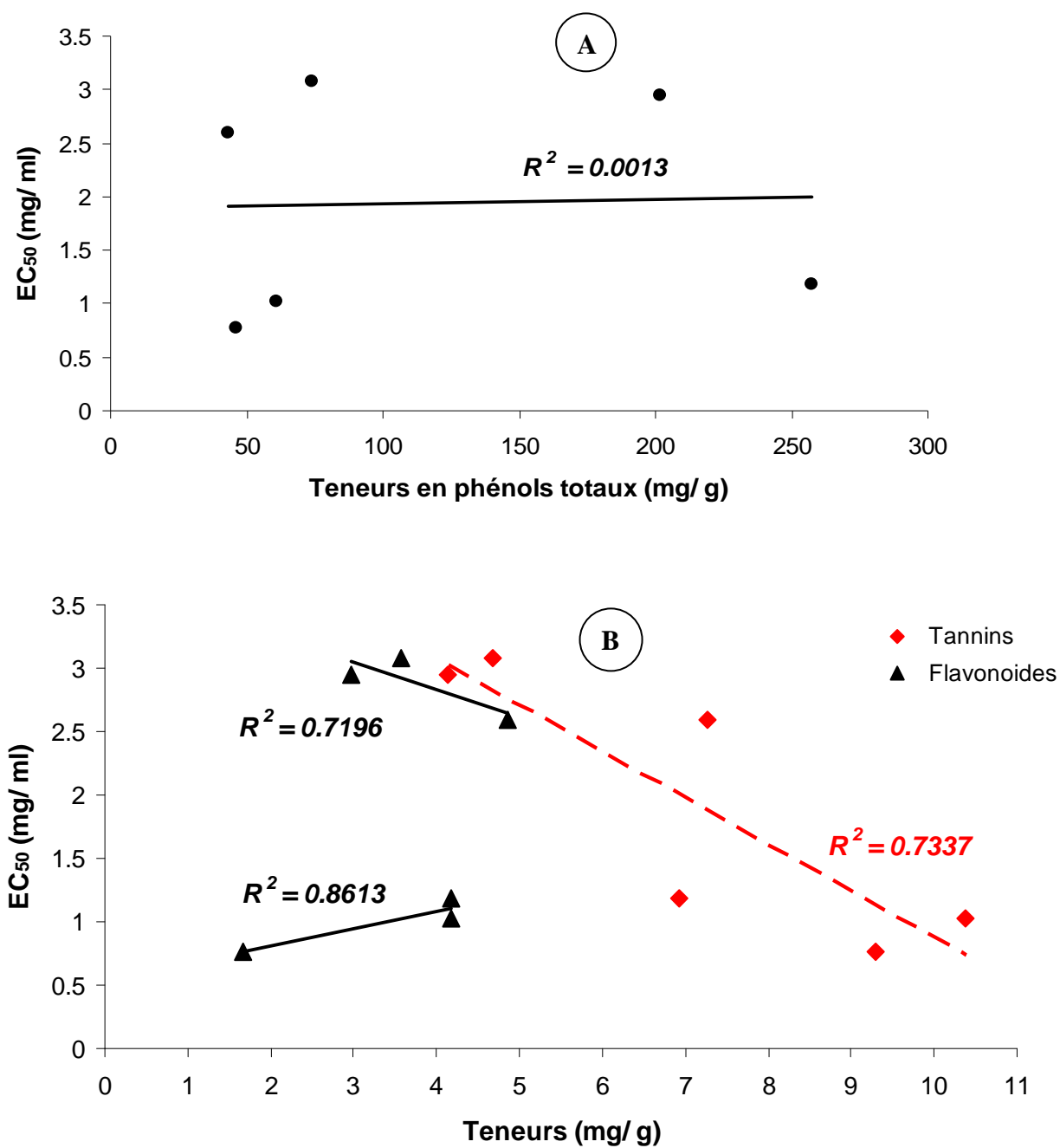


Figure 28 : Corrélation entre les valeurs EC₅₀ du test du blanchiment du β-carotène et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et tannins (B).

A- Corrélation entre la CAT et les valeurs EC₅₀, IC₅₀ et AE :

La corrélation entre la CAT et les concentrations EC₅₀ et AE du pouvoir antioxydant a pour but de montrer que les différentes techniques sont complémentaires et les composés antioxydants réagissent soit comme antioxydant ou comme oxydant dans le milieu réactionnel de chaque méthode.

Les résultats illustrés dans la figure 29 nous ont permis de déduire que la capacité antioxydante totale (CAT) des composés phénoliques des extraits des plantes intervient d'une façon ou d'une autre avec des pourcentages plus au moins comparables et supérieurs à 20 %. Ces capacités antioxydantes présentent des coefficients de corrélation de l'ordre de $R^2 = 0.2387$, 0.2683 et 0.3067 correspondant aux techniques : piégeage du radical DPPH, piégeage du radical hydroxyle et le test de réduction de fer respectivement. Par contre, la contribution des antioxydants totaux dans l'inhibition de l'autoxydation du β -carotène dépasse 50 % avec un $R^2 = 0.621$.

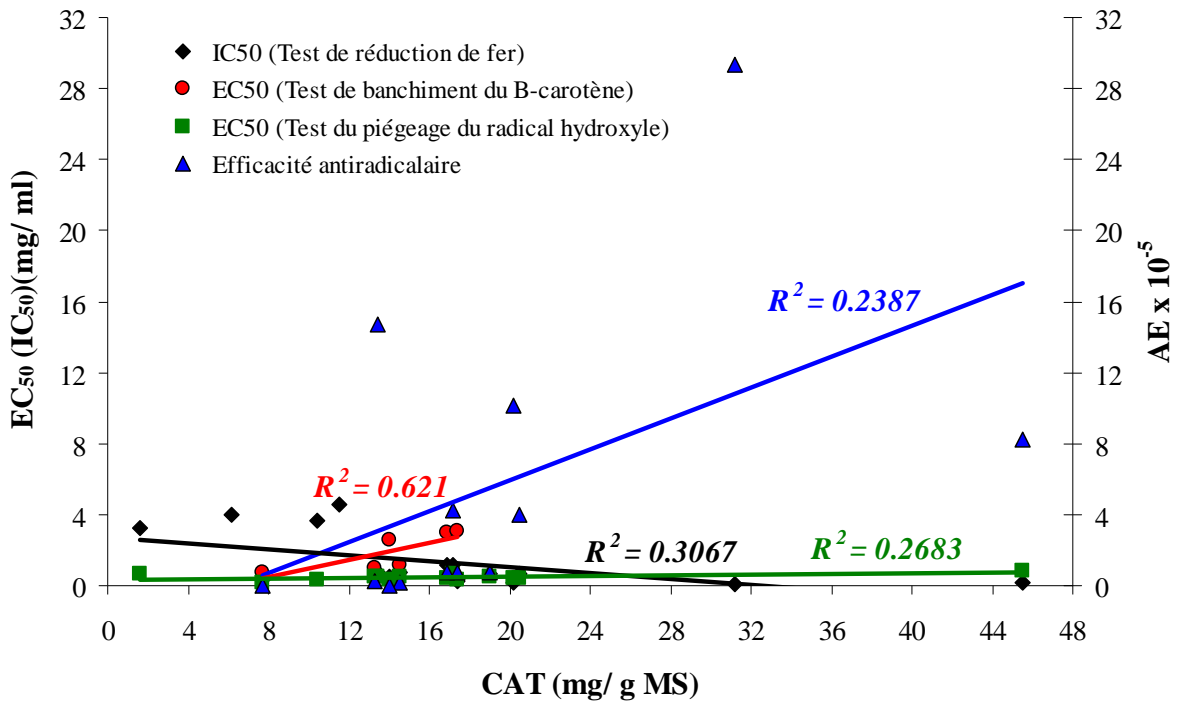


Figure 29 : Corrélation entre la CAT et les valeurs EC₅₀, IC₅₀ et AE

Partie discussion

1. Rendements et teneurs des composés phénoliques:

Les rendements sont plus élevés dans les feuilles par rapport aux autres parties de la plante ceci a été confirmé par **Falla et al (2008)**. D'autres auteurs ont montré que le méthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les antioxydants d'une plante (**Sun et al., 2007**).

Les quantités en phénols totaux des extraits des dix plantes varient entre 3.776 et 285.956 mg AGE/ g MS. Les teneurs en phénols totaux trouvées par **Djeridane et al (2010)**, chez *M. deserti* (3.67 mg EAG/ g MS) et *T. microphylla* (10.80 mg EAG/ g MS) sont nettement inférieures à nos résultats de l'ordre de 133.744 à 235.185 mg EAG/ g MS et 201.646 à 257.407 mg EAG/ g MS pour les tiges et feuilles de *M. deserti* et *T. microphylla* respectivement (**Benhammou et al., 2009a**). Ces teneurs sont supérieures aux plantes médicinales algériennes comme *T. hirsuta* (6.81 mg/ g) (**Djeridane et al., 2006**) et aussi *M. vulgare* (140 mg/ g) (**Matkowski et Piotrowska, 2006**).

La richesse de *P. atlantica* en polyphénols a été confirmée par certains auteurs sur d'autres espèces. Les feuilles de *P. lentiscus* sont plus riches en phénols totaux (136.25 ± 18.9 mg EC/ g d'extrait) et en tannins (909.4 ± 42.61 équivalent d'acide tannique/ g d'extrait) et faibles en flavonoïdes (12.93 ± 1.69 mg équivalent de quercétine/ g d'extrait) (**Atmani et al., 2009**) par rapport aux fruits de *P. atlantica* où nous enregistrons des teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins de l'ordre de 285.956 ± 10.257 , 12.441 ± 0.256 et 3.066 ± 0.151 mg/ g respectivement. D'autres travaux réalisés par **Goli et al (2005)** ont montré que la teneur la plus élevée des phénols totaux chez *P. vera* est de l'ordre de 34.7 mg équivalent d'acide tannique/g de plante. Chez les fruits de *P. terebinthus*, **Topçu et ces collègues (2007)** ont montré la variation des teneurs en polyphénols par rapport à la polarité du solvant d'extraction. Ces quantités égalent à 61.05 et 122.78 µg équivalent de pyrocatechol/ mg d'extrait dans les extraits acétonique et méthanolique respectivement. Alors, les teneurs en flavonoïdes sont de l'ordre de 5.49 et 22.60 µg équivalent de quercétine /mg d'extrait dans les deux extraits.

Pour, *H. lippii*, les teneurs en phénols totaux obtenues dans les feuilles, tiges et fruits de l'ordre de 46.090 à 74.211 mg EAG/ g MS sont supérieures à celles reportées par **Tawaha et al (2007)** sur l'espèce *H. ledifolium* dans les extraits méthanolique (17.3 ± 1.0 mg EAG/ g poids sec) et aqueux (8.7 ± 3.0 mg EAG/ g poids sec). L'espèce *H. almeriensis* contient 4.5% MS de tannins (**Barroso et al., 2001**).

La teneur en tannin de 9.118 mg EC/ g MS de la plante halophyte, *A. halimus*, représente presque la totalité des composés phénoliques (10.127 mg EAG/ g MS).

Pour les autres extraits (*A. articulata* ; *Z. album* ; *I. montana* ; *C. cinerea* et *P. monodiana*), les teneurs en phénols totaux sont comparables à celles reportés pour 45 plantes médicinales chinoises (**Li et al., 2008**) et 51 plantes jordaniennes (**Tawaha et al., 2007**).

La variabilité des teneurs en phopyphénols chez ces espèces végétales est du probablement à la composition phénoliques des extraits (**Hayouni et al., 2007**), aux facteurs génotypiques (**El-Waziry, 2007**), les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques) (**Ksouri et al., 2008**), la nature du sol et le type du microclimat (**Atmani et al., 2009**) et aussi des étages bioclimatiques où poussent ces plantes.

2. Activité antioxydante :

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés antioxydantes des plantes choisies. D'après nos connaissances et à ce jour là, il y a trois articles reportant l'activité antioxydante des plantes sahariennes. **Mansouri et al (2005)** ont évalué le profil phénolique et l'activité antioxydante de sept variétés algériennes des fruits murs des dates (*Phoenix dactylifera*). D'autres études ont été réalisée sur les capacités antioxydantes des plantes médicinales et sahariennes (**Djeridane et al., 2006 ; Djeridane et al., 2010**).

Pour la première fois, nous avons évalué les propriétés antioxydantes de certaines plantes algériennes (*Helianthemum lippii*, *Atriplex halimus*, *Anabasis articulata*, *Zygophyllum album*, *Inula montana*, *Cotula cinerea* et *Pentzia monodiana*).

Jusqu'à présent, il n'y a pas une méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement (**Prior et al., 2005**). Pour cette raison, nous avons combiné cinq techniques complémentaires.

En effet, la fraction acétate des fruits de *P. atlantica* révèle une capacité antioxydante totale élevée (CAT= 31.209 mg/ g MS) et une forte activité à piéger les radicaux DPPH• (AE = 29.344×10^{-5}) et •OH (EC₅₀ = 0.271 mg/ ml) mais une faible activité à inhiber l'oxydation du β-carotène (EC₅₀ = 3.524 mg/ ml). A la concentration 0.25 mg/ ml, les pouvoirs réducteurs

du fer de cette fraction (DO = 2.2916) et de l'acide ascorbique (DO = 2.3675) sont comparables et très puissants mais inférieurs par rapport aux extraits éthanoliques des feuilles de *P. lentiscus* (DO = 1.086) et *P. atlantica* (DO = 1.089) (**Benhammou et al., 2008**). Les mêmes auteurs ont reporté aussi que la fraction acétate constitue un bon extracteur du radical DPPH d'où la valeur EC₅₀ égale à 14.641 mg d'antioxydants/ g DPPH trouvée dans les fruits par rapport aux feuilles de *P. atlantica* (27.76 mg/ g) et *P. lentiscus* (90.87 mg/ g) (**Benhammou et al (2008)**).

L'activité antioxydante élevée de *P. atlantica* est due à l'effet inductif des trois groupes hydroxyles de l'acide gallique et aussi à la présence de l'acide ρ -coumarique (**Sanchez-Moreno et al., 1998 ; Benhammou et al., 2008**). On outre, la famille des Anacardiacees et le genre *Pistacia* sont caractérisée par l'existence des dérivés de myricétine et l'acide gallique (5-O-galloyl ; 3,5-O-digalloyl ; 3,4,5-tri-O-galloyl) (**Romani et al., 2002 ; Baratto et al., 2003**). D'autres travaux ont montré que l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide férulique, l'acide ρ -coumarique et la catéchine possèdent de forte corrélation positive entre les activités du piégeage des radicaux (DPPH, ABTS⁺) et la puissance de réduction. En plus, l'acide gallique et la catéchine sont étroitement corrélés à l'activité de chélation des métaux et l'inhibition de la peroxydation lipidique (**Tsai et al., 2007**).

Vu sa teneur faible en CAT (7.718mg/ g MS), l'extrait des feuilles d'*A. halimus* possède la faible capacité de réduction de fer (IC₅₀ = 4.558 mg/ ml), très faible capacité à balayer les radicaux DPPH (31. 837 mg/ ml après 30 min) et le \bullet OH (EC₅₀ = 3.075 mg/ ml). En comparant avec les travaux de **Benhammou et al (2009b)**, la fraction acétate d'éthyle de cette plante détient une bonne capacité à piéger le radical DPPH (2.04 mg/ ml) et à réduire le fer (1.51 mg/ ml). Cette activité est du probablement à l'abondance des flavonols (kaempferol, quercétine...) qui représentent la classe majeur des espèces d'*Atriplex* (**Bylka et al., 2001**).

Chez *Helianthemum glomeratum*, le kaempferol et la quercétine sont les principaux composés isolés dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne. Ces deux constituants sont dotés d'avoir une forte activité antioxydante (**Cai et al., 2004**). Ces propriétés de nos extraits méthanoliques d'*H. lippii* sont dues probablement à ces deux flavonols.

Pour les extraits des autres plantes, leurs comportements à céder le proton ou l'électron pour exprimer les propriétés antioxydantes sont différents. Ce résultat a été corroboré par

Miliauskas et al (2004) qui ont montré qu'un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre d'une part. D'autre part, les activités antioxydantes sont plus variables dans les espèces de la plante (inter-espèce) que dans la même espèce (intra-espèce) (**Ksouri et al., 2008**).

Après toutes les combinaisons effectuées, nous enregistrons l'absence de corrélation entre les cinq techniques du pouvoir antioxydant et les teneurs en polyphénols, cette confirmation est largement répandue dans la littérature (**Sun et al., 2005**). Il est très accepté que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en polyphénols exhibe une activité antioxydante puissante (**Moure et al., 2001**). Le fractionnement des composés phénoliques révèle la présence d'une bonne corrélation entre les teneurs en flavonoïdes ($R^2 = 0.5917 - 0.9221$) en tannins ($R^2 = 0.7337 - 0.9393$) et les autres propriétés antioxydantes.

La seule explication de l'absence de cette corrélation est due à la synergie des composés phénoliques dans les extraits méthanoliques (**Rice-Evans et al., 1997**) et que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration mais aussi de la structure de ces molécules. C'est pourquoi les deux extraits comme *I. montana* et *C. cinerea* avec des teneurs plus au moins comparables en polyphénols de l'ordre de 20.246 et 22.222 mg EAG/ g MS peuvent présenter des changements remarquables dans leur activité antioxydante (cas de la CAT, réduction de fer, test de DPPH). De même, *M. deserti* (tige) et *H. lippii* (feuilles) possèdent différentes teneurs en phénols totaux de 133.744 et 60.956 mg/ g respectivement mais ont exhibé la même capacité antioxydante totale (CAT).

Les corrélations positives entre la CAT et les valeurs EC_{50} des 4 techniques sont dues à la présence des flavonoïdes. Ces derniers possèdent des propriétés antioxydantes puissantes. Le nombre et/ ou la position des groupes hydroxyle sur les noyaux de ces molécules, les substitutions sur les cycles B et A avec la présence de la double liaison C_2-C_3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C renforcent l'activité antioxydante des flavonoïdes (**Cai et al., 2006**).

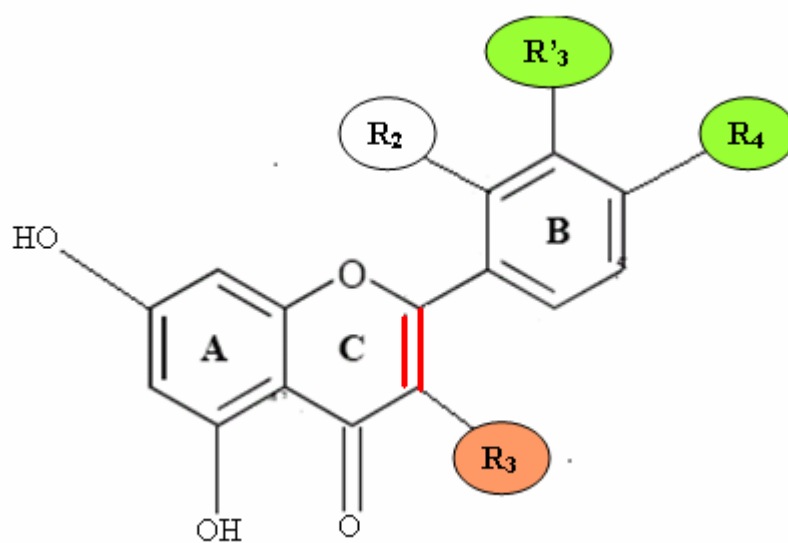


Figure 30 : Principaux éléments de l'activité antioxydante des flavonoïdes.

Conclusion générale

Conclusion générale

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimique contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants.

Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vue les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse à savoir le BHA et le BHT.

L'objectif primordial assigné par cette étude englobe le même contexte afin d'évaluer les propriétés antioxydantes des plantes médicinales et sahariennes qui poussent dans des conditions biotiques et abiotiques stressantes. Rappelant que, l'aridité du milieu saharien par rapport aux autres endroits biologiques a développé des modifications non seulement au niveau de la morphologie mais aussi au niveau du métabolisme de la plante.

Le choix de ces plantes de différentes familles est basé sur quelques données ethnopharmacologiques (infections microbiennes, troubles intestinaux, ulcère, cancer du sein et antidiabétique).

Dans la première partie, la quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu, en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et les tannins par le test de la vanilline. Les résultats obtenus nous ont révélé trois séries de plantes dont la première qui regroupe *Pistacia atlantica*, *Thymelea microphylla* et *Marrubium deserti* constitue une source prometteuse en polyphénols (133.744 à 285.956 mg EAG/ g MS). Ces espèces présentent des teneurs en tannins de 3.066 ± 0.151 à 25.021 mg EC/ g MS et en flavonoïdes de 2.979 ± 0.133 à 12.441 mg EC/ g MS. La deuxième série englobe *Anabasis articulata* et les différentes parties d'*Helianthemum lippii* (feuilles, tiges et fruits) avec 43.141 jusqu'à 74.211 mg EAG/ g MS. Alors, *Atriplex halimus*, *Zygophyllum album*, *Inula montana*, *Cotula cinerea* et *Pentzia monodiana* représentent la troisième série avec un intervalle large en polyphénols qui varie entre 3.776 à 22.222 mg EAG/ g MS).

Dans la deuxième partie, nous sommes intéressés par l'étude des propriétés antioxydantes des extraits bruts de ces plantes par cinq techniques complémentaires.

En effet, la capacité antioxydante totale (CAT) est plus importante dans l'extrait brut des fruits *P. atlantica* (45.516 mg EAA/ g MS) et ses fractions acétate d'éthyle et butanolique de l'ordre de 31.209 et 20.215 mg EAA/ g MS. Elle varie entre 1.637 et 20.465 mg EAA/ g MS pour les autres plantes. Cette propriété est en corrélation avec la teneur en phénols totaux ($R^2 = 0.4502$) plus particulièrement les flavonoïdes ($R^2 = 0.9221$).

A propos des autres propriétés antioxydantes, les résultats obtenus nous amène à avancer les conclusions suivantes :

- Tous les extraits ont révélé des réponses inhibitrices à différents niveaux à piéger les radicaux DPPH• et l'hydroxyle, à réduire le fer et à protéger l'oxydation du β -carotène.
- La fraction acétate d'éthyle des fruits de *P.atlantica* a présenté une forte activité en comparaison avec tous les extraits bruts et parfois mieux que les contrôles de synthèse dans certaines techniques. Cette fraction a montré une meilleure capacité réductrice ($IC_{50} = 0.055 \pm 0.002$ mg/ ml) par rapport à l'acide ascorbique (0.063 ± 0.002 mg/ ml), un fort piégeur des radicaux DPPH• ($EC_{50} = 14.641$ mg Antioxydant/ g DPPH) et •OH ($EC_{50} = 0.271$ mg/ ml) par rapport aux BHT (13.468 mg/g) et BHA (0.306 mg/ ml) respectivement, mais un faible pouvoir inhibiteur du blanchiment du β -carotène avec une EC_{50} de 3.524 mg/ ml.
- Les pouvoirs antioxydants de l'extrait brut de *P. atlantica* et sa fraction butanolique sont presque comparables et moins importants avec des concentrations IC_{50} (EC_{50}) de l'ordre de 0.137 ± 0.001 et 0.140 ± 0.010 mg/ ml pour la réduction du fer, 47.400 et 49.213 mg/ g comme des extracteurs du radical DPPH et 0.834 et 0.386 mg/ ml comme des inhibiteurs de l'oxydation du désoxyribose respectivement. Par contre, dans le système émulsifiant acide linoléique/ β -carotène, leur propriété antioxydante est très faible dont les pourcentages d'inhibition sont de l'ordre de 12.041 et 16.129 % à 4 mg/ ml pour l'extrait brut de *P. atlantica* et la fraction butanolique respectivement.
- Les extraits d'*H. lippii* (tiges, feuilles et fruits), *I. montana* et *A. articulata* possèdent des activités antioxydantes intéressantes vis-à-vis à toutes les techniques testées par rapport aux extraits d'*A. halimus*, *Z. album*, *C. cinerea*, *P. monodiana*, *M. deserti* et *T.microphylla* qui ont montré des pouvoirs faibles.

- La corrélation obtenue entre la capacité antioxydante totale et les concentrations IC₅₀, EC₅₀ et l'efficacité antiradicalaire est positive avec la contribution de plus de 20 % des antioxydants de la plante qui peuvent être des tannins ou des flavonoïdes.

De tous les résultats obtenus, nous avons déduit que la fraction acétate des fruits de *P. atlantica* présente une bonne activité antioxydante qui pourrait être utilisée dans le domaine pharmaceutique.

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer les activités antioxydantes des plantes choisies particulièrement sahariennes et de sélectionner les familles des composés phénoliques d'intérêts biologiques afin de mieux connaître, de valoriser et d'utiliser ces ressources dans le domaine thérapeutique. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

Elargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques : antitumorale, anticancéreuse et anti-inflammatoire

Caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques.

Références bibliographiques

A

- Abd El-Rahman, H.H., Mohamed, M.I., Gehad, A.E.A., Awadallah, I.M. (2006). Ameliorating the Anti-nutritional factors effect in *Atriplex halimus* on sheep and goats by ensiling or polyethylene glycol supplementation. *Int. J. Agr Biol*, 8 (6): 766–769.
- Adams, M., Plitzko, I., Kaiser, M., Brun, R., Hamburger, M. (2009). HPLC-profiling for antiplasmodial compounds—3-Methoxycarpachromene from *Pistacia atlantica*. *Phytochem. Lett*, 2 : 159–162.
- Ahmed, A.A., EL-Sayed, N.H., EL-Negoumy, S.I., Mabry, T. (1987). Flavonoids of *Cotula cinerea*. *J. Nat. Prod*, 50: 519.
- Aît Youssef, M. (2006). Plantes médicinales de Kabylie. Ibis Press, Paris.
- Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int*, 41: 1–15.
- Alibert, G., Ranjeva, R., Boudet, M.A. (1977). Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol. Veg*, 15 : 279-301.
- Al-Jaber, N.A.A., Mujahid, T.G., Al-Hazmi, H.M.G. (1991). Flavonoides from *Atriplex farinosa*. *J. King Saud. Univ*, 3: 163-167.
- Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T. (1996). Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res*, 28 : 65-180
- Aurousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim*, 15 (1): 67-82.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 75: 199–212.
- Atli, H. S., Arpacı, S., Ayanoglu, H. (2001). Comparaison of seedling characteristics of some *Pistacia* species. In AK B.E (ed). 11 GREMPA Seminar on pistachios and almonds. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, p. 215-218.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*, 112: 303–309.

B

- Bahorun, T. (1997). Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.
- Baratto, M.C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., Basosi, R. and Pogni, R. (2003). Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *Pistacia lentiscus* leaves. *Free. Radical. Res*, 37(4): 405-412.
- Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R. (2006). Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *J. Ethnopharmacology*, 108: 395–397.
- Barrero, A.F., Herrador, M.M., Arteaga, J.F., Akssira, M., Mellouki, F., Belgarrabe, A., Blázquez, M.A. (2005). Chemical composition of the essential oils of *Pistacia atlantica* Desf. *J. Essent. Oil Res*, 17: 52–54.
- Barroso, F.G., MartmHnez, T.F., Paz, T., Parra, A., Alarcón, F.J. (2001). Tannin content of grazing plants of southern Spanish arid lands. *J. Arid. Environ*, 49: 301-314.
- Batanouny, K.H. (1999). Wild medicinal plants in Egypt. Academy of Scientific Research and Technology, Egypt and International Union for Conservation (IUCN), Switzerland.
- Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M., R et al (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant Soil*, 203: 27-36.

- Belhadj S. (2001). Les pistacheraies algériennes : Etat actuel et dégradation. *11ème Colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier*. Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, p 107-109.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A. (1997). Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 4505–4515.
- Benhammou, N.**, Atik Bekkara, F., Coustard, J.M. (2009a). Antioxidant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti de Noë* and *Thymelaea microphylla* from Algerian Sahara. *Advance in Food Science*, 31 (4): 194-201.
- Benhammou, N.**, Atik Bekkara, F., Kadifkova Panovska, T. (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L and *Pistacia atlantica* Desf. *Adv. Food Sci*, 29 (3): 155-161.
- Benhammou, N.**, Atik Bekkara, F., Kadifkova Panovska, T. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr. J. Pharm Pharmacol*, 2 (2): 022-028.
- Benhammou, N.**, Atik Bekkara, F., Kadifkova Panovska, T. (2009b). Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*, 12: 1259–1266
- Benhassaini, H., Bendahmane, M., Benchalgo, N. (2007). The chemical composition of fruits of *Pistacia atlantica* Desf. Subsp. *atlantica* from Algeria. *Chem. Nat. Comp*, 43: 121–124.
- Benhassaini, H., Bendeddouche, F.Z., Mehdadi, Z., Romane, A. (2008). GC/MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* from Algeria. *Nat. Prod. Commun*, 3: 929–932.
- Benzie, I. F. F. et Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Bohlmann, F., Zdero, C. (1978). New sesquiterpenes and acetylenes from *Athanasia* and *Pentzia* species. *Phytochemistry*, 17: 1595-1599.
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol*, 13: 135.
- Bossokpi, I.P.L. (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). *Thèse de pharmacie, Bamako*, p 133.
- Bougatef, A., Hajji, M., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food. Chem*, 114: 1198-1205.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol*, 28 : 25–30.
- Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2^{ème} édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3^{ème} édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- Brzozowska, J., Hanower, P., Tanguy, J. (1973). Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, 12: 2353-2357.
- Buzzini, P., Turchetti, B., Ieri, F., Goretti, M., Branda, E., Mulinacci, N., Romani, A. (2007). Catechins and Proanthocyanidins: Naturally Occurring O-Heterocycles with Antimicrobial Activity. *Top Heterocycl Chem*, 10: 239–263.
- Bylka, W. (2004). A new acylated flavonol diglycoside from *Atriplex littoralis*. *Acta. Physiol Plant*, 26(4): 393-398.
- Bylka, W., Stobiecki, M., Frahski, R. (2001). Sulphated flavonoid glycosides from leaves of *Atriplex hortensis*. *Acta Physiol. Plant*, 23 (3): 285-290.

C

- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74: 2157–2184.
- Cai, Y.-Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci*, 78: 2872-2888.
- Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R. (1999). Antiamoebic and anti-giardial activity of plant flavonoids. *Planta Med*, 65: 78-80.
- Cao, G.H., Alessio, H.M., Cutler, R.G. (1993). Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 14: 303-311.
- Castro, L., Freeman, B.A. (2001). Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, 170: 161-165.
- Charfi D., (1995). Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'ElHajeb (Sfax). Thèse en écologie végétale, Fac. Sci. de Sfax.
- Chen, H., Hajia, A., Yang, Z.D., Li, Y.C. (2005). Isolation and structure identification of chemical constituents from *Anabasis brevifolia*. *Yao Xue Xue Bao*, 40 (3) : 248-51.
- Cheriti, A., Sekkoum, K. (1995). Phytochemical investigation of *Thymelaea microphylla* growing in Algeria. *Acta Chim Slovenica*, 42: 373-374.
- Chung, K., Wong, T.Y., Wei, C., Huang, Y., Lin, Y. (1998). Tannins and human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 38: 421-464.
- Cook, N.C., Samman, S. (1996). Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J.Nutr Biochem*, 7(2): 66-76.
- Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12 (4): 564- 582.
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

D

- Delazar, A., Reid, R.G., Sarker, S.D. (2004). GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *Mutica*. *Chem. Nat. Compd*, 40 (1): 24-27.
- Djeridane, A., Yousfi, Y., Brunel, J.M., Stocker, P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem Toxicol*, 48: 2599–2606.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97: 654-660.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A., Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides* Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 142: 61-78
- Du, H., Wang, Y., Hao, X., Li, C., Peng, Y., Wang, J., Liu, H., Zhou, L. (2009). Antimicrobial phenolic compounds from *Anabasis aphylla* L, *Nat Prod Commun*, 4 (3): 385-8.
- Dubois, G.E., Grosbay, G.A., Saffron, P. (1977). Non nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. *Science*, 195: 397-399.
- Dupont, F., Guignard, J.L. (2007). Abrèges botanique systématique moléculaire. 14^{ème} édition révisée, Masson.

Duru, M.E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmandar, M., Izumi, S., Hirata, T. (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, 74: 170-176.

E

- Edenharder, R., Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res*, 540: 1–18.
- El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, D.J. Mortensen, V., Phillip, D.M., Truscott, T.G. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties, *Arch. Biochem. Biophys*, 430 (1): 37–48.
- El Bardai, S., Morel, N., Wibo, M., Fabra, N., Llabres, G., Lyoussi, B., Quetin-Leclercq, J. (2003). The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Medica*, 69: 75–77.
- El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., Lyoussi, B. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *J. Ethnopharmacol*, 86: 149–158
- El-Waziry, A.M. (2007). Nutritive value assessment of ensiling or mixing *Acacia* and *Atriplex* using in vitro gas production technique. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3(6): 605-614.
- Eman, A. A. (2011). Phytochemical screening on different plant parts of some succulent plants of Egypt. *New York Science Journal*, 4 (2) :15-18.
- Evans, F.J., Taylor, S.E. (1983). Pro-inflammatory, tumor-promoting and anti-tumor diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. *Progr Chem Org Nat Prod*, 44:1-99.

F

- 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. Biol*, 331 (5) : 372-379.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

G

- Gauche, E., Hausswirth, C. (2006). Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité*, 58 : 43-66.
- Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini Ana, E.C.S., Fonseca Maria, J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Method. *AAPS Pharm Sci*, 5 (2) : 1-5.
- Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A., 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistacia vera*) hull extracts. *Food Chem*, 92 : 521–525.
- Gonzalez-Romero, M.A., Villaescusa-Castillo, L., Diaz-Lanza, A.M. (2000). Sesquiterpene lactones from *Inula montana* L. *Z Naturforsch C*, 55(9-10): 697-700.
- Gonzalez-Romero, M.A., Villaescusa-Castillo, L., Diaz-Lanza, A.M., Bartolome-Esteban, C., Fernandez-Matellano, L. (2001). Phytochemistry and pharmacological studies of *Inula montana* L. *Recent Research Developments in Phytochemistry*, 5: 255-268.
- Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P., Gaydou, E.M. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Ind. Crop Prod*, 31: 203-208.

Greger, H., Hofer, O. (1985). sesquiterpene-coumarin ethers and polyacetylenes from *Brocchia cinerea*. *Phytochemistry*, 24:85.

H

- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidant and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, 344 (8924): 721-724.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Arnoma, O.L. (1987). The deoxyribose method: A simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. *Anal Biochem*, 165: 215-219.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186: 1-85.
- Hamdan, I., Afifi, F.U. (2004). Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *J. Ethnopharmacol*, 93: 117–121.
- Hammiche, V., Maiza, K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol*, 105 : 358–367.
- Hanifi, N. (1991). Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. *Publication de Actes éditions*, p47-49.
- Harbone, J.B. (1993). Introduction to Ecological Biochemistry, 4th Ed; Academic Press: London.
- Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205 215.
- Hassanean, H.A., Desoky, E.K. (1992). An acylated isorhamnetine glucoside from *Zygophyllum Simplex*. *Phytochemistry*, 31: 3293-3294.
- Hatam, N.A.R., Porzel, A., Seifer, K. (1995). Polyodonine a prefuranic labdane diterpene from *Marrubium polydon*. *Phytochemistry*, 40: 1575–1576.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96: 67– 202
- Hayouni, E., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007). The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quecus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chem*. 105: 1126-1134.
- Heimeur, N., Idrissi Hassani, L.M., Amine Serghini, M. (2004). Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *Reviews in Biology and Biotechnology*, 3 (1): 37-42.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Skaltsounis, A.L., Bailleul, F. (2007). Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochem. Syst. Ecol*, 35: 624-626.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact*, 139: 1–21.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.I. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem*, 53: 1841-1856.

I

- Ibn Tatou, M., Fennane, M. (1991). Aperçu historique et état actuel des connaissances sur la flore vasculaire du Maroc. In conservation des ressources végétales. *Publication de Actes éditions*, p35-45.
- Iserin, P. (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd édition, Dorling Kindersley Limited, Londres

J

- Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M., Yusuf, S. (1995). The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann. Intern Med*, 123: 860.
- Julkunen-Titto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem*, 33: 213-217.

K

- Kambouche, N., Merah, B., Derdour, A., Bellahouel, S., Benziane, M. M., Younos, C., Firkioui, M., Bedouhene, S., Soulimani, R. (2009). Étude de l'effet antidiabétique des saponines extraites d'*Anabasis articulata* (Forssk) Moq, plante utilisée traditionnellement en Algérie. *Phytothérapie*, 7(4): 197-201.
- Karioti, A., Heilmann, J., Skaltsa, H. (2005). Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Phytochemistry*, 66: 1060–1066.
- Kawashty, S.A., Mosharrafa, S.A.M., El-Gibali, M., Saleh, N.A.M. (2000). The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochem. Syst Ecol*, 28: 915-917
- Kolesnikov, M.P., Gins, V.K. (2001). Phenolic substances in medicinal plants. *Appl. Biochem. Micro*, 37 (4): 392-399.
- Kordali, S.; Cakir, A.; Zengin, H.; Duru, M.E. (2003). Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74: 164-167.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch*, 45: 244-249.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol*, 331: 865- 873.

L

- Landis, G.N., Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev*. 126: 365–379.
- Larhsini, M., Markouk, M., Jaouhari, J.T., Bekkouche, K., Lazrek, H.B., Jana, M. (2002). The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytother Res*, 1: S97-8.
- Lee, K.W., Hur, H.J., Lee, C.Y. (2005). Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem*, 53 : 1990-1995.
- Le Houérou H.N. (1992). The role of saltbushes (*Atriplex* spp) in arid lands rehabilitation in the méditerranéen Basin: a review. *Agr Syst*, 18: 107-148
- Leong, LP., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76: 69-75.
- Li, C., Oldham, C.D., May, S.W.N. (1994). N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem. J*, 300: 31-36.
- Li, C.Y., Jackson, R.M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol*, 282: C227–C241.
- Li, H. B., Wong, C. C., Cheng, K. W., Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT*, 41 : 385–390.
- Loche, J. (1966). Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac (Seita, ed). Ann de la direction des études et de l'équipement, France, 3 : 15.

M

- Mandeel, Q.A., Al-Laith, A.A.A. (2007). Ethnomycological aspects of the desert truffle among native Bahraini and non-Bahraini peoples of the Kingdom of Bahrain. *J. Ethnopharmacol*, 110 : 118–129.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem*, 89 (3): 411–420.
- Markouk, M., Redwane, A., Lazrek, H.B., Jana, M., Benjama, A. (1999). Antibacterial activity of *Cotula cinerea* Extracts. *Fitoterapia*, 70: 314-316.
- Markouk, M., Bekkouche, K., Larhsini, M., Bousaid, M., Lazrek, H.B., Jana, M. (2000). Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. *J. Ethnopharmacol*, 73: 293–297.
- Matkowski, A., Piotrowska, P. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77: 346-353.
- Mecherara-Idjeri, S., Hassani, A., Castola, V., Casanova, J., 2008. Composition of leaf, fruit and gall essential oils of Algerian *Pistacia atlantica* Desf. *J. Essent. Oil Res*, 20: 215–219.
- Meckes, M., Calzada, F., Tapia-Contreras, A., Cedillo-Rivera, R. (1999). Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother Res*, 13: 102-105.
- Metwally, M.A., EL-Dahmy, S., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Dawidar, A.M., Metwally, S.A. (1986). Glaucolide-like sesquiterpene lactones from *Cotula cinerea*. *Phytochemistry*, 25:255.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-839
- Milane, H. (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat en Sciences Domaine : Pharmacochimie*, Université Louis Pasteur Strasbourg I.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*, 85: 231–237.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84: 407–412.
- Mirsky et Nitsa. (2001). Naturally extracted and synthetic hypoglycemic or hypolipidemic compositions. *Application N°*. US 09/842971. [http:// www. freepatentsonline.com](http://www.freepatentsonline.com).
- Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., Surbled, M. (1998). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris (les Colloques, N° 87).
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Arch. Biochem. Biophys*, 385 (1) : 13–19.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M. J., Parajo, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 72: 145–171.
- Mukohata, Y., Nakabayashi, S., & Higashida, M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215– 218.

N

- Nabli, M.A. (1991). Diversité floristique en Tunisie. In conservation des ressources végétales. *Publication de Actes Editions*. p 51-52.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat Prod*, 66 (7): 1022– 1037.

- Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr*, 74 : 418–425.
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1961). Synergistes naturels des auxinex et des giberellines. *Bull. Soc. Fr*, 26: 2237-2240.

O

- O’Kennedy, R., and Thornes, R.D. (ed) (1997). Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y.
- Ouf, S.A., Abdel Hady, F.K., El Gamal, M.H., Shaker, K.H. (1994). Isolation of antifungal compounds from some *Zygophyllum* spices and their bioassay against two soil-borne plant pathogens. *Folia Microbiologica*, 39: 215-221.
- Ould El Hadj M. D., Hadj-Mahammed., M., Zabeirou, H. (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d’Ouargla (Sahara septentrional Est). *Courrier du Savoir – N°03*, 47-51
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr*, 44: 307-315.
- Ozenda, P. (2004). Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition, CNRS Editions, Paris

P

- Pöllmanns, K., Gagel, S., Elgamal, M.H.A., Shaker, K.H., Seifert, K. (1997). Triterpenoid saponins from the roots of *Zygophyllum* Species. *Phyrochemisry*, 44 (3): 485-489.
- Popov, I., Lewin, G., Baehr, R. (1987). Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta*, 46: 775–779
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex : specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269: 337–341.
- Prior, R.I., WU, X.L., Schaich, K. (2005). Standardizez methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric Food Chem*, 53 (10): 4290-4302.
- Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Rad. Biol. Med*, 28: 141–164.

Q

- Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. CNRS, Paris.

R

- Rahman, I. (2002). Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1(3) : 291-315.
- Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 72: 1439-1452.
- Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J. (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. *Food Chem. Toxicol*, 45: 328-336.
- Reynaud, J., Lussignol, M. (1999). Free flavonoid aglycones from *Inula montana*. *Pharm Biol*, 37 (2) : 163-164.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*, 22(4): 375-83.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med*, 20: 933–956.
- Rice-Evans, C.A., Sampson, J., Brameley, P.M., Holloway, D.E. (1997). Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vitro? *Free Radical Res*, 26: 381-398.
- Rigano, D., Formisano, C., Basile, A., Lavitola, A., Senatore, F., Rosselli, S., Bruno, M. (2007). Antibacterial Activity of Flavonoids and Phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. Libanoticum.. *Phytother Res*, 21(4): 395-7.
- Rodriguez, R., Towers, G. H. N., Mitchell, J. C. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15: 1573-1580.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M. (2002). Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem Anal*, 13: 79-86.

S

- Saad, S.F., Saber, A.H., Scott, P.M. (1967). Pharmacological studies on zygophyllin and quinovic acid. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 6: 253–263.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8(3): 121-137.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci. Technol. Int*, 4: 391-399.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci Food Agric*, 76: 270–276.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity of selectes red, rosé and white wines. *J. Sci Food Agric*, 79: 1301-1304.
- Sarikurkcü, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Harmandar, M. (2008). Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. *Biores. Technol.*, 99: 4239-4246.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- Scherer, R., Godoy, H.T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem*, 112: 654–658.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. *Food Chem*, 101: 10-19.
- Singleton, V. L., Rossi, J. R. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic*, 16 : 144–158.
- Small, E., Catling, P.M. (2000). Les cultures médicinales canadiennes. Presses scientifiques du CNRC, Ottawa (Ontario), Canada. 281.
- Smati, D., Longeon, A., Guyot, M. (2004). 3β-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol, a cytotoxic constituent of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian Sahara. *J. Ethnopharmacol*, 95: 405–407.
- Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F., et al. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's [letter]. *Nature*, 382: 120.
- Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M. (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem*, 11: 1135– 1146.
- Sun, T., Powers, J.R., Tang, J. (2007). Evaluation of the antioxidant activity of asparagus broccoli and their juices. *Food Chem*, 105: 101-106.

Sun, T., Ho, C-H. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*, 90: 743–749.

Svoboda, K.P., Hampson, J.B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.

T

Tamer Fouad, M.D. (2003). Free radicals, Types, sources and damaging reactions, Internal Medicine Articles. (<http://www.doctorslounge.com/primary/articles/>)

Tavakoli, J et Pazhouhanmehr, S. (2010). Fatty acid composition of oils from fruits of three *Pistacia* species growing in Iran. *Chem Nat Compd*, 46 (4): 623-624.

Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem*, 104: 1372–1378

Tilyabaev, Z., Abduvakhabov, A.A. (1998). Alkaloids of *Anabasis aphylla* and their cholinergic activities. *Chem Nat compd*, 34 (3) : 295-297.

Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarikurcu, C., Ozturk, M., Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem*, 103 : 816–822.

Touati, D. (1985). Contribution à la connaissance du profil biochimique des dicotylédones buissonnantes et arbustes de la Méditerranée. Thèse 3^e cycle Univ. Claude Bernard Lyon 1, 156 f.

Tsai, M.C., Song, T.Y., Shih, P.H., Yen, G.C. (2007). Antioxidant properties of water soluble polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Food Chem*, 104: 1115-1122.

Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.

U

Unten, L., Koketsu, M., Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agr Food. Chem*, 45: 2009-2019.

V

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem*, 266: 37–56.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*, 160: 1–40

Van Acker, S., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., van der Vijgh, W.J.F. (1996). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol*, 56 : 935– 943.

Van Antwerpen, P. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène /chlorure. *Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques*, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.

Viot, S. (2004). Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l' $\alpha\beta$ -crystalline. *Thèse de doctorat*, Université Claude Bernard-Lyon 1.

W

- Walker, J.E.M., Saraste, M.J., Runswick and N.J.Gay. (1982). Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*, 1 (8) : 945-51
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U. et Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 187: 33-37.
- Wei, T., Sun, H., Zhao, X., Hou, J., Hou, A., Zhao, Q., et al. (2002). Scavenging of reactive oxygen species and prevention of oxidative neuronal cell damage by a novel gallotannin, pistafolia A. *Life Sciences*, 70 : 1889–1899.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H., Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biol. Med*, 24: 480–493

Y

- Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59 : 113-122.
- Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J., Palevitch, D. (1987). Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *J. ethnopharmacol*, 19 (2) : 145-151.
- Yang, Y., Li, W.L., Gong, T., Wang, H.Q., Chen, R.Y. (2010). Studies on the chemical constituents of *Anabasis aphylla* L. *Yao Xue Xue Bao*, 45(12): 1523-1526.
- Yoshida, H., Ishikawa, T., Hosoi, H., Suzukawa, M., Ayaori, M., Hisada, T., et al. (1999). Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochem Pharmacol*, 58 : 1695–703.
- Yousfi, M., Djeridane, A., Bombarda, I., Hamia, C., Duhem, B., Gaydou, E.M. (2009). New hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytother. Res*, 23: 1237–1242.
- Yousfi, M., Nedjemi, B., Belal, R., Ben-Bertal, D., Palla, G. (2002). Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 79: 1049–1050.
- Yousfi, M., Nadjemi, B., Belal, R., Ben-Bertal, D. (2003). Étude des acides gras de l'huile de fruit de pistachier de l'Atlas algérien. *OCL. Oleag. Corp. Gras, Lip*, 10: 425–427.
- Yousfi, M., Nadjemi, B., Belal, R., Bombarda, I., Gaydou, E.M. (2005). Triacylglycerol composition of oil from *Pistacia atlantica* fruit growing in Algeria. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 82: 93–96.

Z

- Zdero, C., Bohlmann, F. (1990). Glaucolides, fulvenoguaianolides and other sesquiterpene lactones from *Pentzia species*. *Phytochemistry*, 29 (1): 189-194.
- Zhang, Y., Vareed, S.K., Nair, M.G. (2005). Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci*, 76: 1465-1472.
- Zhao, X., Sun, H., Hou, A., Zhao, Q., Wei, T., & Xin, W. (2005). Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia*. *Biochim. Biophys Acta*, 1725: 103–110.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64 (4) : 555–559.

Communications & Publications

PUBLICATIONS :

- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2009). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. de deux stations de la région de Tlemcen (Algérie). Actes du congrès international, Mezraoua (Taounate) & Fès, Maroc, 281-285.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara, T. Kadifkova Panovska. (2009). Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie* 12: 1259–1266.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara, J.M. Coustard. (2009). Antioxidant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti de Noë* and *Thymelaea microphyla* from Algerian Sahara. *Advance in Food Science*, 31(4): 194-201.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara, T. Kadifkova Panovska. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2 (2): 022-028.
- F. Atik Bekkara, **N. Benhammou**, T. Kadifkova Panovska. (2008). Biological activity of essential oil and the extract of the phenolic compounds of *Inula viscosa* of the area of Tlemcen (Algeria). *Advance in Food Science (AFS)*, 30(3): 132-139.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara, T. Kadifkova Panovska. (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L and *Pistacia atlantica* Desf. *Advances in Food Sciences*, 29(3): 155-161.
- F. Atik Bekkara, B. Boti Jean, J. Casanova, S.A. Taleb Bendiab, **N. Benhammou**. (2006). Les huiles essentielles et composés phénoliques de *Rosmarinus officinalis* L de la région de Tlemcen. Acte de Biochimie, Substances Naturelles et Environnement, 460-463.
- V. Sutiak, **N. Benhammou**, I. Sutiakova, R. Sutiak. Possibilities for the use of *V. album* in veterinary practice & certain its characteristics. Proceeding Book of abstracts, "Risk of Food Chain VII", Slovak Agricultural University in Nitra, Octobre 11-TH, 2007. ISBN 978-80- 8069-947-5.
- V. Sutiak, I. Sutiakova, **N. Benhammou**, J. Skalka, L. Sabova. Use of phytotherapeutics may improve the biosphere & climate. Proceeding Book of abstracts, "Risk of Food Chain VII", Slovak Agricultural University in Nitra, Octobre 11-TH, 2007. ISBN 978-80- 8069-947-5.

COMMUNICATIONS INTERNATIONNALES :

- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2009). Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activity of *Pistacia atlantica* Desf fruits extracts. Journée Internationale des Produits Naturels, Tlemcen (Algérie), 20 Mai.
- F. Atik Bekkara, **N. Benhammou**, SA.Taleb Bendiab, J. Casanova. (2008). Composition chimique et pouvoir antioxydant des huiles essentielles de *Rosmarinus albiflorus* et *Rosmarinus laxiflorus* de la région de Tlemcen. Deuxième Congrès International de Nutrition, Tunisie, 17-18 Octobre.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2008). Propriétés antioxydantes des composés phénoliques des feuilles de *Pistacia lentiscus*. 3ème Symposium International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales (SIPAM3), 1er Congrès International sur les Molécules Bioactives (CIMB1). Oujda (Maroc), 29 - 30 Mai.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara, T. Kadifkova Panovska. (2007). Evaluation of the antifungal and antioxidant activities of essential oils of *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica*. Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1, 2) 311, PP – 153. Fourth Congress on Pharmacy of Macedonia with International Participation Ohrid, R. Macedonia, September 26-30.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2007). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* des deux stations de la région de Tlemcen. Congrès International sur les Plantes Médicinales et Aromatiques (CIPMA), Fès (Maroc), 22-23-24 Mars.
- V. Sutiak, **N. Benhammou**, I. Sutiakova, R. Sutiak. (2007). Možnosti využívania imela bieleho (*V. album*) vo veterinárskej praxi a niektoré jeho crty. XI Fyto- Apiterapeutické DNI s medzinárodnou účasťou v Kosiciach konané v dňoch 29-30 Septembra.
- V. Sutiak, I. Sutiakova, **N. Benhammou**, J. Skalka, L. Sabova. (2007). Využitie fytotherapeutik v medicíne môže tiež prispieť k ochrane klímy proti jej poruchám. XI Fyto- Apiterapeutické DNI s medzinárodnou účasťou v Kosiciach konané v dňoch 29-30 Septembra.
- V. Sutiak, **N. Benhammou**, I. Sutiakova, R. Sutiak. (2007). Possibilities for the use of *V. album* in veterinary practice & certain its characteristics. XI Fyto- Apiterapeutické DNI s medzinárodnou účasťou v Kosiciach konané v dňoch 29-30 septembra.
- V. Sutiak, I. Sutiakova, **N. Benhammou**, J. Skalka, L. Sabova. (2007). Use of phytotherapeutics in medicine may also help to protect climate against its damage. XI Fyto- Apiterapeutické DNI s medzinárodnou účasťou v Kosiciach konané v dňoch 29-30 Septembra.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara, J. Casanova. (2006). Etude des activités antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle de *Pistacia atlantica*. Forum International Ecologie et Environnement, Tlemcen (Algérie), 18-19 Avril.

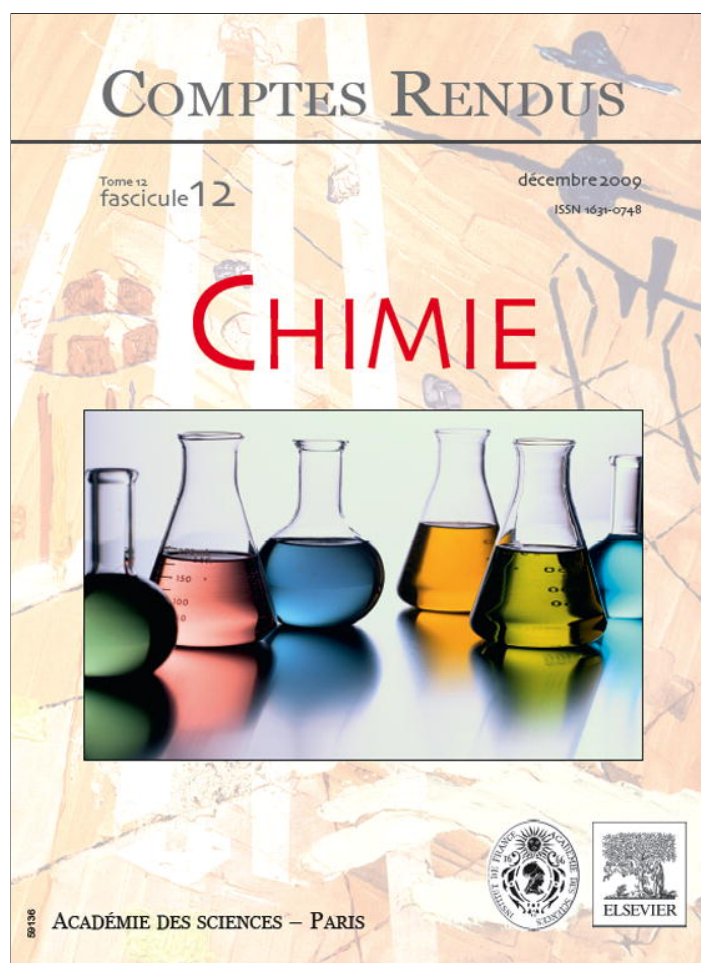
- F. Atik Bekkara, B. Boti Jean, J. Casanova, S.A. Taleb Bendiab, **N. Benhammou**. (2006). Les huiles essentielles et composés phénoliques de *Rosmarinus officinalis* L de la région de Tlemcen. Deuxième Congrès International de Biochimie, Agadir (Maroc), 09-12 Mai.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara, N. Soulimane-Mokhtari. (2006). Pouvoir réducteur des composés phénoliques de trois plantes médicinales. Symposium Algéro-Français de Pharmacologie sur le stress, Jijel (Algérie), 10-12 Septembre.
- D. Khaldi, M. Belarbi, **N. Benhammou**, M. Saker, S.A. Taleb Benadiab. (2006). Contribution au dosage quantitatif des composés phénoliques de l'huile d'*Argania spinosa* de la région de Tindouf (Sud ouest Algérie). Symposium Algéro-Français de Pharmacologie sur le stress, Jijel (Algérie), 10-12 Septembre.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2006). Antioxidant power of the phenolic compounds of *Pistacia atlantica*. Deuxième Symposium International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales (SIPAM II), Marrakech (Maroc), 14-16 Septembre 2006.
- N. Benhammou**, B. Moussa Boudjemaa, F. Malek. (2004). Modélisation de croissance de *Bacillus cereus* en fonction de la température, du pH et de l'activité de l'eau. Colloque ADEL-F-EPIBIO, Epidémiologie et prise de décision en santé publique, Oran (Algérie), 29-30 mai 2004.

COMMUNICATIONS NATIONALES :

- N. Benhammou**, F. Atik, J. Casanova. (2008). Analyse de l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia atlantica* par CPG et RMN ¹³C. Journées Scientifiques Séparations & Spectrochimie Moléculaires (J3SM'08), Tlemcen (Algérie), 17-18 Décembre.
- N. Benhammou**, F. Atik, J. Casanova. (2008). Analyse et évaluation les activités antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*. XIVèmes Journées Nationales de Microbiologie, Tlemcen (Algérie), 11-12 Novembre 2008.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara, J. Casanova. (2008). Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* par CPG et RMN 13C. Deuxième journée sur la protection de l'environnement, Tlemcen (Algérie), 06-07 Mai.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2008). Pouvoirs antibactérien et antioxydant de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*. Séminaire national de Biologie et Santé, Tlemcen (Algérie), 15-16 Avril.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2007). Piégeage de radical 2,2- diphenyl-1- picrylhydrazil (DPPH) par les composés phénoliques d'*Inula viscosa*. Forum scientifique national de Santé, Nutrition et Environnement (SNV), Tlemcen (Algérie), 17-18 Avril 2007.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2007). *Pistacia atlantica* : Etat actuel et valorisation. Séminaire national sur l'Agronomie Saharienne et Développement Durable, Tlemcen (Algérie), 14-15 Mai.

- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara, L. Belyagoubi. (2007). Evaluation des activités antifongique et antioxydante des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica*. XII^e Journées Médicales de Sétif, (Algérie), 28-29 Octobre.
- L. Belyagoubi, **N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2007). Piégeage du radical DPPH par l'huile essentielle et les composés phénoliques d'*Inula viscosa*. Journées Scientifiques de Nutrition et Technologie Alimentaire, Constantine (Algérie), 12-13 Novembre.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*. 6^{ème} journées scientifiques et techniques phytosanitaires, El-Harrach (Algérie), 20-21 juin.
- N. Benhammou**, F. Atik Bekkara. (2006). Piégeage des anions superoxydes par les composés phénoliques. 1^{ère} Journée d'étude sur les biotechnologies au service de l'industrie agroalimentaire, Constantine (Algérie), 11-12 Novembre.
- N. Benhammou**, B. Moussa Boudjemaa, F. Malek. (2004). Modélisation de la cinétique de croissance de *Bacillus cereus* en fonction de la température, du pH et de l'activité de l'eau. Troisième Forum sur la recherche en santé, Tlemcen (Algérie), 20 juin.
- N. Benhammou**, B. Moussa Boudjemaa. (2004). Etude biométrique de l'effet combiné de la Température, du pH et de l'activité de l'eau sur la croissance de *Bacillus cereus* : Modèle de Gompertz. Colloque national de chimie, Batna (Algérie), 07-09 Décembre.
- N. Benhammou**, B. Moussa Boudjemaa. (2004). Microbiologie prédictive de la cinétique de croissance de *Bacillus cereus* : Modèle de Ratkowsky. Journées biologie et santé de Casablanca, Maroc, 15-16 Décembre.
- T. Mahdjoub, **N. Benhammou**. (2003). Effets de la température, du pH et du chlorure de sodium sur le taux de croissance d'une population bactérienne. Modèle mathématique. Premières journées sur la protection de l'environnement, Tlemcen (Algérie), 28-29 Mai.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Full paper/Mémoire

Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*

Nabila Benhammou^{a,*}, Fawzia Atik Bekkara^a, Tatjana Kadifkova Panovska^b

^aLaboratory of Natural Products, Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, University Abou Bekr Belkaid, LP 119, Imama, Tlemcen, Algeria

^bDepartment of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University St. Cyril and Methodius, 1000 Skopje, Macedonia

Received 18 December 2008; accepted after revision 19 February 2009

Available online 24 October 2009

Abstract

For the first time, we have evaluated the antioxidant properties of principal secondary metabolites of leaves and stems from *Atriplex halimus*. The leaves methanolic extract contained higher levels of total phenolic (10.12 ± 0.56 mg GAE/g DW) than stems methanolic extract (3.77 ± 0.19 mg GAE/g DW). The leaves flavonoids represented by ethyl acetate and butanolic fractions have more hydrogen donating ability to reducing iron and the higher DPPH radical scavenging activity. **To cite this article:** N. Benhammou et al., *C. R. Chimie 12 (2009)*.

© 2009 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Pour la première fois, nous avons évalué les propriétés antioxydantes de principaux métabolites secondaires des feuilles et des tiges d'*Atriplex halimus*. L'extrait méthanolique des feuilles contient une teneur élevée en phénols totaux ($10,12 \pm 0,56$ mg GAE/g DW) que l'extrait méthanolique des tiges ($3,77 \pm 0,19$ mg GAE/g DW). Les flavonoïdes des feuilles représentés par les fractions acétate éthylique et butanolique possèdent une forte capacité de donner l'hydrogène pour réduire le fer et une activité plus élevée à piéger le radical DPPH. **Pour citer cet article :** N. Benhammou et al., *C. R. Chimie 12 (2009)*.

© 2009 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords: *Atriplex halimus*; Tannins; Flavonoids; Alkaloids; Saponins; Methanolic extracts; Antioxidant activity

Mots clés : *Atriplex halimus* ; Tannins ; Flavonoïdes ; Alcaloïdes ; Saponines ; Extraits méthanoliques ; Activité antioxydante

1. Introduction

Plants (fruits, legumes, grains, medicines and aromatic herbs) produce a wide variety of secondary

metabolites (SM) which may play numerous biological activities, such as protection against herbivores, microbes, or competing plants, adaptation and pollination [1]. These metabolites can be divided into two main groups:

- (a) those without nitrogen-like terpenoids (mono-, sesqui-, di-, tri-, and tertraterpenes; saponines; steroids; carotenoids; and cardiac glycosides), polyketides (anthraquinones), phenolic compounds

* Corresponding author.

E-mail addresses : nabila.benhammou79@yahoo.fr (N. Benhammou), f_atik@yahoo.fr (F.A. Bekkara), taka@ff.ukim.edu.mk (T. Kadifkova Panovska).

(flavonoids, anthocyanins, galloyl and catechol tannins, phenolic acids, lignans, lignins, stilbenes, and coumarins), polyacetylenes and phenylpropanes;

(b) those with nitrogen in their structures including alkaloids, amines, nonprotein aminoacids, cyanogenic glycosides, glucosinolates, protease inhibitors and lectins [2].

The polyphenol compounds play a wide range of biological effects including antibacterial, anti-inflammatory, anti-allergic, hepatoprotective, antithrombotic, antiviral, anticarcinogenic and cardioprotective and vasodilatory effects [3]. These functions have been attributed to their antioxidant activity by several mechanisms such as free radical scavengers, reducing agents, complexers of pro-oxidant metals, quenchers of the formation of singlet oxygen and stimulating the antioxidative defence enzymes activities [4]. These mechanisms will be led by two types of reactions: hydrogen atom transfer and single electron transfer [5].

In the human body and during the normal conditions, the unlimited number of the physiological and biochemical processes leads to the production of two radical groups. The first group is the reactive oxygen species (ROS): superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$); hydrogen peroxide (H_2O_2); hydroxyl radical (HO^{\bullet}); peroxy radical (ROO^{\bullet}) and hypochlorous acid ($HOCl$) [6]. The second one included the reactive nitrogen species (RNS): nitric oxide ($^{\bullet}NO$) and peroxynitrite ($ONOO^-$) which are formed by the reaction of $^{\bullet}NO$ and superoxide during inflammatory processes [6]. The overproduction and the imbalance between the radical species (ROS, RNS) and the capacity of the normal detoxification systems which are represented by enzymatic and nonenzymatic antioxidants lead to the generation of oxidative stress. This pathology exhibits an important tissue damage caused by the interaction of radical species with macromolecules (lipids, proteins, and DNA). Therefore, the consumption of dietary intake rich by α -tocopherol, ascorbic acid, carotenoids, polyphenol compounds and glutathione, all sources of natural antioxidant compounds, becomes necessary. It has been reported that there is an inverse relationship between dietary intake of antioxidant rich food and the incidence of a number of human diseases [7]. In addition, these substances come to replace synthetic antioxidants like butylated hydroxyl toluene (BHT) and butylated hydroxyl anisole (BHA) which are suspected to possess some undesirable effects for human health.

Atriplex halimus is a shrub succulent halophyte widely distributed in semi-arid Mediterranean areas [8],

in the high plateaus and on the littoral where favourable conditions are regrouped with an intra- and inter-individual polymorphism for several floral morphological characters including styles, ovule types and radicle orientation according to salinity [9]. This plant represents a potential source for economical utilisation; it can provide forage sources with a good nutritive value during the dry seasons [10] and periods of shortage of grazing resources. Also, it can contribute to the valorisation of marginal and degraded soils and the improvement of the vegetable and animal productions in several stripped areas [11]. Moreover, the high biomass production has a good digestibility, but an abundance of sodium chloride and anti-nutritional factors reduce its palatability [8]. In traditional medicine, a cocktail of minerals in *A. halimus* is used to benefit glycaemic control in diabetic patients [12]. Like other halophytes, it can combat internal parasites in veterinary use [13].

The study of the chemical composition shows the presence of secondary metabolites in *A. halimus* such as tannins, flavonoids, saponins, alkaloids and resins [13], and it contains up to 10% sodium chloride [14]. It is characterized by its high ash and crude fiber, moderate crude protein and low crude fat contents [15].

In our study, we investigate for the first time the polyphenol content and antioxidant capacity with DPPH radical scavenging and reducing power assay in leaves and stems from *A. halimus* of methanolic extract of polyphenols, tannins, alkaloids, saponins and ethyl acetate and butanolic fractions of flavonoids.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The aerial part (leaves, stems) of *A. halimus* was harvested in March 2008 from Bechar, Algeria. The plants collected were identified by the Vegetable Ecological Laboratory and the voucher specimens have been deposited at the Herbarium of the Department of Molecular and Cellular Biology, Tlemcen University, Algeria. Plant samples were dried in the shade and conserved for future use.

2.2. Extractions of chemical compounds from the leaves and the stems

2.2.1. Methanolic extracts

The leaves and stems of *A. halimus* (1 g) were powdered and extracted for 24 h with 20 ml of methanol 96.6° at room temperature, followed by rapid paper

filtration through Whatman N° 0.45 µm filter paper. The resulting solutions were evaporated under vacuum at 60 °C by Buchi Rotavapor R-200 to dryness. The residues were then dissolved in 3 ml of methanol.

2.2.2. Ethyl acetate and butanolic fractions

The leaves and stems dry residues obtained by the same procedure for methanolic extracts extraction were treated with 10 ml of boiling water to dissolve the flavonoids. Further filtration through filter paper N° 0.45 µm, afforded the aqueous solution that was firstly extracted with 10 ml of ethyl acetate, then with 10 ml of butanol-1. The two extracts were evaporated and weighed, then dissolved in 3 ml of methanol.

2.2.3. Total alkaloids

They were obtained by triple liquid–liquid extraction according to the method of Harbone [16], the leaves and of the stems of *A. halimus* were extracted with the Soxhlet by 150 ml from absolute ethanol during 5 h. The ethanolic extracts were then evaporated under vacuum at 40 °C by Buchi Rotavapor R-200. The dry residues were taken again by 20 ml of chloroform and acidify by HCl at 5% to pH 3; they were let rest during 30 min at the ambient temperature. The acid aqueous phases were extracted by 20 ml of chloroform, basified by NaHCO₃ at 5% to pH 9 and let rest during 15 min at the ambient temperature. The chloroformic phases were evaporated and the dry residues, made up of total alkaloids, were weighed then dissolved in 3 ml methanol.

2.2.4. Saponins

They were extracted according to the method worked out by Bouchelta et al. [17]. The leaves and stems powdered were delipided during 2 h by 150 ml of n-hexane. After elimination of the organic phases, the precipitates obtained were macerated in 50 ml of absolute ethanol under magnetic agitation at the ambient temperature during 24 h. The ethanolic phases were evaporated at 40 °C by the rotavapor. The dry residues were extracted three times by 50 ml from distilled water/petroleum ether mixture (V/V) heated at 50 °C in water bath during 30 min. The aqueous phases were mixed then treated by 10 ml of butanol during 30 min. The organic phases, evaporated at 40 °C, were weighed and dissolved in 3 ml methanol.

2.2.5. Tannins

The extraction of tannins from *A. halimus* was obtained according to the method of Zhang et al. [18]. Five grams of each part (leaves, stems) was milled into

powder. The powder was extracted with 100 ml acetone–water (70/30, V/V), and the mixture was stirred continuously for 72 h at room temperature. Then, the mixture was filtrated and evaporated under vacuum at 40 °C to remove acetone. The remaining solution was washed with 30 ml dichlormethane to remove lipid-soluble substances. After that, the solution was further extracted with ethyl acetate at a ratio of 30/30 (V/V). The water layer was separated and extracted twice more similarly. Then the resulting water layer was evaporated to dryness, and the resulting substance was weighed and dissolved in methanol.

2.2.6. Determination of total phenolic content

The total phenolic in leaves and stems methanolic extracts content was determined by spectrometry using “Folin-Ciocalteu” reagent assay [19]. A volume of 200 µl of the extract was mixed with 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent diluted 10 times with water and 0.8 ml of a 7.5% sodium carbonate solution in a test tube. After stirring and 30 min later, the absorbance was measured at 765 nm by using a Jenway 6405 UV-vis spectrophotometer. Gallic acid was used as a standard for the calibration curve. The total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW).

2.3. Antioxidant activity

2.3.1. Reducing power assay

The reducing power of the extract was determined according to the method of Oyaizu [20]. Various concentrations of the extracts (mg/ml) in distilled water were mixed with phosphate buffer (2.5 ml, 0.2 M, pH 6.6) and 1% of potassium ferricyanide water solution (2.5 ml, K₃[Fe(CN)₆]). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Aliquots of trichloroacetic acid (2.5 ml, 10% aqueous solution) were added to the mixture which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant (2.5 ml) was mixed with distilled water (2.5 ml) and a freshly prepared FeCl₃ solution (0.5 ml, 0.1%). The absorbance was measured at 700 nm. Ascorbic acid was used as a positive control. In this method, the higher the absorbance, the higher the reducing power.

2.3.2. DPPH scavenging assay

The hydrogen atom donation ability of chemical compounds in leaves and stems was measured on the basis to scavenge the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil free radical [21]. Fifty microliter of various concentrations of the extracts in methanol were added to 1950 µl of a

0.025 g/l methanol solution DPPH. After a 30-min incubation period at room temperature, the absorbance was read against a blank at 515 nm. DPPH free radical scavenging activity in percentage (%) was calculated using the following formula:

DPPH scavenging activity (%)

$$= (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}}) \times 100$$

where A_{blank} is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), A_{sample} is the absorbance of the test compound.

Extract concentration providing 50% inhibition (EC_{50}) was calculated from the graph plotted of inhibition percentage against extract concentrations. The ascorbic acid methanol solution was used as positive control.

2.3.3. Statistical analysis

All evaluations of antioxidant activity were performed in twice. Data were expressed as mean \pm standard derivation (S.D.). Correlation coefficient of antioxidant activity was determined using Excel programme and Origin 6.

3. Results and discussion

3.1. Extract yields and phenolic contents

The specific extractions of *A. halimus* leaves and stems have makes to determine the yield of chemical groups which more used in therapy. The obtained results are shown in Table 1. The two parts of the plant were characterized by the presence of the flavonoids, the tannins, the alkaloids and the saponins where the leaves exhibited the higher yields. These molecules were known to show medicinal activity as well as exhibiting physiological activity.

Table 1

Yields of some bioactive compounds from *Atriplex halimus* leaves and stems.

Bioactive compounds	Yields (%)	
	Leaves	Stems
Methanolic extract	24 \pm 1.41	7.5 \pm 0.70
Ethyl acetate fraction	2.66 \pm 0.57	1 \pm 0.00
Butanolic fraction	1 \pm 0.00	1 \pm 0.00
Tannins	0.5 \pm 0.14	0.3 \pm 0.14
Alkaloids	0.25 \pm 0.07	0.2 \pm 0.00
Saponins	0.33 \pm 0.14	0.25 \pm 0.00

The data are displayed with mean \pm standard deviation of twice replications.

Table 2

Total phenolics in leaves and stems methanolic extracts of *Atriplex halimus*.

Plant part	Methanolic extract	
	Leaves	Stems
Total phenolics (mg GAE/g DW)	10.12 \pm 2.24	3.77 \pm 0.06

The data are displayed with mean \pm standard deviation of twice replications.

The methanolic extract of the leaves exhibited the higher content (24 \pm 1.41%), as compared to the stems extract (7.5 \pm 0.70%). Concerning, the distribution of secondary metabolites, we record a high yields of ethyl acetate (2.66 \pm 0.57%) and butanolic fractions (1%). Thus, the leaves presented the higher yields of flavonoids followed by tannins (0.5 \pm 0.14%) and saponins (0.33 \pm 0.14%). With regard to the alkaloids, the yields varied between 0.2 \pm 0.00% in the stems to 0.25 \pm 0.07% in the leaves. This distribution was characterized by weaker yields for the stems. These findings agree with previous reports indicating that secondary metabolites distribution may fluctuate between different plant organs [22,23].

Table 2 summarizes the contents of total phenolics of the methanolic extracts of the two parts of *A. halimus*. These contents varied from 3.77 \pm 0.06 mg GAE/g DW in stems to 10.12 \pm 2.24 mg GAE/g DW in leaves. This result proves the data quoted in Table 1, where we recorded high yields of the secondary metabolites without nitrogen in the leaves such as flavonoids characterized by the two fractions, saponins and the tannins.

The diversity of secondary metabolites in *A. halimus* has been reported in the literature [13]. In fact, our results are partially in agreement with those of El-Adawy et al. [24] who showed that the total extractable phenolic compounds, saponins and the alkaloids of the leaves of *A. halimus* were 11.3, 12.38 and 0.23% respectively. El-Waziry [25] reported the presence a lower contents of totals phenols and tannins in *Atriplex* fresh and silage. These variations in the distribution of the secondary metabolites can be partially due to genotypic factors that control accumulation of these compounds in the plant [25]. Moreover, other studies suggested that the biotic conditions (species, organ and physiological stage) and abiotic stresses (salinity, luminosity, water deficit and edaphic factors) widely present in the arid zone may enhance the phenolic metabolism as a response to oxidative stress [26]. This proposition was confirmed by the studies of Ksouri et al. [27], who found the augmentation in polyphenol

content in *Cakile maritime* leaves challenged with 0, 100 and 400 mM NaCl.

The predominance of the polyphenols family in particular the flavonoids found in our results is in agreement with the studies of Al-Jaber et al. [28]. It is noted in *A. hortensis*, the flavonoid content in shoot part was equal to 68.5 mg/100 g fresh weight [29]. The naringin and naringenin 7-*O*-glucoside are very common in species of Chenopodiaceae [28]. Moreover, the flavonol class forms the major chemical compounds of *Atriplex* species [30]. However, triterpene saponins occur in some species [31]. Also, Chenopodiaceae family is characterised by the presence of glycinebetaine as an alternative osmolyte to protect from salt and water stress.

3.2. Antioxidant activity

The diversity of nature and the complexity of phytochemical compounds of plant extracts impose the development of many methods to evaluate the antioxidant activity and to estimate the effectiveness of these substances. The majority of these methods are based on the colouring or the discolouration of a reagent in the reactional medium. They can be classified into two groups: those assays used in food and biological system to evaluate lipid peroxidation while measuring the degree of oxidation inhibition [32] and those assays used to measure free radical scavenging ability [6]. Some can be based on metal reducing power (ferric reducing antioxidant power, FRAP), peroxy radical scavenging (oxygen radical absorbance capacity, ORAC; total radical trapping antioxidant parameter, TRAP), hydroxyl radical scavenging (deoxyribose

assay), organic radical scavenging like ABTS and DPPH (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC), quantification of products formed during the lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substance, TBARS; LDL oxidation) [6]. Reducing power and DPPH have been used in the present investigation.

3.2.1. Reducing power

Fig. 1. depicts the reducing power of chemical compounds from leaves and stems. All compounds showed the presence the reductive effects, which increased with an increase in concentration. However, when compared to leaves and stems, flavonoids in ethyl acetate fraction was more potent on reducing power in the two part of plant, followed by leaves butanolic fraction and stems methanolic extract. Alkaloids appear to be less reductive effect compared to saponins and tannins. At 0.4 mg/ml, the absorbance values of ethyl acetate fraction, butanolic fraction, saponins, methanolic extract, tannins and alkaloids in leaf chemicals, they were 0.13 ± 0.00 ; 0.11 ± 0.00 ; 0.06 ± 0.00 ; 0.06 ± 0.00 ; 0.05 ± 0.00 ; 0.03 ± 0.00 respectively in leaf chemicals, they were 0.11 ± 0.00 ; 0.03 ± 0.00 ; 0.03 ± 0.00 ; 0.07 ± 0.00 ; 0.03 ± 0.00 ; 0.02 ± 0.00 in stem chemicals.

The use of EC_{50} parameter is an index to compare and to express the reducing power ability of the bioactive substances (Table 3). The weak value of EC_{50} , the higher reducing power was observed in ethyl acetate and butanolic fractions (1.51 ± 0.01 and 1.76 ± 0.00 mg/ml respectively). The EC_{50} concentrations were ranged between 3.31 ± 0.22 mg/ml in tannins to 6.71 ± 0.44 mg/ml in alkaloids from leaves, and 1.60 ± 0.05 mg/ml in ethyl acetate fraction to 9.06 ± 0.45 mg/ml in

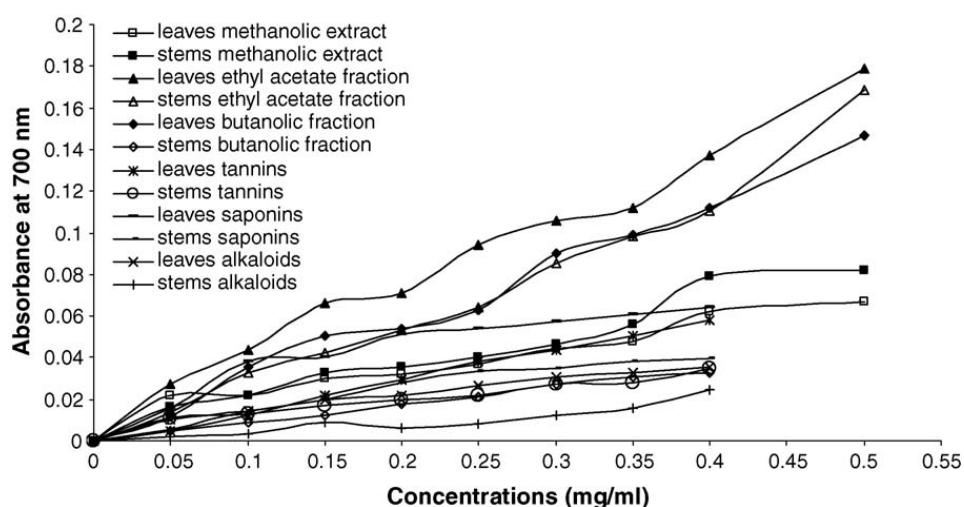


Fig. 1. Correlation between the sample concentrations and absorbance of reducing power of bioactive substances extracts from leaves and stems.

Table 3

EC₅₀ concentrations of reducing power from bioactive compounds.

Bioactive compounds	EC ₅₀ (mg/ml) Leaves	R ₂	EC ₅₀ (mg/ml) Stems	R ₂
Methanolic extract	4.55 ± 0.79	0.89	3.24 ± 0.23	0.93
Ethyl acetate fraction	1.51 ± 0.01	0.96	1.60 ± 0.05	0.96
Butanolic fraction	1.76 ± 0.00	0.98	5.96 ± 0.44	0.96
Tannins	3.31 ± 0.22	0.98	7.61 ± 0.08	0.97
Alkaloids	6.71 ± 0.44	0.98	9.06 ± 0.45	0.85
Saponins	4.02 ± 0.30	0.86	5.12 ± 0.03	0.93
Ascorbic acid	0.06 ± 0.00	0.99		

The data are displayed with mean ± standard deviation of twice replications. Ascorbic acid was used as positive control.

alkaloids from stems. These capacities of all extracts were less than that ascorbic acid (0.06 ± 0.00 mg/ml).

3.2.2. DPPH radical scavenging activity

The results of DPPH radical scavenging activity are shown in Figs. 2 and 3.

All chemical compounds had the scavenger effect expressed in DPPH free radical scavenging activity (%). This activity increased with increasing of concentration. For some chemicals, we can calculate the EC₅₀

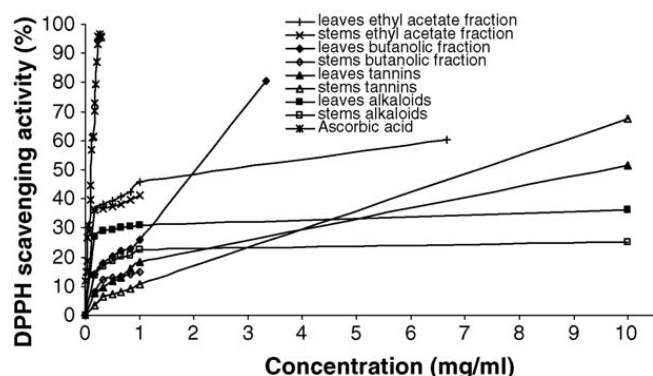


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities (%) of ethyl acetate fraction, butanolic fraction, tannins and alkaloids from *Atriplex halimus* leaves and stems. Ascorbic acid was used as positive control.

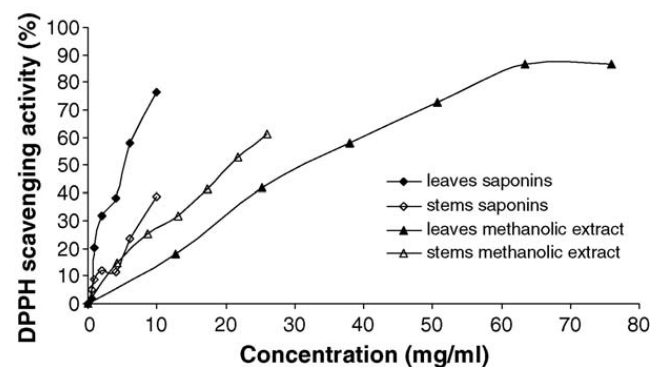


Fig. 3. DPPH radical scavenging activities (%) of methanolic extracts and saponins from *Atriplex halimus* leaves and stems.

(Table 4), but for others, it is impossible to determinate this parameter in this type of experimental conditions such as the leaves and stems alkaloids which presented the plateau state at percentage less to 50% inhibition. Though, the highest DPPH scavenging activity was found in butanolic and ethyl acetate fractions of the leaves, the EC₅₀ values were 1.73 (R₂ = 0.98) and 2.04 (R₂ = 0.99) mg/ml respectively. Moreover, leaves saponins, leaves tannins and stems tannins are also able to donate hydrogen atoms to DPPH radicals. The lowest hydrogen atom donating ability was found in leaves and stems methanolic extract (31.83 and 20.58 mg/ml respectively). However, DPPH free radical scavenging of all secondary metabolites tested was less than that ascorbic acid, a synthetic antioxidant (0.11 mg/ml). This result might be explained that the additive or synergistic effects of polyphenols make the antioxidant activity of the methanolic extract feeble than that the isolated bioactive compounds. In addition, the total phenolic content in crude extract does not incorporate all the antioxidants [33].

According to our knowledge, the chemical analysis of flavonoids of *A. halimus* from Algerian Sahara is not yet investigated. Both fractions ethyl acetate and butanolic from leaves and stems demonstrate the potent antioxidant properties and are related to their phenols including flavonoids. This family from polyphenols

Table 4

EC₅₀ concentrations of DPPH scavenging capacity from bioactive compounds.

Bioactive compounds	EC ₅₀ (mg/ml)	R ₂
Leaves ethyl acetate fraction	2.04	0.99
Leaves butanolic fraction	1.73	0.98
Leaves methanolic extract	31.83	0.99
Stems methanolic extract	20.58	0.99
Leaves saponins	4.75	0.98
Leaves tannins	7.64	0.99
Stems tannins	6.31	0.99
Ascorbic acid	0.11	0.96

showed the higher redox potentials which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors and singlet oxygen quenchers [34]. In *A. halimus*, this activity might be explained by the presence of flavonols, a class major in *Atriplex* species and the most abundant flavonoids in food. The flavonol aglycones: Kaempferol, quercetin, isorhamnetin, sometimes patuletin, spinacetin and tricetin were detected in eight *Atriplex* species [30]. The presence of two new flavonoid sulphates: kaempferol 3-*O*-sulphate-7-*O*-arabinopyranoside and quercetin 3-*O*-sulphate-7-*O*-arabinopyranoside from leaves of *A. hortensis* L. was reported by Bylka et al. [35]. For *A. littoralis*, the new acetylated flavonol glycoside was isolated from the aerial part [36]. Other earlier works suggested the presence the naringin, naringenin 7-*O*-glucoside, isorhamnetin 3-*O*-rhamnosyl (1-6) glucopyranoside and isorhamnetin 7-*O*-glucopyranoside in *A. farinosa* [28].

It is known in the literature that only the flavonoids of certain molecular structure, particularly those with a certain number and configuration of hydroxyl groups will determine the presence of the antioxidant properties [37]. These properties were decreased by glycosylation and configuration of other substituents [2] and influenced hydrogen or electron donating ability. Flavonols are one group of flavonoids cited by the same authors to possess the highest radical scavenging activity in plant extract than flavonoids, because their structure contain the hydroxyl groups with ortho dihydroxy groups (catechol structure) in the B-ring, 3-hydroxyl group and/or galloyl group (catechol structure) in the C-ring and the 2,3-double bond in conjugation with 4-oxo function (carbonyl group) in the C-ring [37]. These three criteria are essential for strong antioxidant activity.

4. Conclusion

It may be suggested that like all the halophyte plants, *A. halimus* produce the polyphenols and other bioactive substances potentially useful for medicinal properties and as natural food preservation. The distribution of these molecules was unequal in different parts of plant. The leaves exhibited the higher phenolic content in comparison with the stems. However, the flavonoids in ethyl acetate and butanolic fractions possess potential antioxidant activity which explains the relation structure-activity. Further isolation and identification of potential bioactive compounds particularly flavonoids responsible for antioxidant activity are needed. Other compounds like peptide, organic acids and proline which exist in

strong concentrations in halophytes plants to the abiotic constraints remain to be evaluated the in vitro their biological activity and to elucidate different antioxidant mechanisms.

References

- [1] N. Kartal, M. Sokmen, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, A. Sokmen, *Food Chem.* 100 (2007) 584.
- [2] Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke, *Life Sci.* 74 (2004) 2157.
- [3] C.C. Wong, H.B. Li, K.W. Cheng, F. Chen, *Food Chem.* 97 (2006) 705.
- [4] K. Zhou, L. Yu, *LWT Food Sci. Technol.* 37 (2004) 717.
- [5] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, *J. Agr. Food Chem.* 53 (2005) 1841.
- [6] C. Sanchez-Moreno, *Food Sci. Technol. Int.* 8 (2002) 121.
- [7] C.A. Rice-Evans, J. Sampson, P.M. Bramley, D.E. Holloway, *Free Radical. Res.* 26 (1997) 381.
- [8] M.L. Alicata, G. Amato, A. Bonanno, D. Giambalvo, G. Leto, *J. Agr. Sci.* 139 (2002) 139.
- [9] A. Talamali, R. Gorenflot, R. Haïcour, Y. Henry, P. Dutuit, *Acta Bot. Gall.* 154 (2007) 651.
- [10] L. Stringi, G. Amato, L. Gristina, *Agric. Mediterr.* 121 (1991) 16.
- [11] H.N. Le Houérou, *Agrofor. Syst.* 18 (1992) 107.
- [12] C. Day, Hypoglycaemic compounds from plants, in: C.J. Bailey, P.R. Flatt (Eds.), *New Antidiabetic Drugs*, Smith-Gordon, London, 1990, p. 267.
- [13] M.T. Bayoumi, H.M. El-Shaer, Impact of halophytes on animal health and nutrition, in: V.R. Squires, A.T. Ayoub (Eds.), *Halophytes as a resource for livestock and for rehabilitation of degraded lands*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1992, p. 267.
- [14] H.H. Abd El-Rahman, M.I. Mohamed, A.E.A. Gehad, I.M. Awadallah, *Int. J. Agr. Biol.* 8 (2006) 766.
- [15] E.A. Gihad, Utilization of high salinity tolerant plants and saline water by desert animals, in: H. Lieth, A.A. Massoom (Eds.), *Towards the rational use of high salinity tolerant plants*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1993, p. 443.
- [16] J.B. Harbone (Ed.), *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman and Hall, London, 1998, p. 302.
- [17] A. Bouchelta, A. Boughdad, A. Blenzar, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9 (2005) 259–269.
- [18] S.Y. Zhang, C.G. Zheng, X.Y. Yan, W.X. Tian, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 371 (2008) 654–658.
- [19] C.P. Singleton, J.A. Rossi, *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144.
- [20] M. Oyaizu, *Jpn. J. Nutr.* 44 (1986) 307.
- [21] C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto, *J. Sci. Food. Agr.* 76 (1998) 270.
- [22] M.J. Bano, J. Lorente, J. Castillo, O. Benavente-Garcia, J.A. Rio, A. Otuno, K.W. Quirin, D. Gerard, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 4247.
- [23] H. Falleh, R. Ksouri, K. Chaieb, N. Karray-Bouraoui, N. Trabelsi, M. Boulaaba, C. Abdely, *C. R. Biol.* 331 (2008) 372.
- [24] M.M. El-Adawy, A.Z.M. Salem, B.E. Borhami, H.M. Gado, M.S. Khalil, A. Abo-Zeid, 9th World Rabbit Congress, Nutrition and Digestive Physiology, Verona – Italy, June 10, 2008, p. 643.
- [25] A.M. El-Waziry, *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3 (2007) 605.
- [26] R. Ksouri, W. Megdiche, H. Falleh, N. Trabelsi, M. Boulaaba, A. Smaoui, C. Abdely. *C. R. Biol.* 331 (2008) 865.
- [27] R. Ksouri, W. Megdiche, A. Debez, H. Falleh, C. Grignon, C. Abdely. *Plant Physiol. Biochem.* 45 (2007) 244.

- [28] N.A.A. Al-Jaber, T.G. Mujahid, H.M.G. Al-Hazmi, J. King Saud. Univ. 3 (1991) 163.
- [29] R.Y. Yang, S. Lin, G. Kuo, Asia-Pac. J. Clin. Nutr. 17 (2008) 275.
- [30] S.C. Sanderson, Ch. GE-Ling, R. Durant McArthur, H.C. Stutz, Biochem. Syst. Ecol. 16 (1988) 143.
- [31] S.B. Christensen, A.A. Omar, J. Nat. Prod. 48 (1985) 161.
- [32] C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri, Food Sci. Technol. Int. 4 (1998) 391.
- [33] E.A. Hayouni, M. Abedrabba, M. Bouix, M. Hamdi, Food Chem. 105 (2007) 1126.
- [34] M.P. Kahkonen, A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala, M. Heinonen, J. Agr. Food Chem. 47 (1999) 3954.
- [35] W. Bylka, M. Stobiecki, R. Franski, Acta. Physiol. Plant. 23 (2001) 285.
- [36] W. Bylka, Acta Physiol. Plant. 26 (2004) 393.
- [37] Y. Cai, M. Sun, J. Xing, Q. Luo, H. Corke, Life Sci. 78 (2006) 2872.

Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. de deux stations de la région de Tlemcen (Algérie)

Nabila Benhammou, Fawzia Atik Bekkara

Laboratoire de Produits Naturels, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd, BP119, Imama, Tlemcen, ALGÉRIE. nabila.benhammou79@yahoo.fr

Introduction

Le lentisque (*Pistacia lentiscus* L.), appelé aussi pistachier lentisque, arbre à mastic, "Derou" ou "Tadist", est en général un arbuste de 1 à 8 m de hauteur (Iauk *et al.*, 1996).

Il appartient à la famille des Anacardiacees. Il se distingue des autres pistachiers par son feuillage persistant ; les feuilles de type composé sont paripennées, se terminant par une paire de folioles, tandis que celles des autres pistachiers se terminent par une seule foliole. Elles sont caduques en hiver, vert pâles et plus grandes en général. Le rachis portant les folioles est ailé. Les fleurs sont apétales. Le fruit est une petite drupe arrondie d'environ 5 mm. D'abord rouge, elle devient ensuite noire ; la graine est identique aux pistachiers, mais beaucoup trop petite pour être consommée. L'inflorescence est une grappe composée, lâche et aussi longue que les feuilles ; la floraison a lieu dès le mois de mars au mois de mai (Quezel & Santa, 1963).

Les qualités thérapeutiques de cette espèce sont connues depuis l'antiquité, où les anciens égyptiens ont utilisé le mastic du *Pistacia lentiscus* L. pour l'embaumement (*in* De Pooter *et al.*, 1991). Le lentisque constitue une source principale de la production d'oléorésine (*in* Delazar *et al.*, 2004). Cette résine est utilisée comme antiseptique du système respiratoire (Baytop 1999, *in* Durua *et al.* 2003), anti-*Helicobacter pylori* et peut être bénéfique dans le traitement d'ulcères de l'estomac (Al-Said *et al.* 1986, Delazar *et al.* 2004), contre l'hypertension (Villar *et al.*, 1987), dans le traitement d'eczémas, de diarrhées, de jaunisses, d'asthmes, et comme antipyrétique et anti-inflammatoire (*in* Durua *et al.* 2003).

L'huile essentielle de l'oléorésine est aussi utilisée en parfumerie pour fabriquer les déodorants, en cosmétique et comme un agent de saveur dans des préparations alimentaires (Delazar *et al.*, 2004).

La composition chimique de l'huile essentielle de cette plante révèle la présence de plusieurs composés majoritaires : myrcène, limonène, terpinen-4-ol, α -pinène, β -pinène, α -phellandrene, sabinène, p-cymène et γ -terpinène (Castola *et al.*, 2000).

Le but de cette étude est l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *P. lentiscus* récoltée dans deux stations de la région de Tlemcen (Algérie).

Matériels et Méthodes

Matériel végétal

P. lentiscus (Anacardiacees) est une plante spontanée très connue en Méditerranée. Elle a été récoltée en janvier 2005 dans les stations d'Oum El Alou (1°16'W-34°54'N, altitude de 800 m) et d'Ain Fezza (1°17'W-34°55'N, altitude de 730 m) de la région de Tlemcen (Algérie).

Extraction de l'huile essentielle

Les feuilles utilisées pour l'extraction de l'huile essentielle sont séchées à l'air libre et à l'ombre, dans une pièce aérée et à la température ambiante. L'huile essentielle a été extraite par entraînement à la vapeur d'eau.

Souches testées

Les souches bactériennes retenues pour cette étude ont été isolées de l'hôpital de Tlemcen ; elles sont purifiées sur des milieux spécifiques et identifiées par la plaque API20. Elles regroupent :

- Les bactéries à Gram (-) [*Escherichia coli* (E₁), 5044172 ; *Klebsiella pneumoniae* (KL₁), 5215773 ; *Pseudomonas aeruginosa* (P₄), 22212004 ; *Salmonella typhi* (SL), 4404540 ; *Enterobacter cloacae* (En), 1305573 ; *Proteus mirabilis* (Pr), 0536040)].
- Les bactéries à Gram (+) [*Listeria monocytogenes* (L11), ATCC 19111 ; *Staphylococcus aureus* (ST₁), ATCC 601].
- La levure (*Candida albicans*, 444), provenant du Laboratoire de Mycologie, (Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen).

Milieux de purification et de revivification

La purification se fait par l'ensemencement de ces souches sur des milieux spécifiques :

- Milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus*.
- Milieu Mac Conkey pour les entérobactéries (P₄, KL₁, SL, Pr et En).
- Milieu Palcam, Oxford pour *Listeria monocytogenes*.

La revivification des souches s'effectue sur le milieu bouillon nutritif pendant 24 h pour l'obtention d'une culture jeune.

Milieux de culture

Les milieux utilisés pour l'étude de l'activité antibactérienne sont :

- Gélose Mueller-Hinton (M.H) pour les bactéries.
- Sabouraud dextrose agar (SDA) pour *Candida albicans*.

Evaluation de l'activité antibactérienne

La méthode adoptée pour la détermination de l'activité antibactérienne est celle de diffusion de disques (Gulluce *et al.*, 2003). Nous avons utilisé des disques de papier WATTMAN stériles de 6 mm de diamètre, imprégnés d'huile essentielle (2 et 5 µl) et déposés à la surface d'un milieu gélosé, en boîtes de Pétri préalablement ensemencées en surface en nappe à l'aide d'une suspension du germe choisi à raison de 1 ml. Après 18 h d'incubation à 37°C, la lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en mm, contre le contrôle négatif en absence de l'huile essentielle.

La quantité de l'inoculum est ajoutée à 10⁸ UFC/ml, fixée par la mesure de la densité optique (DO) entre 0.08 et 0.1 (Hernández *et al.*, 2000).

Résultats et discussion

Rendement de l'huile essentielle

Les teneurs en huile essentielle obtenues à partir des feuilles sont de l'ordre de 0.05% et 0.07% respectivement pour les stations de Ain Fezza et d'Oum El Alou. L'étage bioclimatique de ces deux stations est caractérisé par un climat semi-aride et tempéré, alors que leurs altitudes sont faiblement différenciées 730 et 800 m). Ces quantités sont très faibles par rapport à celles décrites dans la littérature (Bonsignore *et al.* 1998, Magiatis *et al.* 1999, Delazar *et al.* 2004).

Les raisons pour cette variabilité peuvent être expliquées par les différences des conditions environnementaux (climat et situation géographique), la période de la récolte et la technique de distillation (Lahlou, 2004). Il est aussi à noter que la production des huiles

essentiels et aromatiques à partir de la plante résulte d'une série de régulations physiologique, biochimique, métabolique et génétique (Costa *et al.*, 2003).

Activité antibactérienne

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *P. lentiscus* des deux stations sont résumés dans le tableau 1.

La comparaison des activités de l'huile essentielle des deux stations révèle une sensibilité plus ou moins modérée de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans* à 2 et 5 μ l. Cette activité est élevée dans le cas de l'huile essentielle de *P. lentiscus* d'Oum El Alou vis-à-vis de *Salmonella typhi* (zone d'inhibition=17.3mm).

Tableau 1. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (mm) cultivées en présence de l'huile essentielle de *P. lentiscus*. ++ Absence de l'huile essentielle. Nombre de répétitions=2.

Souches	Huile essentielle de <i>P. lentiscus</i>				Contrôle négatif
	Ain Fezza		Oum El Alou		
	2 μ l	5 μ l	2 μ l	5 μ l	
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,8	10	8	8	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	7,5	10,3	8	9,5	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	7	7	7	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	7	0	0	++
<i>Salmonella typhi</i>	10	10,5	10,2	17,3	++
<i>Proteus mirabilis</i>	0	7	0	7	++
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	++
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	++
<i>Candida albicans</i>	8,5	8,6	6,5	8	++

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* et *Proteus mirabilis* se sont caractérisées par une résistance. Nous pouvons déduire que les souches à Gram (-) sont moins sensibles voire résistantes à cette huile essentielle. Par contre les souches à Gram (+) et *Candida albicans* sont plus sensibles.

Nos résultats concordent avec Bonsignore *et al.* (1998) qui ont pu montrer que l'huile essentielle de la partie aérienne de *P. lentiscus* n'a aucune activité contre les bactéries Gram (-) et Gram (+). Tassou & Nychas (1995) et Shelef *et al.* (1980) ont révélé les mêmes résultats ; ils ont noté que les bactéries Gram (+) sont plus sensibles aux huiles essentielles que les Gram (-). Magiatis *et al.* (1999) montrent aussi que l'huile essentielle des feuilles de *P. lentiscus* a une activité bactériostatique, dont les zones d'inhibition varient de moins de 7 mm dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Candida tropicalis* et *Torulopsis glabrata* à 10 mm pour *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*. Selon la littérature, l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle est due probablement aux composés majoritaires tels l' α -pinène (*in* Magiatis *et al.*, 1999) ; ceci a été vérifié par certains auteurs (Magiatis *et al.* 1999, Delazar *et al.* 2004). Elle peut être aussi attribuée aux phénols, constituants des huiles essentielles (Katayama & Nagai 1960, Tassou & Nychas 1995).

Conclusion

L'activité du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *P. lentiscus* vis-à-vis des bactéries testées nous a montré que les souches Gram (-) sont résistantes par rapport aux Gram (+). Pour une éventuelle application pharmacologique, il serait souhaitable de compléter cette étude en s'intéressant à identifier les substances responsables de l'effet biologique et les tester sur d'autres micro-organismes pathogènes de bactéries et de champignons.

Références

- Al-Said M, Ageel A, Parmar N, Tariq M (1986) Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *Journal of Ethnopharmacology* 15(3): 271-278.
- Baytop T (1999) Therapy in medicinal plants in Turkey. Istanbul Nobel Tip Kitap Evleri Press.
- Bonsignore L, Cottiglia F, Loy G (1998) Antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* aerial parts. *Fitoterapia* LXIX(6): 537-538.
- Castola V, Bighelli A, Casanova J (2000) Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 79-88.
- Costa M, Nogueira JMF, Miguel MG, Romano A (2003) In vitro mass clonal propagation of *Dittrichia viscosa* subsp. *revoluta* and analysis of its secondary metabolites. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78(3): 310-314.
- De Pooter HL, Schamp NM, Aboutabl EA, El Tohamy SF, Doss SL (1991) Essential oils from the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt. *Flavour and Fragrance Journal* 6: 229-232.
- Delazar A, Reid RG, Sarker SD (2004) GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *mutica*. *Chemistry of Natural Compounds* 40(1): 24-27.
- Durua ME, Cakirb A, Kordalic S, Zenginc H, Harmandara M, Izumid S, Hiratad T (2003) Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia* 74: 170-176.
- Gulluce M, Sokmen M, Daferera D, Agar G, Ozkan H, Kartal N, Polissiou M, Sokmen A, Sahin F (2003) In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agri. Food Chem.* 51: 3958-3965.
- Hernández NE, Tereschuk ML, Abdala LR (2000) Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology* 73: 317-322.
- Iauk L, Ragusa S, Rapisarda A, Franco S, Nicolosi VM (1996) In vitro antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts : Preliminary report. *Journal of Chemotherapy* 8(3): 207-209.
- Katayama T, Nagai I (1960) Chemical significance of the volatile components of spices in the food preservative viewpoint. VI. Structure and antibacterial activity of terpene. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisher.* 26: 29-32.
- Lahlou M (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.* 18: 435-448.
- Magiatis P, Melliou E, Skaltsounid AL, Chinou IB, Mitaku S (1999) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Plant Med.* 65: 749-752.
- Quezel P, Santa S (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, Editions CNRS, France.
- Shelef LA, Naglik OA, Bogen DW (1980) Sensitivity of some common foodborne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. *J. Fd. Sci.* 45 : 1042-1044.
- Tassou CC, Nychas GJE (1995) Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. *International Biodeterioration & Biodegradation* 36: 411-420.

Villar A, Sanz MJ, Paya M (1987) Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. *Int. J. Crude Drug Res.* 25(1): 1-3.

Résumé

Pistacia lentiscus L. est une plante médicinale très utilisée localement par la population algérienne pour traiter différentes maladies grâce à ses activités biologiques (antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et anti-hypertension). Dans le cadre de recherches sur les agents antimicrobiens naturels, nous avons procédé à évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *P. lentiscus* provenant de deux stations de la région de Tlemcen (Algérie). Les résultats obtenus nous ont révélé la résistance de nombreux germes pathogènes en particulier les bactéries Gram (-) à l'huile essentielle testée.

Mots-clés : *Pistacia lentiscus*, huile essentielle, activité antibactérienne.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF METHANOLIC AND WATER EXTRACTS FROM *Marrubium deserti* (de Noë) AND *Thymelaea microphylla* FROM ALGERIAN SAHARA

Nabila Benhammou^{1*}, Fawzia Atik Bekkara¹ and Jean-Marie Coustard²

¹ Laboratory of Natural Products, Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, University Abou Bekr Belkaid, LP 119, Imama, Tlemcen, Algeria

² "Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles" UMR CNRS 6514, Faculty of Sciences, University of Poitiers, - 40 avenue du Recteur Pineau – 86022 Poitiers, France

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the antioxidant properties of methanolic and aqueous extracts of leaves and stems of *Marrubium deserti* (de Noë) and *Thymelaea microphylla*. Two methods were used for this activity, which are 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and reducing power.

The total phenolic content was estimated using Folin-Ciocalteu assay, and is expressed as gallic acid equivalents (mg g^{-1}). The amounts of phenolic compounds were higher in the methanolic extracts than in the aqueous ones, ranging between 133.7 ± 27.3 and $257.4 \pm 89.3 \text{ mg g}^{-1}$ for the methanolic extracts from stems and leaves of *M. deserti* and *T. microphylla*, respectively. For water extracts, it varied between 18.6 ± 1.9 to $36.1 \pm 3.3 \text{ mg g}^{-1}$. These extracts possess the most potent reducing power and DPPH scavenging activity but have a weak capacity in comparison with BHT, Trolox and ascorbic acid.

KEYWORDS: *Marrubium deserti*, *Thymelaea microphylla*, methanolic extract, aqueous extract, antioxidant capacity

INTRODUCTION

Traditional medicine is widely practiced in all countries, and Algeria is not excluded from this discipline. Today, up to 90 % of the African population use only plants as a source of drugs [1]. They always have constituted not only one means of modern and traditional, but also inexhaustible treatment for the discovery of the new molecules. Only a small number of available plants have been studied in this respect. The most important of these bioactive constituents of plants are alkaloids, tannins, flavonoids and phenolic compounds [2]. These phenolic compounds constitute the interest which is increased considerably in finding naturally occurring antioxidants.

The so-called phenolic compounds include simple molecules (phenolic acids, phenyl propanoids and flavonoids) to highly polymerized compounds (lignins, melanins, tannins), with flavonoids representing the most common and widely distributed sub-group [3]. These molecules have broad biological effects including antibacterial, anti-inflammatory, anti-allergic, hepatoprotective, antithrombotic, antiviral, anticarcinogenic and vasodilatory actions [4]. They have mainly antioxidant properties and are able to scavenge free radicals.

Epidemiological studies have shown that a correlation exists between an increased consumption of phenolic antioxidants and a reduced risk of cardiovascular disease. The same relationship was also observed with certain types of cancer [5].

The Algerian Sahara is a place where climatic conditions are very extreme and severe. The plant species have developed a very efficient secondary metabolism to cope with severe stress conditions, such as those typical of the Mediterranean climate. Such species are generally very rich in polyphenols which are known to protect the plant cells from the detrimental effects of short-wave sun radiations (UV-B and UV-A), and also to counter the negative effects of reactive oxygen species (ROS) on cell metabolism [6]. Dryness also affects the photosynthesis and the breathing of the plant. Generally, the accumulation of phenolic compounds is a response to non-specific types of aggression [7].

Marrubium is a genus of about 40 species of flowering plants in the family Lamiaceae indigenous in Europe, the Mediterranean and Asia [8]. *Marrubium deserti* de Noë (known as Djaïdi, Marriout) is an endemic herb of central and north Algerian Sahara growing in dry pastures. This plant is a shrub with blancher's leaves and stems. The leaves are velvety and opposite, and are generally terminated by three large teeth of variable form. The flowers are pale pink. The plant is grazed by the herbivores [9]. *Thymelaea* is a genus of about 30 species of evergreen shrubs

and herbs in the flowering plant family Thymelaceae. *Thymelaea microphylla* is an endemic annual plant or under shrub with dioic flowers and clusters. The leaves are very small, ovoid, scattered and distant on the branches. *Thymelaea microphylla* is very common in arid and desert pastures [9].

From an ethnobotanic point of view, the leaves and the young buds of *M. deserti* are used in decoction against intestinal disturbances, respiratory diseases and fever. Decoction of *Thymelaea microphylla* is used against abscesses by mixing with milk.

Marrubium sp. is known to have a high polyphenol level [10]. The chemical constituents of *Marrubium* sp. are flavonoids and phenylethanoids, but the genus is best-known to produce a large variety of diterpenoids [11, 12, 13], such as the well-known furanic labdane diterpene marrubiin, the first to be isolated and largely studied from its chemical and pharmacological point of view [14]. Although many studies on the chemistry of numerous species of *Marrubium* have been reported, only one paper on the phytochemistry of *Thymelaea microphylla* species was reported so far in the literature [15]. Oleanolic acid, β -sitosterol and 3-*O*- β -D-glucopyranosyl- β -sitosterol were detected in the aerial parts. The antioxidant activity of the both endemic plants is not yet reported in literature.

The aim of this work was to evaluate the antioxidant activity of methanolic and aqueous extracts of leaves and stems from *Marrubium deserti* de Noë and *Thymelaea microphylla* using the DPPH test and the reducing power assays in relation with the content of total phenolic compounds.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Aerial parts of *Marrubium deserti* and *Thymelaea microphylla* were collected from Ain Ben Khelil, region of Naâma, Algeria, in May 2007. The plants have been identified by the Vegetable Ecological Laboratory, University of Tlemcen, Algeria. The plants were dried in a shadowy place and at room temperature for a few days.

Chemical reagents

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazine (DDPH) was purchased from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, 97 %, C₁₄H₁₈O₄) and Folin-Ciocalteu reagent were provided by Sigma-Aldrich Chemie (Germany), and L-(+)-ascorbic acid was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents and solvents were from Sigma-Aldrich (Germany) and of analytical grade.

Extraction procedure

Methanolic fraction: The leaves and stems of *Marrubium deserti* and *Thymelaea microphylla* (1 g) were bro-

ken into small pieces and macerated in methanol (20 ml) at room temperature for 48 h. The extract was then separated from the residue by filtration through Whatman n° 0.45 filter paper. The solvent was evaporated under vacuum at 60 °C. The residue was weighed and dissolved in methanol (3 ml) for further analysis. Eventually, the solutions were stored at -20 °C.

Aqueous fraction: The same procedure was applied using water instead of methanol. The final residue was dissolved in water (3 ml).

Determination of total phenolic compounds

The total phenolic content was determined by spectrometric method using "Folin-Ciocalteu" reagent assay [16]. A volume of 200 μ l of the extract prepared as described above, was transferred into a test tube and mixed with 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent (previously diluted 10-fold with deionised water). The mixture was allowed to stand at room temperature for 5 min. Then, 0.8 ml of 7.5% (w/v) sodium carbonate solution was added to the mixture that was gently stirred. After standing at room temperature for 30 min, the absorbance was measured at 765 nm using a Jenway 6405 UV/ Vis spectrophotometer. Gallic acid was used as a standard for the calibration curve. The total phenolic content was expressed as gallic acid equivalents in mg per g dry matter (leaf or stem).

Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

The reducing power of the extract was determined according to the method of Oyaizu [17]. Various amounts of the extracts in distilled water were mixed with phosphate buffer (2.5 ml, 0.2 M, pH 6.6) and 1 % of potassium ferricyanide water solution (2.5 ml, K₃[Fe(CN)₆]). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Aliquots of trichloroacetic acid (2.5 ml, 10 % aqueous solution) were added to the mixture which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant (2.5 ml) was mixed with distilled water (2.5 ml) and a freshly prepared FeCl₃ solution (0.5 ml, 0.1 %). The absorbance was measured at 700 nm. Ascorbic acid was used as a positive control. In this method, increased absorbance indicates an increased reducing power.

Free radical scavenging activity, DPPH assay.

The free radical scavenging activity was measured by a modified DPPH[•] assay [18]. A solution of the extract prepared as describe above (50 μ l) was added to 1950 μ l of methanolic DPPH solution (0.025 gL⁻¹). The decreasing absorbance at 515 nm was monitored in order to reach constant values. The DPPH[•] concentration in the reaction medium was calculated from the following calibration curve, determined by linear regression:

$$A_{515\text{nm}} = 24.41 \times [\text{DPPH}^{\bullet}]_t + 0.0022 \quad R^2 = 0.999$$

where $[\text{DPPH}^{\bullet}]_t$ was expressed as mg/ml at *t* time.

The percentage of the remaining DPPH[•] (%DPPH[•]_{REM}) at the steady state was calculated as follows:

$$\% \text{DPPH}^{\bullet}_{\text{REM}} = 100 \times [\text{DPPH}^{\bullet}]_t / [\text{DPPH}^{\bullet}]_{t=0}$$

where $[DPPH^*]_{t=0}$ and $[DPPH^*]_t$ are concentrations of DPPH* at $t=0$ and $t=t$, respectively.

Using various antioxidant concentrations, it was possible to determine the amount of antioxidant necessary to halve the initial DPPH* concentration (EC_{50}).

EC_{50} is expressed in mg of dry extract per g of DPPH. The time needed to reach the EC_{50} concentration, noted T_{EC50} [18], was graphically determined.

The antiradical efficiency (AE) was calculated as follows: $AE = 1 / (EC_{50} \times T_{EC50})$

Statistical analysis

All experiments were conducted in duplicate, and results reported with means \pm standard deviation (S.D.). Correlation coefficients of the antioxidant activity were calculated using the regression program Origin 6 and TWIN2.

RESULTS AND DISCUSSION

Amount of total phenolic compounds

Phenolic compounds are powerful chain-breaking antioxidants [19]. This activity depends mainly on different structural features, such as O-H bond dissociation energy, resonance delocalisation of the phenol radical ($PheO^{\bullet}$), and steric hindrance from bulky substituents on the aromatic ring [20]. However, the results obtained with the Folin-Ciocalteu assay must be analyzed carefully because this assay is sensitive to nitrogen-containing compounds and other reducing substances that may be present in the sample.

As a general comment, the phenolic contents were (i) higher in the methanolic extracts than in the aqueous extracts, and (ii) higher in leaves than in stems (Table 1).

The presently observed polyphenolic contents for *M. deserti* and *T. microphylla* are in agreement with the fact that methanol is known to be a good solvent for polyphenolic compounds extraction.

The observed methanolic extract values from leaves (235.1 and 257.4 mg g⁻¹ dry weight, for *M. deserti* and *T. microphylla*, respectively) are high, e.g. much higher than those reported for plant species from Jordan (2.1 to 52.8 mg g⁻¹ dry weight) [21], or for some Algerian medicinal plants, such as *Thymelaea hirsuta* (6.81 mg g⁻¹) [22] and *M. vulgare* (140 mg g⁻¹ dry weight) [23]. These high polyphenolic levels are very probably directly connected to the harsh climatic conditions prevailing in the Northern Sahara (hot temperatures, high solar exposure, dryness, short growing season) as a response to oxidative reactions [22].

The ratio methanolic/aqueous extract of *M. deserti* is close to 7.6 for leaves and 6.6 for stems. Values of the same magnitude were found for *T. microphylla* (7.1 and 10.8, respectively). The main feature in Table 1 is the relatively high level of phenolic compounds in the methanolic extract of stems from *T. microphylla*. The role of other interfering substances needs to be understood. Further studies are needed to complete this analysis because the Folin-Ciocalteu test is also a measure of the redox properties of the whole extract, which may also include ascorbic acid, sugars, proteins or pigments. In order to have a more specific method for the evaluation of phenol antioxidant properties, it would be necessary to remove all non-phenolic reducing substances interfering during the test [22].

Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

The FRAP of methanolic and aqueous extracts of leaves and stems from *Marrubium deserti* and *Thymelaea microphylla* were compared to the FRAP of ascorbic acid. This technique uses the direct reduction of hexacyanoferrate(III) anion $[Fe(CN)_6]^{3-}$ into hexacyanoferrate(II) anion $[Fe(CN)_6]^{4-}$.

As shown in Tables 2 and 3, the methanolic extracts studied always exhibited a stronger reducing power than the water extracts, as expected from the Folin-Ciocalteu test values.

TABLE 1 – Total phenolic contents of aqueous and methanolic extracts of *M. deserti* and *T. microphylla* (Folin-Ciocalteu assay).

Plant	Part of the plant	Extract*	Total phenolic content**	Methanol/Water GAE Ratio
<i>Marrubium deserti</i>	Leaf	MML	235.1 \pm 6.1	7.6
		WML	30.8 \pm 6.7	
	Stem	MMS	133.7 \pm 27.3	6.6
		WMS	20.1 \pm 2.6	
<i>Thymelaea microphylla</i>	Leaf	MTL	257.4 \pm 89.3	7.1
		WTL	36.1 \pm 3.3	
	Stem	MTS	201.6 \pm 4.6	10.8
		WTS	18.6 \pm 1.9	

Values are means \pm standard deviation (n=2); *MTL: methanolic extract of *T. microphylla* (leaf), WTL: water extract of *T. microphylla* (leaf), MTS: methanolic extract of *T. microphylla* (stem), WTS: water extract of *T. microphylla* (stem), MML: methanolic extract of *M. deserti* (leaf), WML: water extract of *M. deserti* (leaf), MMS: methanolic extract of *M. deserti* (stem), WMS: water extract of *M. deserti* (stem); ** mg gallic acid equivalents g⁻¹ dry plant weight (GAE).

TABLE 2 - Reducing power of methanolic and water extracts of leaves and stems from *Marrubium deserti*.

Concentrations (mg ml ⁻¹)	Absorbance at 700 nm ^a			
	MMS	WMS	MML	WML
0.1	0.094 ± 0.001	0.017 ± 0.00	0.085 ± 0.002	0.010 ± 0.002
0.2	0.168 ± 0.005	0.044 ± 0.002	0.159 ± 0.002	0.049 ± 0.003
0.3	0.234 ± 0.012	0.076 ± 0.002	0.228 ± 0.004	0.084 ± 0.002
0.4	0.326 ± 0.007	0.098 ± 0.001	0.299 ± 0.00	0.123 ± 0.014
0.5	0.338 ± 0.001	0.118 ± 0.004	0.391 ± 0.007	0.125 ± 0.001
IC ₅₀	0.71 ± 0.01	1.98 ± 0.07	0.65 ± 0.001	1.69 ± 0.11

^a Means ± SD; for further details see Table 1.

TABLE 3 - Reducing power of methanolic and aqueous extracts of leaves and stems from *Thymelaea microphylla*.

Concentration (mg/ml)	Absorbance at 700 nm ^a				
	MTS	WTS	MTL	WTL	Ascorbic acid
0.05	0.030 ± 0.009	0.019 ± 0.001	0.034 ± 0.003	0.044 ± 0.004	0.463 ± 0.012
0.1	0.054 ± 0.001	0.038 ± 0.002	0.072 ± 0.006	0.079 ± 0.006	0.815 ± 0.004
0.15	0.074 ± 0.001	0.060 ± 0.009	0.107 ± 0.004	0.120 ± 0.00	1.311 ± 0.058
0.2	0.092 ± 0.00	0.072 ± 0.002	0.136 ± 0.005	0.151 ± 0.002	1.643 ± 0.075
0.25	0.116 ± 0.00	0.071 ± 0.02	0.174 ± 0.002	0.183 ± 0.004	2.367 ± 0.053
IC ₅₀	1.17 ± 0.07	1.57 ± 0.08	0.72 ± 0.03	0.69 ± 0.01	0.063 ± 0.002

^a Means ± SD; for further details see Table 1.

The methanolic extract of leaves and stems of *Marrubium deserti* showed similar behavior, but the leaf extracts exhibited a higher reducing power than the stem extracts from *Thymelaea microphylla*. However, these antioxidant activities were inferior to that of ascorbic acid.

On a structural point of view, this observation is in agreement with the lipophilic properties of phenols with a high number of hydrogen and carbon atoms [24].

The absorbances versus the extract concentrations were extrapolated to 0.5 absorbance unit (EC₅₀ or IC₅₀), as can be seen in Tables 2 and 3. In those experiments, a low

IC₅₀ value is the indication of a high Ferric-reducing antioxidant power.

In this work, the highest FRAP value was observed for ascorbic acid (IC₅₀ 0.063 ± 0.002 mg/ml, Table 2), followed by the methanolic leaf extract from *Marrubium deserti* (MML) with IC₅₀ 0.65 ± 0.001, and then the aqueous leaf extract from *Thymelaea microphylla* (WTL) with IC₅₀ 0.69 ± 0.01 mg/ml.

Several studies have shown some kind of relationship between the antioxidant activity and total phenolic compounds [22, 25]. In the present study, a fair correlation was observed for the aqueous extracts (R² = 0.562), but no correlation for the methanolic extracts (R² = 0.008).

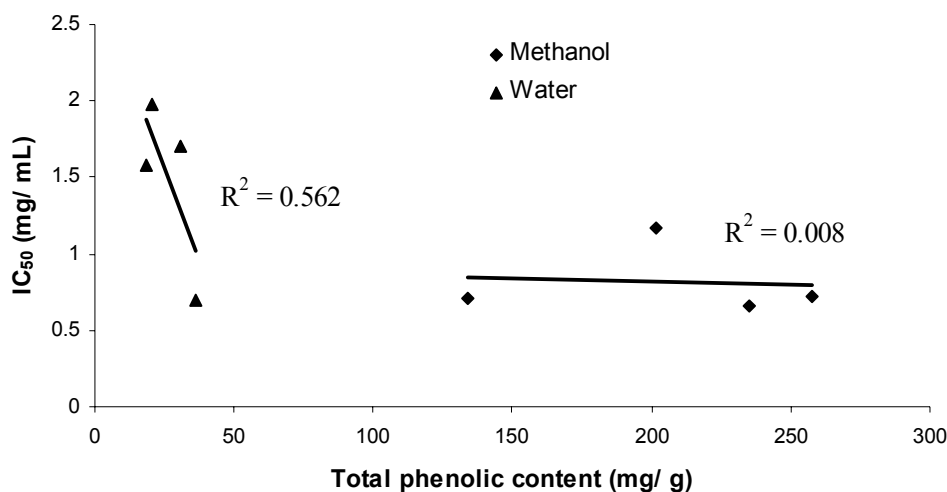


FIGURE 1 - Relationship between the IC₅₀ values and the polyphenolic contents of *Marrubium deserti* and *Thymelaea microphylla* (extraction solvents: water or methanol).

DPPH radical scavenging activity

DPPH assay is used to evaluate the scavenging activity of various natural products. It has been generally accepted as a model compound for free radicals originating in lipid oxidation [26].

In Fig. 2, the evolution of [DPPH^{*}] versus time, for both plants and both extraction solvents used (methanol and water), are reported.

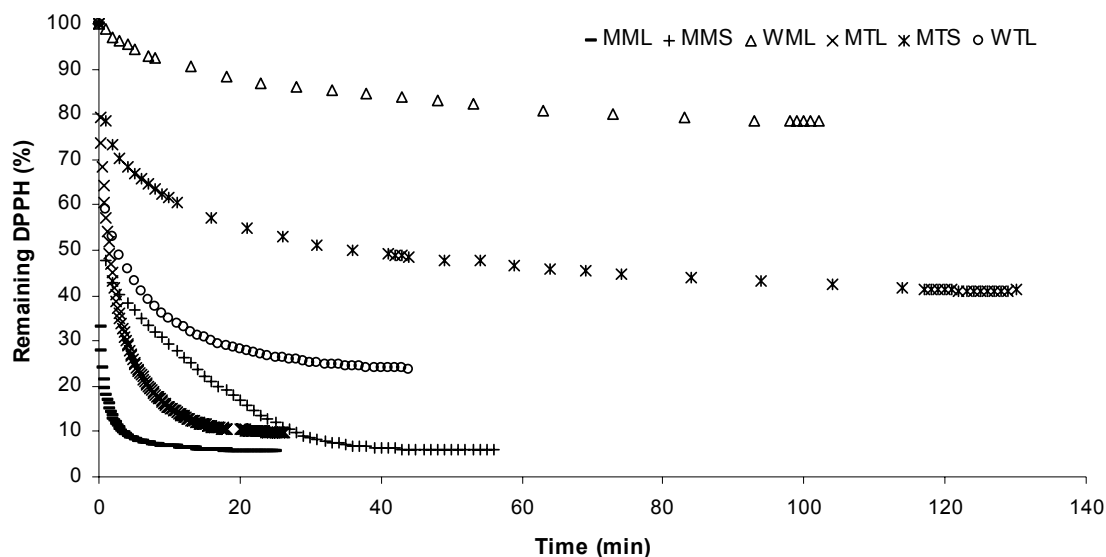


FIGURE 2 - Kinetic behaviour of methanolic and aqueous extracts of leaves and stems from *Marrubium deserti* and *Thymelaea microphylla* at 1600 mg antioxidant g⁻¹ DPPH.

TABLE 4 - Scavenging effects of sample extracts on DPPH.

Sample extracts	Concentration (mg antioxidant g ⁻¹ DPPH)	Remaining DPPH at steady state (%) ^a	EC ₅₀ (mg antioxidant g ⁻¹ DPPH)	Correlation Coefficient (R ²)	Time (T _{EC50}) (min)	Correlation Coefficient (R ²)	Antiradical efficiency (AE)
MTL	800	47.68 ± 5.26	512.75	0.94	1468.13	0.91	1.32 ^b
	1152	8.30 ± 0.50					
	1600	9.72 ± 1.01					
	2880	6.40 ± 0.24					
	9600	6.66 ± 0.18					
MTS	1152	28.70 ± 0.57	830.14	0.95	153.91	0.89	7.82 ^b
	1600	40.78 ± 1.50					
	2880	6.18 ± 0.71					
	4800	6.11 ± 0.65					
WTL	1600	23.59 ± 0.89	205.58	0.99	2506.85	1.00	1.94 ^b
	2000	19.71 ± 0.60					
	2400	26.35 ± 3.81					
	3200	22.67 ± 3.10					
	4000	27.63 ± 3.90					
WTS	12000	41.27 ± 2.07	7407.20	1.00	5230.54	1.00	0.02 ^b
	16000	37.99 ± 1.58					
MMS	400	51.45 ± 6.57	366.36	0.99	18.56	1.00	1.47 ^c
	800	17.98 ± 2.61					
	1600	5.92 ± 0.34					
	1920	5.62 ± 0.18					
MML	3200	5.24 ± 0.18	396.32	0.94	63.84	0.94	0.39 ^c
	400	64.25 ± 3.93					
	800	8.67 ± 1.65					
	1600	5.65 ± 0.00					
WML	1920	6.16 ± 0.33	4314.80	0.99	Nd	0.94	Nd
	3200	5.88 ± 0.34					
	1600	78.39 ± 3.87					
	6400	34.43 ± 4.85					
8000	27.32 ± 4.75						
BHT			13.467	0.999	161.523	0.997	0.45 ^d
Trolox			49.21	0.997	7.803	0.994	2.60 ^d
Ascorbic acid			39.53	0.917	0.606	0.893	41.74 ^d

Nd: not determined; ^a Means ± SD; ^b Antiradical efficiency (×10⁻⁶); ^c Antiradical efficiency (×10⁻⁴); ^d Antiradical efficiency (×10⁻³).

With regard to the *Marrubium deserti*, the methanolic extracts from leaves and stems exhibited higher scavenging activity than those from *Thymelaea microphylla*. Table 4 shows that the percentages of $[DPPH]_{REM}$ of leaf methanolic extracts at 1600 mg of dry extract per g DPPH were 5.65 and 9.72 % for *Marrubium deserti* and *Thymelaea microphylla*, respectively, and those for the aqueous extracts were 78.39 and 23.59 % for WML and WTL, respectively. In the case of stem methanolic extracts, these percentages were 5.92 and 40.78 % for MMS and MTS. The scavenging activity of the extract to the DPPH test depends on the solvent used for extraction. Previous studies about the influence of extraction solvent on yield of total phenolic content and antioxidant activity of the extracts have been carried out [25, 27]. In the present studies, methanol is a better solvent than water, a result in agreement with the lipophilic character observed for higher molecular weight phenols [24]. Another investigation showed

that the DPPH scavenging activity of the methanol extract is higher than that of hexane, dichloromethane and acetone extracts, suggesting that the hydrogen-donating compounds are more likely to be present in polar solvents [28, 29]. The EC_{50} and antiradical efficiency (AE) values of scavenging DPPH radicals of all extracts ranged from 205.58 to 7407.20 mg g⁻¹ DPPH and from 0.02×10^{-6} to 1.47×10^{-4} , respectively. Compared with commonly used antioxidants, such as BHT (0.45×10^{-3}), Trolox (2.60×10^{-3}) and ascorbic acid (41.74×10^{-3}), the extracts showed low antiradical efficiency following the classification established by Sánchez-Moreno et al [18] ($AE \leq 1 \times 10^{-3}$ low; $1 \times 10^{-3} < AE \leq 5 \times 10^{-3}$ medium; $5 \times 10^{-3} < AE \leq 10 \times 10^{-3}$ high; and $AE > 10 \times 10^{-3}$ very high).

From Fig. 3, there was a positive linear correlation between the EC_{50} concentrations of DPPH scavenging and total phenolic content for aqueous extracts ($R^2 = 0.91$), but

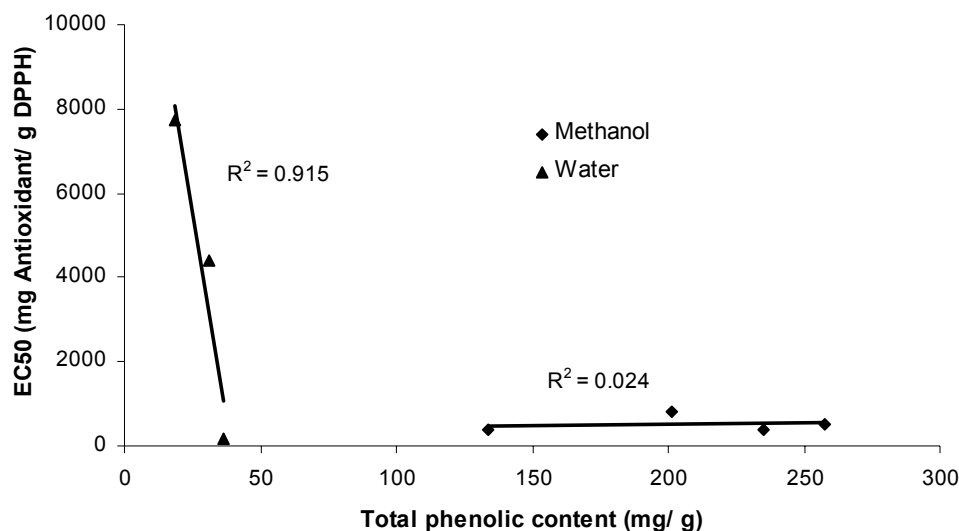


FIGURE 3 - Correlation between EC_{50} versus the phenolic compounds concentration (mg/ g).

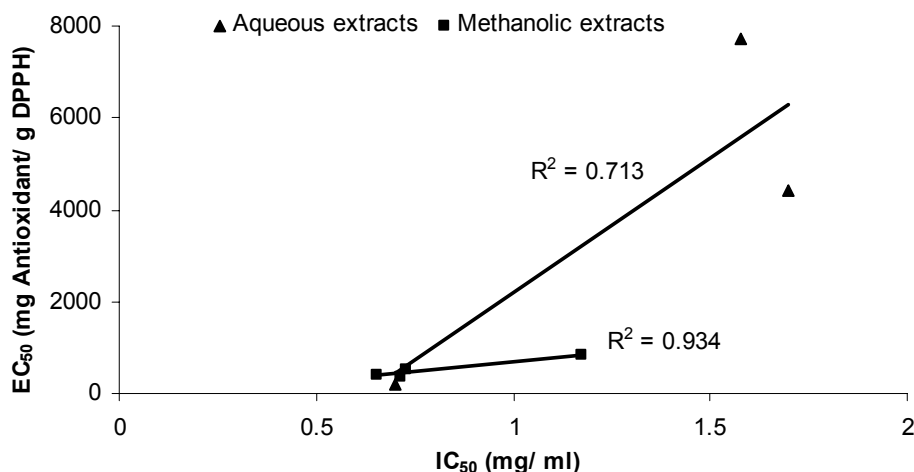


FIGURE 4 - Correlation between EC_{50} (mg/g) values versus the IC_{50} ones (mg/ mL).

no linear dependence was observed for the methanolic extracts, as revealed by a low correlation ($R^2 = 0.02$). These results were consistent with the findings of many research groups who reported such positive correlation between total phenolic content and antioxidant activity [22, 30, 31]. It is well-known that most antioxidant compounds display distinct scavenging ability in aqueous or hydrophobic milieu, or even at lipid-water interfaces [32]. Moreover, a strong correlation was observed between the EC_{50} of DPPH free radical scavenging ability and IC_{50} of ferric-reducing antioxidant power of methanolic and aqueous extracts (methanolic/aqueous: $R^2 = 0.93/0.71$) (Fig. 4). This result indicated that compounds present in the methanolic and aqueous extracts capable of reducing DPPH radicals were also able to reduce ferric ions. These compounds are antioxidant; possess hydrogen atoms and a single electron transfer mechanism. These findings are in agreement with those available in the literature [33, 34]. It is noted that the ferric-reducing antioxidant power of compounds may serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity, and it correlates with the results from other methods used to estimate antioxidant capacity [33, 35]. Also, the effect of the extraction solvent on polyphenol content varied depending on the solvent polarity and influenced the antioxidant activity [36, 37].

CONCLUSION

It was amazing to evaluate for the first time, to our knowledge, the antioxidant properties of methanolic and aqueous extracts of leaves and stems from *Marrubium deserti* and *Thymelaea microphylla* plants growing in the Algerian Sahara, comparing their total phenolic contents. Determined by the Folin-Ciocalteu method, they revealed that the leaf methanolic extracts have the highest phenolic content, followed by the other extracts. The results of investigation show the presence of feeble linear correlations between IC_{50} concentrations, the EC_{50} , as indicated by the DPPH test, and the total phenolic content of aqueous extracts, but no correlation with methanolic extracts. On the other hand, a positive relationship was established between IC_{50} and EC_{50} concentrations.

This data can be an effective introduction for a further phytochemical analysis with the aim to isolate and identify the individual phenolic compounds, in a way to study their antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*.

REFERENCES

- [1] Abdeljebbar, L.H., Humam, M., Amzazi, S., Hostettmann, K., Bekkouche, K., Christen, P., Benjouad, A. (2006). Analyse chimique et propriétés anticancéreuse et antifongique de *Withania adpressa* Coss. Congrès International de Biochimie, Agadir, Mai 9-12, pp 201-203.
- [2] Edeoga, H.O., Okwu, D.E., Mbaebie, B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 4, 685-688.
- [3] Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews, 56, 317-333.
- [4] Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cell: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacological Reviews, 52, 673-751.
- [5] Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascheiro, A., Stampfer, M.J., Willett, W.C. (1996). Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. Annals of Internal Medicine, 125, 384-389.
- [6] Halbrock, K., Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 40, 347-369.
- [7] Brzozowska, J., Hanower, P., Tanguy, J. (1973). Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. Phytochemistry, 12, 2353-2357.
- [8] Karioti, A., Skopeliti, M., Tsitsilonis, O., Heilmann, J., Skaltsa, H. 2007. Cytotoxicity and immunomodulating characteristics of labdane diterpenes from *Marrubium cylleneum* and *Marrubium velutinum*. Phytochemistry, 68, 1587-1594.
- [9] Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du Centre National de la recherche scientifique. Tome II.
- [10] Nawwar, M.A.M., El Mousallamy, A.M.D., Barakat, H.H., Buddrus, J., Linscheid, M. (1989). Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. Phytochemistry, 28, 3201-3206.
- [11] Hatam, N.A.R., Porzel, A., Seifert, K. (1995). Polyodonine, a pteridic labdane diterpene from *Marrubium polydon*. Phytochemistry, 40, 1575-1576.
- [12] Hannebelle, T., Sahpaz, S., Skaltsounis, A.L., Bailleul, F. (2007). Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. Biochemical Systematics and Ecology, 35, 624-626.
- [13] Karioti, A., Heilmann, J., Skaltsa, H. (2005). Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. Phytochemistry, 66, 1060-1066.
- [14] El Bardai S., Morel, N., Wibo, M., Fabre, N., Llabres, G., Lyoussi, B., Quetin-Leclercq, J. (2003). The Vasorelaxant Activity of Marrubenol and Marrubiin from *Marrubium vulgare*. Planta Med, 69, 75-77.
- [15] Cheriti, A., Sekkoum, K. (1995). Phytochemical investigation of *Thymelaea microphylla* growing in Algeria. Acta Chimica Slovenica, 42, 373-374.
- [16] Singleton, V.L., Rossi, J.A. Jr (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158.
- [17] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315.
- [18] Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture, 76, 270-276.

- [19] Shahidi, F., Wanasundara, P.K.J.P.D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- [20] Rastija, V., Medić-Šarić, M. (2009). QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 400-408
- [21] Alali, F.Q., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Nielsen, S.J., Wheaton, W.D., Falkinham, J.O., Oberlies, N.H. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Natural Product Research* 21, (12), 1121-1131
- [22] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- [23] Matkowski, A., Piotrowska, P. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77, 346-353.
- [24] Monar, A., Medić-Šarić, M., Jasprica, I. (2006). ADME Data for polyphenols characterized by reversed-phase thin-layer chromatography. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 19 (112), 409-417.
- [25] 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 Chemistry*, 105, 1126-1134.
- [26] Da Porto, C., Calligaris, S., Cellotti, E., Nicoli, M.C. (2000). Antiradical Properties of Commercial Cognacs Assessed by the DPPH Test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4241-4245.
- [27] Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Bento, A., Pereira, J. A. (2008). Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 41, 739-745.
- [28] Middleton, P., Stewart, F., Al-Qahtani, S., Egan, P., O'Rourke, C., Abdulrahman, A., et al. (2005). Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutiosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 81-86.
- [29] Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarikürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103, 816-822.
- [30] Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2157-2184.
- [31] Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104, 1372-1378.
- [32] Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200-213.
- [33] Wong, S.P., Leong, L.P., Koh, J. H. W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99, 775-783.
- [34] Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-3402
- [35] Yildirim, A., Oktay, M., Bilaloğlu, V. (2001). The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turkish Journal of Medical Science*, 31, 23-27.
- [36] Zhou, K., Yu, L. (2004). Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 37, 717-721.
- [37] Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Compte Rendu de Biologies*, 331, 865-873.

Received: February 19, 2009

Accepted: June 24, 2009

CORRESPONDING AUTHOR

Nabila Benhammou

Laboratory of Natural Products
Department of Molecular and Cellular Biology
Faculty of Science
University Abou Bekr Belkaid
LP 119 Imama, Tlemcen
ALGERIA

Phone: +213 0779665311

Fax: +213 43212145

E-mail: nabila.benhammou79@yahoo.fr

Full Length Research Paper

Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts

Nabila Benhammou^{1*} Fawzia Atik Bekkara¹ and Tatjana Kadifkova Panovska²

¹Laboratory of Natural Products, Department of Biology, Faculty of Science, University Abou Bekr Belkaid, LP 119, Imama, Tlemcen (Algeria).

²Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University St. Cyril and Methodius, 1000 Skopje, R. Macedonia.

Accepted 13 March 2008

The antimicrobial activity and antioxidant properties of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf (Anacardiaceae) leaves extracts were studied against eight bacteria, five moulds and yeast. A strong antifungal activity and a weak antibacterial activity were observed. They showed also a high reducing power capacity and a weak scavenging activity for superoxide anions (14.16 % for *P. lentiscus* and 19.3 % for *P. atlantica*).

Key words: *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica*, antimicrobial activity, antioxidant activity.

INTRODUCTION

Food safety and organoleptic preservation properties is a high topic for researcher and consumer. In a conventional way, chemical food additives, like preservatives and antioxidants, can be used. However, in the light of recent works, some of them as t-butylhydroxytoluene (BHT) or 4-hydroxyanisole (BHA) used to prevent oxidative rancidity of fats, are cause of concern (Safer et al., 1999). Several researches reported the extensive use of these additives in agro alimentary industry. In 12 foods of different categories, 133 food samples reveal the presence of BHT and TBHQ. The estimated daily intake (EDIs) of this antioxidant and BHA for average consumers ranged from 6.00 to 14.42% of the acceptable daily intake (ADI) of each antioxidant in Korea (Suh et al., 2005). In parallel, the increased consumption of the additives in software drinks to benzoates intake, nuts and canned juices to sulphites intake, bread and biscuits to BHA intake and chewing gum to BHT intake was also exposed by the Lebanese population. The ADI could be exceeded for sulphites and BHT by the children of 9 - 13 years old (Soubra et al., 2007). Restrictions on the use of these compounds are being imposed because of their carcinogenicity (Mahdavi and Salunkhe, 1995).

Currently, the research of natural antioxidants like alter-

native sources of synthesis antioxidants was emerged and the exploitation of the various secondary metabolites of the plant was highlighted in recent years. Thus, the phenolic compounds in particular the flavonoids have drawn attention as a potential source of bioactive molecules. Their flavan nucleus structure is linked to the antioxidant capacity. These substances are able to reduce free radicals like superoxide, peroxy, alkoxy and hydroxyl. The reduction occurs by hydrogen transfer reaction to the reactive oxygen species (ROS), (Jovanovic et al., 1994). Beside that direct scavenging effect, the mechanisms of action can include the inhibition of the enzymes and/or the chelation of the trace metal that catalyze the formation of ROS (Halliwell, 1994).

The resiniferous pistachio tree belongs to *Pistacia*, a genus of eleven species in the Anacardiaceae family distributed in the Mediterranean area. The leaves are alternate, pinnately compound, and can be either evergreen or deciduous depending on species (Quezel and Santa., 1963).

Pistacia lentiscus L (Mastic) is an evergreen shrub or small tree growing to 1 – 8 m tall (Iauk et al., 1996) with a long tradition in folk medicine since the ancients Greeks (Palevitch and Yaniv, 2000). The aerial part has traditionally been used as a stimulant, for its diuretic properties, and to treat hypertension, coughs, sore throats, eczema, stomach aches, kidney stones and jaundice (Bentley and Trimen, 1980; Palevitch and Yaniv, 2000).

The chemical composition of the essential oil of this

*Corresponding author: E-mail address: nabila.benhammou79@yahoo.fr.

plant reveals the presence of several main compounds: myrcene (19 - 25%), (Calabro and Curro, 1974; Boelens and Jimenez, 1991); α -pinene (16%), (Buil and Garner, 1975); terpinen-4-ol (22%), (Picci et al., 1987); δ -3-carene (65%), (De Pooter et al., 1991), myrcene, limonene, terpinen-4-ol, α -pinene, β -pinene, α -phellandrene, sabinene, *para*-cymene and γ -terpinene (Castola et al., 2000).

The aerial parts seem to have no or only a weak antimicrobial activity against the Gram (-) and Gram (+) bacteria (Bonsignore et al., 1998, Tassou and Nychas., 1995). The antifungal activity appears to be much more interesting against the clinical yeast (Iauk et al., 1996) and the pathogenic agricultural fungi (Kordali et al., 2003). The essential oil of the resin proved to be very active against micro-organisms and fungi, whereas the oils from the leaves and the twigs showed a moderate activity against the bacteria and was completely inactive against the fungi (Magiatis et al., 1999).

The antioxidant properties of the leaves phenolic compounds were reported: they act as a scavenger of the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Baratto et al., 2003; Benhammou et al., 2007; Gardeli et al., 2007). It was also shown that the presence of gallic acid and its derivative, the 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose in the fruits, play a protecting role against lipid peroxidation induced by H₂O₂ in K562 cell line (Abdelwahed et al., 2007). The Chios mastic gum (CMG) is also known to contain compounds that inhibit the proliferation and induce the death of HCT116 human colon cancer cells in vitro (Balan et al., 2007). The iron-induced lipid peroxidation in rat liver homogenates was suppressed by aqueous extracts, without affecting mitochondrial respiration in cultured HepG2 and PC12. This extract administered daily for 5 weeks to rats was shown to contain compound causing hepatotoxic effect (Ljubuncic et al., 2005 a, b).

In Algeria, the *Pistacia atlantica* (Betoum) is a tree which can reach 25 m in height. It is the most characteristic plant species of the pre-Saharan regions of the country (Yousfi et al., 2002). This plant has also been used for the treatment of peptic ulcer and as mouth freshener (Delazar et al., 2004). A reported hypoglycemic activity is probably in relation with its ability to inhibit the α -amylase activity (Hamdan and Afifi, 2004).

Various compounds were characterized: for instance, α -pinene in the essential oil has been recently reported (Delazar et al., 2004), as well as monoterpenes and oxygenated sesquiterpenes as terpinen-4-ol (21.7 %) or elemol (20%) (Barrero et al., 2005). On an ethnobotanical point of view, the oil from the fruit is used as an anti-diarrheal (Yousfi et al., 2002). This oil has good nutritive quality because of its content in unsaturated fatty acids (oleic + linoleic = 73%) and saturated fatty acids (palmitic + stearic = 25.8%) (Mensier, 1957; Yousfi et al., 2002). In comparison with *P. lentiscus*, there are few reports in the literature about the antioxidant properties of

P. atlantica for the DPPH (Benhammou et al., 2007).

The aim of this work was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of the ethanolic leaves extracts of *P. lentiscus* and *P. atlantica* from the region of Tlemcen (Algeria), in relation with the structure of their phenolic compounds.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The leaves of *P. lentiscus* (mastic tree) and *P. atlantica* (pistachio tree of the Atlas) were collected from the Oum El Alou and Ain Fezza stations, respectively, region (Algeria), in 2005. The leaves were air dried in a shadowy place, then ground into powder.

Preparation of the ethanolic extracts of *P. lentiscus* (EEPL) and *P. atlantica* (EEPA)

50 g of each plant material were macerated with 200 ml of 96.6% ethanol for 15 days. After filtration, the ethanolic solution was evaporated under reduced pressure at 70°C (Rotary evaporator-4000-efficient Laborota) to afford dark green, nearly odourless viscous material. The extraction yields were 13.53% (*P. atlantica* from Ain Fezza) and 12.64% (*P. lentiscus* from Oum El Alou), on the dry powder basis, and close to values (11.32 and 16.59%) reported elsewhere (Kordali et al., 2003). The residues were dissolved in 20 ml of methanol to give the ethanolic extract solutions of *Pistacia lentiscus* (EEPL) and of *Pistacia atlantica* (EEPA). Because the ethanolic extracts of *Pistacia vera*, *Pistacia terebinthus* and *P. lentiscus* leaves are known to be rich in phenolic compounds and it must be the same for our EEPL and EEPA.

Preparation of the fractions of extracts

For each plant, 50 g of the dried powder of the leaves was macerated with 150 ml of absolute ethanol for 6 days at room temperature. After filtration, the ethanolic extract was evaporated under reduced pressure at 70°C. The dry residue was treated with 50 ml of boiling water to dissolve the flavonoids. Further filtration through filter paper (Wattman N°1, Ø 13 cm, SELECTA, Germany), afforded the aqueous solution that was firstly extracted with 50 ml of ethyl acetate (Fraction 1), then with 50 ml of n-butanol (Fraction 2) (Bekkara et al., 1998). The various extracts were evaporated and each residue dissolved in 3 ml of methanol.

Chromatographic material

The various extracts from ethyl acetate and n-butanol were analyzed by thin layer chromatography (TLC). The analysis were performed either on silica gel (Silica Gel GF₂₅₄, Merck), with Chloroform / Methanol / Water / Acetic acid: (100 / 15 / 0.5 / 0.3) as eluent (Harbone and Williams, 1983), or polyamide (Polyamide-DC 6 UV₂₅₄, Macherey and Nagel) and n-butanol / Acetic acid / Water: (4 / 1 / 5) (Markham, 1982). Rutin, vanillic acid, *para*-coumaric acid, ferulic acid, dihydroquercetin, syringic acid, myricetin, resorcinol, hydroquinone, phloroglucinol, quercetagenin, gallic acid, pyrocatechol, were from Sarsyntex, (France).

Antimicrobial activity of the extracts

Strains tested

Gram negative: *Escherichia coli*: 5044172; *Klebsiella Pneumo*

Table 1. *In vitro* antibacterial activity of the extracts of *P. lentiscus* and *P. atlantica*.

Strains	Inhibition zone(mm)					
	EE of <i>P. lentiscus</i>		EE of <i>P. atlantica</i>		Control*	
	5µl	10µl	5µl	10µl	5µl	10µl
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.5	21.5	13.6	16.5	6.5	9
<i>Listeria monocytogenes</i>	11	10	8	9	0	7
<i>Klebsiella pneumoneae</i>	0	0	0	0	7	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.5	14.5	8.5	10.5	8	9.5
<i>Salmonella typhi</i>	11	25.5	10	21.5	7	13.3
<i>Proteus mirabilis</i>	9	13	8	10	7.5	9
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	9.5	7	7.5
<i>Enterobacter cloacea</i>	0	14.6	8	12	8	19
<i>Candida albicans</i>	12	23.5	15	23.5	0	11

*Control was determined in absence of ethanolic extract.

neae: 5215773; *Pseudomonas aeruginosa*: 22212004; *Salmonella typhi*: 4404540; *Enterobacter cloacea*: 1305573; *Proteus mirabilis*: 0536040.

Gram positive: *Listeria monocytogenes*: ATCC 19111; *Staphylococcus aureus*: ATCC 601 were from the Hospital of Tlemcen (Algeria).

Yeast: *Candida albicans*: 444.

Moulds: *Aspergillus flavus*; *Rhizopus stolonifer*; *Trichoderma sp*; *Fusarium sp*; *Aspergillus flavus*, reference 994294 [Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN) (France)]. Isolation from samples of cereals and identification were performed by the Laboratory of mycology, Department of biology, Tlemcen (Algeria).

Evaluation of the antibacterial activity

The disc diffusion method was used for the determination of the antibacterial activity (Gulluce et al., 2003). Sterile Discs, 6 mm in diameter (Wattman paper N°1 - SELECTA, Germany), impregnated with 5 and 10 µL of EEPL (0.316 g/mL) and EEPA (0.338 g/mL), were placed in Petri dishes on Mueller-Hinton agar, which had been surface spread with 1 mL of logarithmic phase bacteria adjusted to a 10⁸ UFC/mL fixed by the optical density (OD = 0.08 and 0.1) (Greisiele et al., 2003). The Petri dishes were then incubated for 18 h at 37°C. The diameter of the inhibition zone was measured to compare the *in vitro* antibacterial activity (Table 1).

Evaluation of the antifungal activity

The antifungal activity was determined following the method described by Chang et al. (1999, 2000). Various volumes (50, 100, 500 µL and 1 ml) of EEPL (0.316 g/mL) and EEPA (0.338 g/mL) were added to 20 mL of a solution of sterilized potato dextrose agar (PDA). The mixtures were cast on the Petri dish. Thereafter, a mycelial disc of approximately 5 mm in diameter, cut from the periphery of a 7 days old culture, was inoculated in the centre of each Petri dish, and then incubated at 25 ± 2°C. The diameters of growth of the hypha were recorded after 48 h and 96 h, respectively, for *Rhizopus stolonifer* and for the other moulds. The antifungal index was determined as follows:

$$\text{Antifungal index (I)} = \left(1 - \frac{D_a}{D_b}\right) \times 100$$

Where: D_a and D_b are the diameter of the growth zone in test and in control Petri dish (mm).

Antioxidant activity of the extracts

Reduction power of the ethanolic extracts

The reduction power (Oyaizu, 1986) was determined using various concentrations of EEPL and EEPA in distilled water (0.25; 0.5; 0.75; 1; 2; 3 mg/mL) and mixed with of a buffer phosphate solution (2.5 mL, 0.2 M; pH 6.6) and potassium ferricyanide (2.5 ml, 1% aqueous K₃Fe(CN)₆). The resulting solutions were incubated at 50°C for 20 min. Afterwards, trichloroacetic acid (2.5 mL, 10% in water) was added and centrifuged (3000 rpm) for 10 min. The supernatant phase (2.5 mL) was diluted with distilled water (2.5 ml) and FeCl₃ (0.5 ml, 0.1% in water) was added. The absorbance of the resulting solution was measured at 700 nm, using ascorbic acid as a positive control.

Superoxide anion scavenging activity

The method of Marklund (1974) modified by Ekanayake et al., (2004) was used in this test. The method is based on the inhibition of the autoxidation of pyrogallol by phenolic compounds. To the assay mixture composed of a phosphate buffer solution (2.6 ml, 50 mM in water, pH 8.22 ± 0.03) with the analytical sample extract (0.3 ml) was added a freshly prepared solution of pyrogallol (0.1 mL of a 3 mM solution of pyrogallol in 0.010 M HCl (CHEMINOVA, Madrid, Spain; 37.5 %). The autoxidation reaction rate of pyrogallol was determined at 325 nm by monitoring the absorbance every 30 s for a total period of 10 min, corresponding to the end of the reaction. The scavenging activity of the superoxide anion (O₂⁻) was calculated by the following formula (Sun et al., 2001):

$$S = \frac{(K_0 - K_1)}{K_0} \times 100$$

Where K₀ and K₁ are autoxidation rates of the pyrogallol without and with the leave extract, respectively.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with Origin 6 Professional program for superoxide anion scavenging assay, and with Microsoft

Table 2. Antifungal activity of the extracts of the leaves of *P. lentiscus* and *P. atlantica*

Extract	Quantity (µl)	<i>R. stolonifer</i>		<i>A. flavus</i>		<i>A. flavus</i> of reference		<i>Trichoderma</i> <i>sp</i>		<i>Fusarium sp</i>	
		G (mm)	I (%)	G (mm)	I (%)	G (mm)	I (%)	G (mm)	I (%)	G (mm)	I (%)
<i>P. lentiscus</i>	50	68.5	13.07	16.5	61.17	23	31.95	85	0	50	8.25
	100	63	14.63	19	59.66	17.5	40.27	85	0	49	10.09
	500	20.5	-64	16	71.53	16	45.20	12.5	84.70	34	24.44
	1000	9	-20	20	33.33	12	-71.42	9	48.57	21	28.81
<i>P. atlantica</i>	50	85	-7.86	52	-22.35	48.5	-43.5	85	0	55	-1
	100	85	-15.17	56	-18.9	32.5	-10.92	78.5	7.64	54	1
	500	21	-68	60	-6.76	49.5	-69.52	72	11.87	36	20
	1000	10	-33.3	33	-10	12.5	-78.57	27	-54.28	20	32.2
Control	50	78.8		42.5		33.8		85		54.5	
	100	73.8		47.1		29.3		85		54.5	
	500	12.5		56.2		29.2		29.2		45	
	1000	7.5		30		7		17.5		29.5	

G: Growth; I: antifungal index.

Control was determined in absence of ethanolic extract.

Office Excel 2003 for the other tests (ethanolic yield, antimicrobial activity and reduction power). The data obtained are means of two replicates along with standard deviations (SD).

RESULTS AND DISCUSSION

Identified compounds by the TLC

The antioxidant activity was studied on the ethanolic extract of leaves. The use of ethanol like solvent allows the extraction of phenolic compounds from the leaves of *Pistacia vera*, *Pistacia terebinthus* and *P. lentiscus*. The TLC analysis UV light, allowed the identification of a pattern of flavonols (yellow colours), phenolic acids (blue fluorescent), flavones (purple chestnut), anthocyanins (red colour) and gallic acid and the *para*-coumaric acid.

Few studies mention the analysis of phenolic compounds in *P. atlantica* and *P. lentiscus*. It has been shown that the Anacardiaceae family is characterized by the occurrence of both gallic acid and myricetin derivatives (Umadevi et al., 1988). Three major classes of the secondary metabolites were described for *P. lentiscus*: gallic acid and its derivatives with glucose and quinic acid; flavonol glycosides (myricetin and quercetin glycosides), and anthocyanins (delphinidin 3-O-glycoside and cyaniding 3-O-glucoside) by Romani et al. (2002). The abundance of the flavonoids glycosides was also noted in the aerial parts of *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *Pistacia vera*, *Pistacia chinensi* and *Pistacia khinjuk* (Kawashty et al., 2000). *Para*-coumaric acid was identified in the ethanolic leave extract of *P. lentiscus* and *P. atlantica*.

Antimicrobial activity

The antibacterial activity of the ethanolic extracts is

shown in the Table 1. In the present study, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* are not sensitive to the extracts of *P. lentiscus* and *P. atlantica*. The strains *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi* showed a sensitizing effect at the 5 µl level and a very significant effect at 10µl level.

The antifungal activity is reported in Table 2. The EEPL generally shows an inhibiting activity on all the tested strains, except for *R. stolonifer* and for *Aspergillus flavus* of reference at 1ml of extract. In parallel, no inhibiting activity was observed for EEPA. This result is in agreement with previously reported results (Iauk et al., 1996; Ali-Shtayeh and Abu Ghdeib, 1999).

It is worth to note that the flavonic extracts of *P. lentiscus* present an antifungal activity against yeasts and moulds and no antibacterial activity. The inhibition of growth of *Fusarium sp* varies between 8.25 to 28.81% for *P. lentiscus* and 20 to 32.20% for *P. atlantica* depending of the concentrations, as compared with *Fusarium sambucinum* (-175.6%) (Kordali et al., 2003).

Antioxidant activity

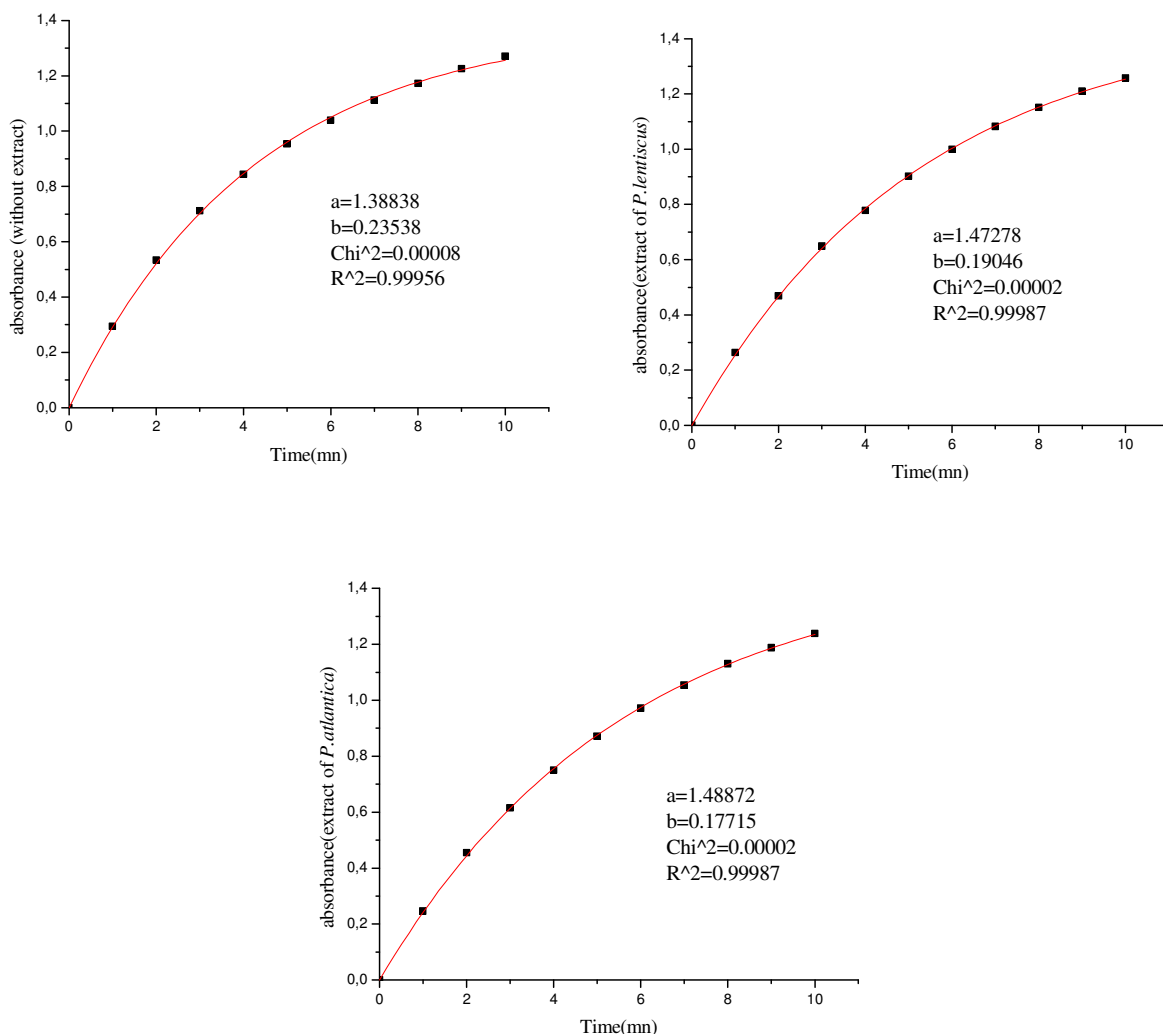
Reduction power

Several methods have been developed to measure the efficiency of dietary antioxidants. These methods are based on different kinds of defence systems: scavenging reactive oxygen species (ROS), hydroxyl radicals, reduction of lipid peroxy radicals, inhibition of the lipid peroxidation and chelating of the metal ions (Zhu et al., 2002). The reducing power based on the transformation of Fe³⁺ into Fe²⁺ in the presence of the extracts of *P. lentiscus* and *P. atlantica* is illustrated in Table 3.

Table 3. Reduction power of the extracts of the phenolic compounds of *P. lentiscus* and *P. atlantica*

Absorbance (700 nm)			
Concentrations (mg/ml)	EE of <i>P. atlantica</i>	EE of <i>P. lentiscus</i> acid	Ascorbic acid
0.25	1.089 ± 0.06	1.086 ± 0.11	1.405 ± 0.24
0.5	2.234 ± 0.12	2.011 ± 0.00	2.674 ± 0.003
0.75	2.418 ± 0.04	2.647 ± 0.00	2.705 ± 0.01
1	2.499 ± 0.00	2.715 ± 0.00	2.733 ± 0.009
2	2.513 ± 0.01	2.804 ± 0.00	2.781 ± 0.01
3	2.551 ± 0.001	2.862 ± 0.009	2.824 ± 0.02

Each value represents mean ± S.D (two repetitions).

**Figure 1.** Absorbance of superoxide anion scavenging by EEPL and EEPA versus time.

The reduction activity of EEPL and EEPA is generally proportional to the concentration (Gow-Chin and Pin-Der, 1993; Gow-Chin and Hui-Yin, 1995; Hadafi et al., 1998). In this work, the both extracts were characterized by a

high reduction power. The *P. lentiscus* show a potential reduction power than that of *P. atlantica*. At a concentration of 3 mg/mL, the reduction power of EEPL expressed an absorbance is close to values observed ascor-

Table 4. Estimate of the parameters of the model of Wallach et al. (1996).

Samples	Rate of oxidation	Correlation Coefficient (r^2)	Scavenging ability (S)(%)
Without extract	0.3267	0.9995	
EE of <i>P. lentiscus</i>	0.2805	0.9998	14.16
EE of <i>P. atlantica</i>	0.2637	0.9998	19.3

bic acid: 2.862 and 2.8245, respectively. The reduction power decreases inversely to the polarity of extraction solvent (Hadafi et al., 1998) and the capacity of reduction of a compound may serve as a significant indicator of its antioxidant potential (Mier et al., 1995).

Superoxide anion scavenging activity

Dioxygen form superoxide anions O_2^- by a single electron transfer during the pyrogallol autoxidation in basic solutions. The superoxide anions are scavenged by antioxidants and consequently, decrease the rate of pyrogallol autoxidation or even inhibit it. The ability of the phenolic compounds from the ethanolic extract to scavenge the superoxide anion was carried out using this pyrogallol autoxidation method. The results are reported in Figure 1. From these experiments, the both extracts are effective superoxide anions scavenger at a concentration as low as 0.0625 mg/ml.

Table 4 are reported the superoxide anion scavenger activities of EEPL and EEPA using the model of Wallach et al. (1996). The higher scavenging activity was observed for the EEPA (19.3%) as compared with EEPL (14.2%). This effect is probably related to the concentration and chemical structures of the phenolic compounds extracted, particularly for the flavonoids. It was reported that the galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* L. leaves such as gallic acid, 5-*O*-galloyl, 3,5-*O*-digalloyl, 3,4,5-*O*-trigalloyl quinic acid derivatives is responsible for the scavenger activities against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, superoxide anion (O_2^-) and hydroxyl (OH^\cdot) radical. The scavenging activity is known to increase with the number of galloyl groups on the quinic acid skeleton (Baratto et al., 2003).

Conclusion

According to the results, it may be concluded that the extracts of the phenolic compounds of *P. lentiscus* and *P. atlantica* revealed considerable antimicrobial activity in particular antifungal activity. Furthermore, the examined extracts have a high reducing activity and scavenging activity for the superoxide anion in vitro. These activities were found are probably in relationship with the structure of the phenolic compounds. In this study, gallic acid and *para*-coumaric acid were identified by TLC. Therefore, further work should be performed to fully evaluate on the pharmacological activity of these extracts against the

lesions of arteriosclerosis, the coronary disease inducing by the oxidation of the LDL and why not cancer while exploiting on animal models.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Mr. Pr. Jean-Marie Coustard, laboratory of "Synthesis and Reactivity of Natural Substances, UMR 6514, University of Poitiers, France, and Mr. Pr. Václav Šutiak, University of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology, Slovak Republic, Central Europe, for their useful recommendations, for critical reading and correction of the manuscript.

REFERENCES

- Abdelwahed A, Bouhlel I, Skandrani I, Valenti K, Kadri M, Guiraud P, Steiman R, Mariotte AM, Ghedira K, Laporte F, Dijoux-Franca MG, Chekir-Ghedira L (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions* 165: 1–13.
- Ali-Shtayah MS, Abu Ghdeib SI (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses* 42: 665-672.
- Balan KV, Prince J, Han Z, Dimas K, Cladaras M, Wyche GH, Sitaras NM, Pantazis P (2007). Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *PhytoMed* 14: 263–272.
- Baratto MC, Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Romani A, Visioli F, Basosi R, Pogni R (2003). Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *Pistacia lentiscus* leaves. *Free Rad. Res.* 37(4): 405-412.
- Barrero AF, Herrador MM, Arteaga JF, Akssira M, Mellouki F, Belgarrabe A, Blazquez MA (2005). Chemical composition of the essential oils of *Pistacia atlantica* Desf. *JEOR* 17(1): 52-54.
- Bekkara F, Jay M, Viricel MR (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil* 203: 27-36.
- Benhammou N, Atik Bekkara F, Kadifkova Panovska T (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L and *Pistacia atlantica* Desf. *Adv Food Sci*, 29(3): 155-16.
- Bentley RY, Trimen H (1980). Medicinal plants. In Gardeli et al. (eds) *Essential oil composition of Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem.* pp. 1-11.
- Boelens MH, Jimenez R (1991). Chemical composition of the essential oil from the gum and from various parts of *Pistacia lentiscus* L. (Mastic gum tree). *Flav. Fragr J.* 6: 271-275.
- Bonsignore L, Cottiglia F, Loy G (1998). Antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* aerial parts. *Fitoterapia*. LXIX (6): 537-538.
- Buil P, Garnerio J, Guichard G (1975). Contribution à la connaissance de la composition chimique de l'essence de lentisque de Provence. *Riv. Ital. EPPOS Cosmet. Aerosol.* 56 : 245-252.
- Calabro G, Curro P (1974). Costituenti degli oli essenziali Nota IV.

- Essenza di lentisco. Essence Deriv. Agrum. 44: 82-92.
- Castola V, Bighelli A, Casanova J (2000). Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 79-88.
- Chang ST, Wang SY, Wu CL, Chen PF, Kuo YH (2000). Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from Taiwan (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforchung* 54: 241-245.
- Chang ST, Wang SY, Wu CL, Su YC, Kuo YH. (1999). Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwan (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforchung*. 53: 487-490.
- Delazar A, Reid RG, Sarker SD (2004). GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *Mutica*. *Chem. Nat. Compd.* 40 (1): 24-27.
- De Pooter HL, Schamp N.M, Aboutabl EA, El Tohamy SF, Doss SL (1991). Essential oils from the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt. *Flav. Fragr J.* 6: 229-232.
- Ekanayake P, Lee, YD, Lee J (2004). Antioxidant activity of flesh and skin of *Eptatretus burgeri* (Hag Fish) and *Enedrias nebulosus* (White spotted Eel). *Food Sci. Tech. Int.* 10 (3): 0171-7.
- Gardeli C, Papageorgiou V, Mallouchos A, Theodosis K, Komaitis M (2007). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem.* pp. 1-11.
- Gow-Chin Y, Hui-Yin Chen. (1995). Antioxidative activity of various tea extracts in relation to their antamutagenicity. *J. Agri. Food Chem.* 43: 27-32.
- Gow-Chin Y, Pin-Der Duh (1993). Antioxidative properties of methanolic extracts from *Peanus Hulls*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70 (4): 383-386.
- Gulluce M, Sokmen M, Daferera D, Agar G, Ozkan H, Kartal N, Polissiou M, Sokmen A, Sahin F (2003). In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agr. Food Chem.* 51: 3958-3965.
- Greisiele LP, Benedito PDF, Celso VN, Diógenes Aparício GC. (2003). Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *palescens* (C. DC.) Yunck. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 98(8): 1115-1120.
- Hadafi A, Ismaili Alaoui M, Chaouch A, Zrira S, Benjilli B (1998). Activité antioxydante des extraits du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) et du myrte (*Myrtus communis*). 2 : Effet du solvant d'extraction. 17eme Journées Internationales Huiles Essentielles Digne Les Bains.
- Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 52: 253-265.
- Hamdan II, Afifi FU (2004). Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 93: 117-121.
- Harbone JB, Williams CA (1983). Flavonoids in the seeds of *Argemone mexicana*: a reappraisal. *Phytochemistry* 22 (6): 1520-1521.
- Iauk L, Ragusa S, Rapisarda A, Franco S, Nicolosi VM (1996). In vitro antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts: Preliminary report. *J. Chemother.* 8 (3): 207-209.
- Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. (1994). Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 4846-4851.
- Kawashty SA, Mosharrafa SAM, El-Gibali M, Saleh, NAM. (2000). The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 915-917.
- Kordali S, Cakir A, Zengin H, Duru ME (2003). Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia* 74: 164-167.
- Ljubuncic P, Cogan U, Portnaya I, Azaizeh H, Said O, Bomzon A (2005). Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *J. Ethnopharmacol.* 99: 43-47.
- Ljubuncic P, Songa H, Cogan U, Azaizeh H, Bomzona A (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *J. Ethnopharmacol.* 100: 198-204.
- Magiatis P, Melliou E, Skaltsound AL, Chinou IB, Mitaku S (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Plant Med.* 65: 749-752.
- Mahdavi DL, Salunkhe DK (1995). Toxicological aspects of food antioxidant. In Goli et al. (eds) *Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistacia vera) hull extracts*. *Food Chem.* pp. 521-525.
- Markham KR (1982). Techniques of flavonoid identification. *Biological Techniques Series*. Series editors: JE Treheme, PH Rubery. Academic Press, London-New York. pp. 22-23.
- Marklund S, Marklund G (1974). Involvement of superoxide anion radical in auto-oxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474.
- Mensier PH (1957). Encyclopédie biologique " Dictionnaire des Huiles Vegetales" T II, Edit Paul Lechevalier. In Benhassaini et al. (eds) *The chemical composition of fruits of Pistacia atlantica* Desf. Subsp. *atlantica* from Algeria, *Chem. Nat. Compd.* pp. 121-124.
- Mier S, Kaner J, Akiri B, Hadas SP (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defence systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1813-1817.
- Oyaizu M (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315.
- Palevitch D, Yaniv Z (2000). Medicinal Plants of the Holy Land. Modan Publishing House, Tel Aviv, Israel. In Ljubuncic et al. (eds) *The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *J. Ethnopharmacol* pp. 198-204.
- Picci V, Scotti A, Mariani M, Colombo E (1987). Composition of the volatile oil of *Pistacia lentiscus* L. of Sardinian Origin. In Martens et al (eds.), *Flavour Science and Technology*. Wiley, New York. pp. 107-110.
- Quezel P, Santa S (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du Centre National de la recherche scientifique. Tome II. Ed. CNRS, Paris.
- Romani A, Pinelli P, Galardi C, Mulinacci N, Tattini M (2002). Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem. Anal.* 13: 79-86.
- Safer AM, Al-Nughamish AJ (1999). Hepatotoxicity induced by the antioxidant food additive butylated hydroxytoluene (BHT) in rats: An electron microscopical study. *Histol Histopathol.* 197: 391-406.
- Soubra L, Sarkis D, Hilan C, Verger Ph (2007). Dietary exposure of children and teenagers to benzoates, sulphites, butylhydroxyanisole (BHA) and butylhydroxytoluene (BHT) in Beirut (Lebanon). *Regul. Toxicol. Pharm.* 47(1): 68-77.
- Suh HJ, Chung MS, Cho YH, Kim JW, Kim DH, Han KW, Kim CJ (2005). Estimated daily intakes of butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tert-butyl hydroquinone (TBHQ) antioxidants in Korea. *Food Addit. Contam.* 22 (12): 1176-1188.
- Sun T, Jia ZS, Chen WX, Jin YX, De Xu Z (2001). Active oxygen radical scavenging ability of Water-Soluble β -Alanine C60 adducts. *Chin. Chem. Lett.* 12 (11): 997-1000.
- Tassou CC, Nychas GJE (1995). Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 41:1-420.
- Umadevi I, Daniel M, Sabnis SD (1988). Chemotaxonomic studies on some members of Anacardiaceae. *Proc. Ind. Acad. Sci. Plant Sci.* 98: 205-208.
- Wallach J, Schwartz-Cavrilovic C, Maginot MJ, Cavrilovic M (1996). Manipulations d'analyse biochimique, 3^{ème} Edition, Doin, pp. 224-228-353-354.
- Yousfi M, Nadjemi B, Bellal R, Ben Bertal D, Palla G (2002). Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil. *JAOCS*, 79 (10): 1049-1050.
- Zhu QY, Hackman RM, Ensunsa JL (2002). Antioxidative activities of Oolong tea. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6929-6934.

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE ESSENTIAL OIL AND ETHANOLIC EXTRACT OF *Inula viscosa* FROM THE TLEMCEM REGION OF ALGERIA

Fawzia Atik Bekkara¹, Nabila Benhammou^{1*} and Tatjana Kadifkova Panovska²

¹ Laboratory of the Natural Products, Department of Biology, Faculty of Science, University Abou Bekr Belkaid, LP 119, Imama, Tlemcen, Algeria

² Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

ABSTRACT

Inula viscosa is a medicinal plant used for certain therapeutic treatments. In this work the antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and ethanolic extract of this plant were examined.

The activity of these extracts was tested against 8 bacteria, as well as 5 moulds and yeasts. They presented a weak antibacterial capacity. The antifungal activity of the essential oil is higher than that of the ethanolic extract, with an inhibition ranging from 56.75% to 84.11%. The antioxidant activity of the essential oil was evaluated with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical scavenging method. Tests of the activity of the ethanolic extract were carried out using three methods: reducing power, superoxide anion scavenging assay and DPPH[•] radical scavenging test. These tests revealed that the essential oil has a weak antiradical capacity. The ethanolic extract possessed a weak reducing power and superoxide anion scavenging activity, but a strong inhibition of DPPH[•] radical.

KEYWORDS: *Inula viscosa*, essential oil, phenolic compounds, antioxidant activity.

INTRODUCTION

In accordance with the research on natural antibiotics and antioxidants, it was necessary to develop certain natural substances or secondary metabolites, and to evaluate their biological properties. A medicinal plant grown in Algeria was selected for this study.

Inula viscosa (L) [synonym: *Cupularia viscosa* or *Ditrichia viscosa* (L)] Greuter [1, 2] is an annual, herbaceous, long-living, viscus and glandulous plant, with strong odour, belonging to the Asteraceae family (Compositae). It is widespread in North Algeria. The leaves of the plants are often used by the natives to treat wounds.

This plant is known as a traditional medication, but there is a great diversity in its use [3]. In the Mediterranean region, it is used to heal inflammations [4], diabetes [5] and as antipyretic or disinfectant [6]. In Spain, *I. viscosa* is used to treat gastro-duodenal disorder [7]. In Jordan, *I. viscosa* is used to treat bronchitis, tuberculosis and, in the form of cataplasm, for rheumatics, expectorant, and diuretic [8]. It is also prescribed as an abortion inductor and against sterility of female rats [8, 9]. The anti-jaundice and powerful disinfectant effects on wounds were discovered by Font Quer in 1973 [10]. An antiulcerogenic effect is probably due to the flavonic contents of *I. viscosa* [7]. The extracts and the essential oil of *I. viscosa* show an antifungal activity against both dermatophytes and *Candida* spp. [11]. Abu Zarga *et al.* [1, 2] identified the presence of sesquiterpenoids in the essential oil of *I. viscosa* from the Jordanian area. Oksus [12] identified three flavonic compounds in the flowers of *I. viscosa* (3-methoxyquercetin-7-glucoside, 3-methoxyquercetin and quercetin-3-methoxyquercetin-7-glucoside). Costa *et al.* [13] identified hesperetin, naringenin, naringin and quercetin in extracts of *I. viscosa*.

The aim of this study is to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and ethanolic extract of this plant collected from Tlemcen area.

MATERIALS AND METHODS

Plant collection

I. viscosa was collected in November 2005 from Sidna Youchaa in Tlemcen region (situated in Algeria) (longitude 1°23' W, latitude 35°05' N, altitude 40 m). Voucher specimens of the collected plants were confirmed and deposited at the herbarium of the Department of Biology, Laboratory "Natural Products".

Extraction of essential oil

Essential oil was obtained from the aerial parts (leaves and flowers) of the plant by steam distillation for 2 h and

half a min. The oil was dried and stored in the refrigerator (4 °C).

Preparation of plant extract

The aerial part used for the extraction was air-dried. A quantity of 50 g was placed in an Erlenmeyer flask with 200 mL 96.6% ethanol, for 15 days. After filtration, the ethanol was evaporated under reduced pressure (4000-efficient Laborota evaporator) at 70 °C. The dry residue was dissolved in a few mL of methanol [14].

Estimation of total phenolic compounds

The quantity of total phenolic content in the ethanolic extract of *I. viscosa* was determined by the procedure of "Folin-Ciocalteu" [15]. In a test tube, 200 µL of the extract was mixed with 1 mL of 10-fold diluted Folin-Ciocalteu and 0.8 mL of 7.5% sodium carbonate solution. After 30 min of incubation, the absorbance was measured at 765 nm using a Jenway 6405 UV/VIS spectrophotometer. A calibration curve was made with various pyrocatechol concentrations.

The total phenolic content was expressed in mg equivalents of pyrocatechol per g of ethanolic extract.

Antimicrobial activity

Microorganisms tested

The isolated bacterial strains used for this study originated from the hospital of Tlemcen.

Gram-negative bacteria: *Escherichia coli*: 5044172; *Klebsiella pneumoniae*: 5215773; *Pseudomonas aeruginosa*: 22212004; *Salmonella typhi*: 4404540; *Enterobacter cloacae*: 1305573; *Proteus mirabilis*: 0536040.

Gram-positive bacteria: *Listeria monocytogenes*: ATCC 19111; *Staphylococcus aureus*: ATCC 601.

The yeast, *Candida albicans*: 444, was isolated by the Laboratory of Mycology, Department of Biology.

The moulds *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma* sp., and *Fusarium* sp. were isolated from cereals by Dr. Larbi Belyagoubi and identified by Dr Abdallah Moussaoui at the Laboratory of Mycology, Department of Biology.

Aspergillus flavus: 994294 was obtained from the National Museum of Natural History (MNHN), France.

Evaluation of the antibacterial activity

The Disc diffusion assay was used for the determination of antibacterial activity of the essential oil and extracts [16]. A suspension of the microorganisms to be tested (1 mL of suspension at 10^8 cells mL⁻¹) was spread on the Mueller-Hinton agar media plates. Whatman filter paper discs (6 mm in diameter) were impregnated with 2 µL or 5 µL of the neat essential oil, and 5 µL or 10 µL of the ethanolic extract (diluted with methanol), and then placed on the inoculated plates. After 18 hours of incubation at 37 °C, the diameters of inhibition zones were measured in mm.

The quantity of inoculums was fixed by the measurement of the optical density (OD) between 0.08-0.1 [17]. Each experiment was repeated twice.

Evaluation of the antifungal activity

The determination of the antifungal capacity was evaluated with the technique described by Chang *et al.* [18, 19]. The quantities of essential oils (100 and 200 µL) and ethanolic extracts (50, 100, 500 µL and 1 mL) were added to 20 mL of sterilized potato dextrose agar (PDA). The mixtures were applied on Petri plates. A mycelium disc of approximately 5 mm in diameter, cut from the periphery of a 7-days old culture, was inoculated in the centre of each Petri plate, which was then incubated at 25 ± 2 °C. The diameters of hyphen growth were compared to that of the control by applying the following formula:

$$\text{Antifungal index (I)} = \left(1 - \frac{D_a}{D_b}\right) \times 100 \quad [18, 19]$$

where D_a was the diameter of growth of plate treated (mm), and D_b that of growth of control (mm).

The observations of the effects were recorded on the 8th day for essential oils, and after 48-96 h for ethanolic extracts.

Antioxidant activity

Evaluation of the antiradical activity of essential oil

The radical scavenging activity was determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]) by Mellor and Tappel method [20]. The 100 µM solution of DPPH[•] was prepared by dissolving 2 mg powder in 50 mL ethanol. To 2 mL of the ethanolic solution of DPPH[•] were added 100 µL of a methanolic solution of the antioxidant references (Trolox, ascorbic acid) at different concentrations.

The essential oil was prepared by the same method. The control, without antioxidant, was prepared with DPPH[•] ethanolic solution containing 100 µL of methanol.

The decrease in the absorbance was measured spectrophotometrically (Jenway.6405 UV/VIS) at 517 nm after 30 min incubation at room temperature.

The percentages of inhibition were calculated by using the following formula [21]:

$$\text{SC (\%)} = \left\{ \frac{\text{Absorbance (control)} - \text{Absorbance (antioxidant)}}{\text{Absorbance (control)}} \right\} \times 100$$

Measurements were performed in triplicate and the concentration required for 50% reduction (SC₅₀) was determined graphically.

Evaluation of the antioxidant activity of ethanolic extracts

Determination of reducing power

The reducing power of the extract was determined according to the method of Oyaizu [22]. Extracts (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, and 3 mg) in 1 mL of distilled water were mixed with 2.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆] (1 %), and then the mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Afterwards, 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged at 3000 turns for 10 min. Finally, 2.5% of upper layer solution was mixed with 2.5% of distilled water and 0.5 mL FeCl₃ (0.1 %).

Increased absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing power. The ascorbic acid was used like a positive control.

Determination of superoxide anion scavenging

The modified method of Markulund and Markulund [23], based on the inhibition of pyrogallol auto-oxidation, was used. The assay mixture contained 2.6 mL phosphate buffer (50 mM, pH 8.22 ± 0.03) and 0.3 mL of sample extract. The reaction was initiated by the addition of freshly prepared 0.1 mL of pyrogallol (3 mM pyrogallol in 10 mM HCl). Auto-oxidation of pyrogallol was measured at 325 nm. The absorbance of extract was recorded every 30 seconds for 10 min to reach the maximum inhibition point of the reaction.

The scavenging activity was calculated as inhibition rate of pyrogallol auto-oxidation using the following formula [24]:

$$S = \frac{(K_0 - K_1)}{K_0} \times 100$$

where K_0 is the rate of auto-oxidation of pyrogallol without extract, and K_1 that of the oxidation of pyrogallol in the presence of the extract.

Determination of DPPH• radical scavenging

The effect of extract on DPPH• was estimated according to the procedure described by Sanchez-Moreno *et al.* [25]. Aliquots (0.1 mL) of various concentrations of extract expressed as g L⁻¹ were added to 3.9 mL of DPPH•. Absorbance at 515 nm was measured at different time intervals (in seconds) until the reaction reached a plate. The DPPH• concentration was calculated from a calibration curve:

$$A_{515\text{nm}} = 23 \times [\text{DPPH}]_t \quad R_2 = 0.997$$

The percentage of the remaining DPPH• (% DPPH_{REM}) at the steady state was determined as follows:

$$\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_t / [\text{DPPH}]_{t=0}$$

where $[\text{DPPH}]_{t=0}$ represented the initial concentration of the stable radical without extract, and $[\text{DPPH}]_t$ the

concentration of the radical remaining in reaction mixture on the level of the plate.

The percentages of the remaining DPPH• against the concentrations of the samples were evaluated to obtain the quantity of antioxidant activity necessary to decrease initial DPPH• to 50% (EC₅₀). It was expressed as mg of dry extract compared to g DPPH in the reaction medium. The time necessary to reach this value was noted as T_{EC50} [25].

Antiradical efficiency (AE) was calculated by the following formula:

$$AE = 1 / EC_{50} \times T_{EC50}$$

The percentage of inhibition of radical DPPH• by the ethanolic extract was calculated from the formula of Yen and Duh [26]:

$$\% \text{Inhibition} = \left[\frac{(A_{C(0)} - A_{\text{Sample}(t)})}{A_{C(0)}} \right] \times 100$$

where $A_{C(0)}$ represents the absorbance of control with $t=0$, $A_{\text{Sample}(t)}$ that in the presence of antioxidants at a time t , which depends on concentrations.

RESULTS AND DISCUSSION

Antimicrobial activity

Evaluation of the antibacterial activity

The results of the antibacterial activity of the essential oil and the ethanolic extract obtained are illustrated in Tables 1 and 2.

The essential oil *in toto* did not show any activity against Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*), but showed little activity against positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*). *Salmonella typhi* showed a moderate sensitivity at 2 µL (11 mm), and diameters of zone of inhibition may reach 14.5 mm at 5 µL (Table 1).

TABLE 1 - Antibacterial activity [zones of inhibition (mm)] of essential oil against bacterial strains tested and *Candida albicans*, based on disc diffusion method.

Microorganisms tested	Essential oil		Negative control
	2 µL	5 µL	
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	10.5	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	11	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	++
<i>Salmonella typhi</i>	11	14.5	++
<i>Proteus mirabilis</i>	7	8.5	++
<i>Escherichia coli</i>	0	0	++
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	++
<i>Candida albicans</i>	7	7.5	++

TABLE 2 - Antibacterial activity [zones of inhibition (mm)] of extract against bacterial strains tested and *Candida albicans*, based on disc diffusion method.

Microorganisms tested	Ethanol extract		Negative control (Methanol)	
	5 µL	10 µL	5 µL	10 µL
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	14	6.5	9
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	9.5	0	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	9.5	7	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	1	8	9.5
<i>Salmonella typhi</i>	9.5	19.3	7	13.3
<i>Proteus mirabilis</i>	7	11.6	7.5	9
<i>Escherichia coli</i>	0	7	7	7.5
<i>Enterobacter cloacea</i>	8	11.3	8	19
<i>Candida albicans</i>	9.6	11.6	0	11

On the other side, the ethanolic extracts have no activity on all the tested bacterial strains (Table 2). It is interesting to note that essential oil reveals a weak antibacterial activity. Generally, Gram-positive bacteria seem to be more sensitive to essential oils than Gram-negative ones [27]. This activity may be due to the presence of phenols [28].

Evaluation of the antifungal activity

The antifungal activity of the tested essential oil-and ethanolic extract against the examined 5 strains of moulds is shown in Tables 3 and 4.

The inhibiting activity of the essential oil was significant. The percentages of inhibition exceeded 50% in all tested strains. It varied between 56.75 % for *A. flavus* and 84.11% for *R. stolonifer* at 200 µL (Table 3), whereas the extracts of the phenolic compounds showed an inhibiting activity for all strains with different concentrations, except that of *R. stolonifer* and *A. flavus*. The antifungal index reached the maximum with 500 µL for the strains *A. flavus* of reference (45.20 %), *A. flavus* (70.64 %) and *Trichoderma* sp. (75.52 %). For *Fusarium* sp., the results showed that the increase in ethanolic extract concentration was proportional to the increase of the antifungal index.

TABLE 3 - Growth inhibition of fungal species by essential oil of *I. viscosa*.

Essential oil	(µl)	<i>R. stolonifer</i> ^a		<i>A. flavus</i> ^c		<i>A. flavus</i> of reference		<i>Trichoderma</i> sp. ^b		<i>Fusarium</i> sp. ^b	
		T (mm)	I (%)	T (mm)	I (%)	T (mm)	I (%)	T (mm)	I (%)	T (mm)	I (%)
		100	16.5	80.58	43	39.43	23.5	57.65	20.5	75.15	34.5
200	13.5	84.11	28	60.56	24	56.75	15.5	81.21	29	65.88	
Control		85		71		55.5		82.5		85	

^a After 48 hours of inoculation; ^b after 7 days of inoculation; ^c after 8 days of inoculation; T: Treated; I: Inhibition

TABLE 4 - Growth inhibition of fungal species by ethanolic extract of *I. viscosa*.

Fungal species	µl	Ethanolic extract		Control	
		Treated (mm)	Inhibition (%)	Treated (mm)	Inhibition (%)
<i>R. stolonifer</i>	50	85	-7.86	78.8	-
	100	75	-1.62	73.8	-
	500	17	-36	12.5	-
	1000	6	-20	7.5	-
<i>A. flavus</i>	50			42.5	-
	100	45	4.45	47.1	-
	500	16.5	70.64	56.2	-
	1000	11	63.33	30	-
<i>A. flavus</i> of reference	50	24.5	27.51	33.8	-
	100	27	7.85	29.3	-
	500	16	45.20	29.2	-
	1000	11.5	-64.28	7	-
<i>Trichoderma</i> sp	50	67.5	20.58	85	-
	100	65	23.53	85	-
	500	20	75.52	81.7	-
	1000	6	65.71	17.5	-
<i>Fusarium</i> sp	50	43.5	20.18	54.5	-
	100	38.5	29.35	54.5	-
	500	20	55.55	45	-
	1000	9	69.5	29.5	-

The inhibiting activity of the ethanolic extract on the growth of *Candida albicans* was also deferred by Maoz and Neeman [29]. The aqueous extracts of the leaves have an antifungal activity against dermatophytes (*Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton terrestre*) [11, 29]. The rate of inhibition of mycelial growth can reach 100% for *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*.

The qualitative and quantitative analysis of essential oil by CPG/SM confirmed that antifungal activity is due to the high concentration of sesquiterpenes, particularly that of carboxydeudesmadiene, in this plant's leaves [11]. Other authors suggested that the aqueous extracts of the air parts (leaves, fruits and the flowers) of *I. viscosa* have antifungal activity with the percentage of inhibition higher than 90 % against the dermatophytes *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton violaceum* [30]. These activities were due to the presence of the various groups of flavonoides (isoquercetin, quercetin, apigenin, isoramnetin, naringenin, caffeic and chlorogenic acids) [31].

Antioxidant activity

Antiradical activity of essential oil

The obtained concentrations SC_{50} are:

SC_{50} (Trolox): 0.077 mg mL⁻¹ mL⁻¹

SC_{50} (Essential oil): 196.73 mg mL⁻¹

The antiradical activity of the essential oil is weak compared to that of the commercial antioxidants, Trolox and ascorbic acid. Its combination with both antimicrobial and antifungal activity could explain the interesting effect in agro-alimentary industry on the treatment of cereals against the moulds of deteriorations.

Antioxidant activity of the ethanolic extract

The antioxidant activity *in vitro* was evaluated by:

Reducing power

Figure 1 reveals that the reducing power of extract increased with increasing the amount of the sample. This result was confirmed by several authors [32]. In addition, the extract showed a weaker reducing power activity compared to the control.

Superoxide anion scavenging

Superoxide anion is a free radical which plays an important role in the formation of other reactive oxygen compounds, such as hydrogen peroxide, hydroxyl radicals or singlet oxygen in living systems [33]. It can also react with nitric oxide to generate the peroxy nitrite, which turns to toxic compounds like the hydroxyl radical and nitric dioxide [34]. The scavenging capacity of the extract of the phenolic compounds toward superoxide anion radicals was carried out by using the system of pyrogallol auto-oxidation.

The results obtained are illustrated in Figure 2.

The exponential model of Wallach *et al.* [35] was selected to adjust the data, and to calculate the rate of pyrogallol auto-oxidation (absorbance min⁻¹). The decrease of absorbance at 325 nm with antioxidant thus indicates the consumption of superoxide anion in the reaction mixture. The ethanolic extract showed the superoxide radical scavenging activity which was equal to 14.28% at very low concentration (62.5 µg mL⁻¹). The oxidation speed of samples with extract and those without extracts were 0.280 and 0.326, respectively.

DPPH[•] radical scavenging

The results of the antioxidant activity expressed as percentage of inhibition are illustrated in Table 5.

The ability to fade the methanolic solutions of DPPH[•] was noticed in all the samples tested. The extract of *I. viscosa* presented a lower percentage (36.44 %) than that of

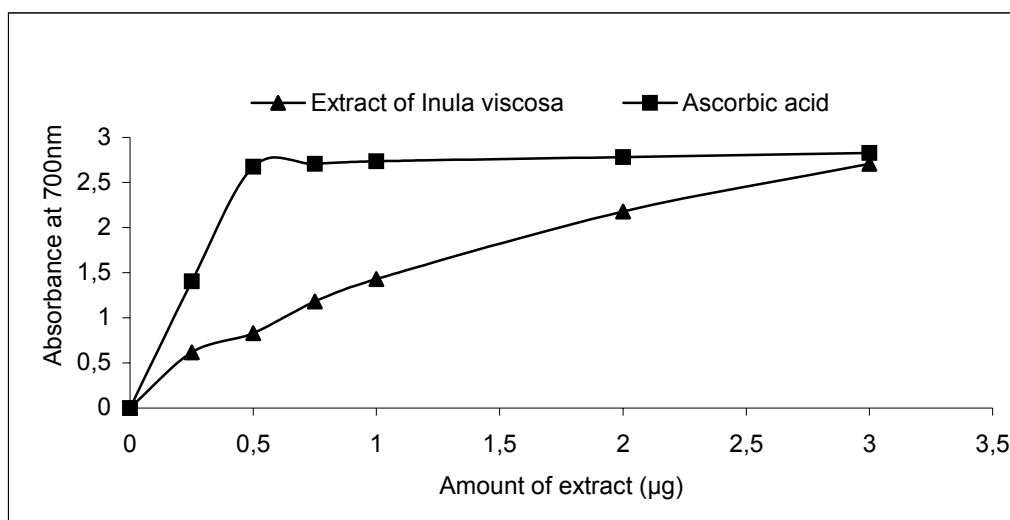


FIGURE 1 - Reducing power of the ethanolic extract of *I. viscosa*.

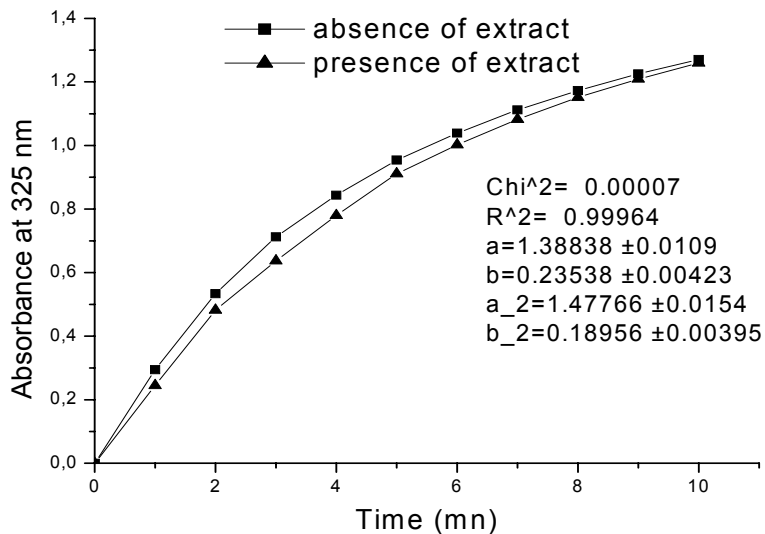


FIGURE 2 - Kinetics of the superoxide anions scavenging obtained by the inhibition of pyrogallol oxidation with extracts of *I. viscosa*.

TABLE 5 - Antioxidant activity of ethanolic extract of *I. viscosa*.

Concentrations (g L ⁻¹)	Ethanolic extract	Trolox	Ascorbic acid
0.062	-	-	50.62
0.12	-	-	56.37
0.14	-	-	52.24
0.19	-	-	72.53
0.22	-	-	92.01
0.24	-	-	92.28
0.25	-	73.07	-
0.5	36.44	94.97	-
1	68.99	95.24	-
2	93.71	95.78	-
3	93.89	95.69	-

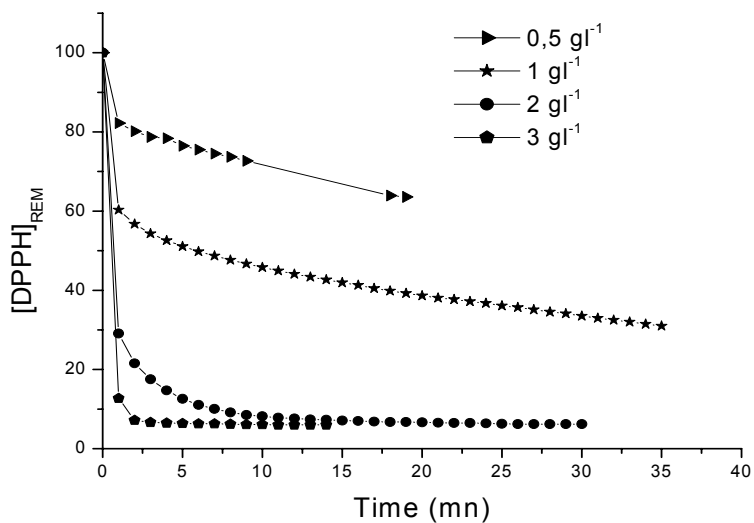


FIGURE 3 - Fraction of plotted DPPH* remaining versus time for different concentrations of *I. viscosa* extracts.

TABLE 6 - Yield and total phenolic content in the ethanolic extract.

Vegetable material	Origin	Ethanolic extract (g)	Yield (%)	Total phenolic content (mg g ⁻¹)
<i>Inula viscosa</i>	Sidna Youchaa, Algeria	2.745 ± 0.38	5.49 ± 0.77	1.85 ± 0.09

Trolox (94.97 %) at 0.5 g L⁻¹. This value increased according to the concentration, and reached 93.89 % at 3 g L⁻¹. The ascorbic acid had a raised activity about 92.28 % at 0.24 g L⁻¹ level [36].

The reduction in the absorbance of the DPPH[•] radical, which corresponds to the reduction in the percentage of DPPH[•] remaining at the stationary phase, was explained by its reduction in the presence of the extracts or controls as function of time (Figure 3)

The EC₅₀ concentration of *I. viscosa* extract was equal to 220.35 mg g⁻¹ DPPH[•], compared to ascorbic acid (39.53 mg g⁻¹ DPPH[•]) and Trolox (49.21 mg g⁻¹ DPPH[•]). The anti-radical efficiency of the extract was about 0.1153 × 10⁻³, being lower than those of ascorbic acid (41.74 × 10⁻³) and Trolox (2.60 × 10⁻³) [36].

Total phenolic content

The quantity of the total phenolic content in the extract was given by a linear regression equation obtained from the calibration curve, and expressed as mg equivalent pyrocatechol per g of ethanolic extract.

Table 6 summarizes the yield and the total phenolic contents of the extract.

The use of ethyl acetate as a solvent enables to obtain a yield in dry mixture flavonics of 1.25 % [12]. The antioxidant activity of the extract of *I. viscosa* may be due to the strong content of phenolic compounds. Schinalla *et al.* [37] described that this activity was due to the presence of the flavonols, especially the derivatives of quercetin.

CONCLUSION

These results suggest that essential oil and ethanolic extracts of *I. viscosa* possess antimicrobial and antioxidant properties. It could be used as alternative natural antioxidant in agro-alimentary industry (but after toxicological examination) to preserve the lipid peroxidation, but also in pharmaceutical industry to prevent and treat various human diseases.

This study will provide bases for future studies in this area. It is interesting to continue this investigation on the volatile constituents and the different fractions of phenolic compounds of this plant in order to identify the individual components (or the association of components), which would be responsible for this biological activity.

REFERENCES

- [1] Abu Zarga, M.H., Hamed, E.M., Sabri, S.S., Oelter, W. and Zeller, K.P. (1998). New sesquiterpenoids from the Jordanian medicinal plant *Inula viscosa*. *Journal of Natural Products*, 61, 798-800.
- [2] Abu Zarga, M.H., Sabri, S.S., Hamed, E.M., Khanfar, M.A., Zeller, K.P. and Atta-Ur-Rahman. (2002). A new eudesmane type sesquiterpene from *Inula viscosa*. *Natural Product Research*, 17 (2), 99-102.
- [3] Susplugas, C., Balansard, G. and Julien, J. (1980). Evidence of anthelmintic action of aerial part from *Inula viscosa* Ait. *Herba Hung*, 19, 19-33.
- [4] Barbetti, P., Chiappini, I., Fardella, G. and Menghini, A. (1985). A new eudesmane acid from *Dittrichia (Inula) viscosa*. *Planta Medica*, 51, 471.
- [5] Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J. and Palevitch, D. (1987). Plants used for treatment of diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 19, 145-151.
- [6] Lauro, L. and Rolih, C. (1990). Observation an research on an extract of *Inula viscosa*. *Bollettino Societa Italiana Biologica Sperimentale*, 66, 829-834.
- [7] Lastra, C., Lopez, A. and Motiva, V. (1993). Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichie viscosa*. *Planta Medica* 59, 497-501.
- [8] Al-Dissi, N.M., Salhab, A.S. and Al-Hajj, H.A. (2001). Effect of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 117-121.
- [9] Karim, F. and Quraan, S. (1986). Medicinal plants of Jordan. Jordan Natural History Museum, Irbid, p.65.
- [10] Font Quer, P. (1973). Plantas medicinales. In: M. Costa, J.M.F. Nogueira, M.G. Miguel, and A. Romano (eds), In vitro mass clonal propagation of *Dittrichia viscosa* subsp. *revoluta* and analysis of its secondary metabolites. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78 (3), 310-314.
- [11] Cafarchia, C., De Laurentis, N., Milillo, M.A., Losacco, V. and Puccini, V. (2002). Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parassitologia*, 44, 153-156.
- [12] Öksüz, S. (1977). Flavonoidal compounds of *Inula viscosa* part II. *Planta medica*, 31, 270-273.
- [13] Costa, M., Nogueira, J.M.F., Miguel, M.G. and Romano, A. (2003). In vitro mass clonal propagation of *Dittrichia viscosa* subsp. *revoluta* and analysis of its secondary metabolites. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78 (3), 310-314.
- [14] Lahouel, M. and Fillastre, J.P. (2004). Role of flavonoids in the prevention of haematotoxicity due to chemotherapeutic agents. *Haema*, 7 (3), 313-320.
- [15] Singleton, C.P. and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

- [16] Gulluce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A. and Sahin, F. (2003). In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 3958-3965.
- [17] Hernández, N.E., Tereschuk, M.L. and Abdala, L.R. (2000). Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Taft del Valle (Tucumán, Argentina). Journal of Ethnopharmacology, 73, 317-322.
- [18] Chang, S.T., Wang, S.Y., Wu, C.L., Su, Y.C. and Kuo, Y.H. (1999). Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) Heartwood. Holzforschung, 53, 487-490.
- [19] Chang, S.T., Wang, S.Y., Wu, C.L., Chen, P.F. and Kuo, Y.H. (2000). Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. Holzforschung, 54, 241-245.
- [20] Mellors, A. and Tappel, A.L. (1966). The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. The Journal of Biological Chemistry, 241 (19), 4353-4356.
- [21] Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A.A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 (8), 4083-9.
- [22] Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315.
- [23] Ekanayake, P., Lee, Y.D. and Lee, J. (2004). Antioxidant activity of flesh and skin of *Eptatretus burgeri* (Hag Fish) and *Enedrias nebulosus* (White spotted Eel). Food Science and Technology International, 10 (3), 0171-7.
- [24] Sun, T., Jia, Z.S., Chen, W.X., Jin, Y.X. and De Xu, Z. (2001). Active oxygen radical scavenging ability of Water-Soluble β -Alanine C_{60} adducts. Chinese Chemical Letters, 12 (11), 997-1000.
- [25] Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture, 76, 270-276.
- [26] Yen, G.C. and Duh, P.D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active-oxygen species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 629-632.
- [27] Shelef, L.A., Naglik, O.A. and Bogen, D.W. (1980). Sensitivity of some common foodborne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. Journal of Food Science, 45, 1042-1044.
- [28] Katayama, T. and Nagai, I. (1960). Chemical significance of the volatile components of spices in the food preservative viewpoint. VI. Structure and antibacterial activity of terpenes. In: C.C. Tassou, and G.J.E. Nychas (eds), Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. International Biodeterioration & Biodegradation, 411-420.
- [29] Maoz, M. and Neeman, I. (2000). Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. Journal of Ethnopharmacology, 71, 479-482.
- [30] Ali-Shtayeh, M.S. and Abu Ghdeib, S. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. Mycoses, 42, 665-672.
- [31] Cafarchia, C., De Laurentis, N., Milillo, M.A., Losacco, V. and Puccini, V. (1999). Ricerche sull'attività fungistatica di fiori e foglie di *Inula viscosa* (Asteraceae). Parassitologia, 41, 579-582.
- [32] Hadafi, A., Ismaili Alaoui, M., Chaouch, A., Zrira, S. and Benjilli, B. (1998). Activité antioxydante des extraits du romarin (*Rosmarinus officinalis* L) et du myrte (*Myrtus communis*). 2 : Effet du solvant d'extraction. 17^{ème} Journées Internationnelles Huiles Essentielles Digne Les Bains 2, 3, 4 & 5 Septembre.
- [33] Stief, T.W. (2003). The physiology and pharmacology of singlet oxygen. Med. Hypotheses, 60, 567-572.
- [34] Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: A general introduction. Nutrition Reviews, 55, 44-49.
- [35] Wallach, J., Schwartz-Cavrilovic, C., Maginot, M.J. and Cavrilovic, M. (1996). Manipulations d'analyse biochimique. 3^{ème} Edition, Doin, 224-354.
- [36] Benhammou, N., Atik Bekkara, F. And Kadifkova Panovska, T. (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L and *Pistacia atlantica* Desf. Advances in Food Sciences, 29 (3), 155-161.
- [37] Schinella, G.R., Tournier, H.A., Prieto, J.M., Mordujovich de Buschiazzo, P. and Rios, J.L. (2002). Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. Life Sciences, 70, 1023-1033.

Received: February 26, 2007

Revised: June 07, 2007; November 16, 2007

Accepted: December 19, 2007

CORRESPONDING AUTHOR

Nabila Benhammou

Laboratory of the Natural Products

Department of Biology

University Abou Bekr Belkaid

LP 119

Imama Tlemcen

ALGERIA

E-mail: nabila.benhammou79@yahoo.fr

nabila.benhammou@caramail.com

ANTIRADICAL CAPACITY OF THE PHENOLIC COMPOUNDS OF *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf.

Nabila Benhammou^{1*}, Fawzia Atik Bekkara¹ and Tatjana Kadifkova Panovska²

¹Department of Biology, University Abou Bekr Belkaid, LP 119, Imama Tlemcen, Algeria

²Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, SS "Cyril and Methodius University" 1000 Skopje, R. Macedonia

SUMMARY

In the present work, the antiradical capacity of ethanolic extracts of phenolic compounds obtained from *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae) was compared with that of synthetic antioxidants (ascorbic acid and trolox).

The phenolic compounds of the leaves of *P. lentiscus* (mastic tree) and *P. atlantica* (Mount Atlas pistache) were extracted with ethanol. The total phenolic contents (PT) were determined by the method of Folin-Ciocalteu. The contents obtained were approximately 1.96 ± 0.70 and 0.90 ± 0.05 mg g⁻¹ of *P. atlantica* and *P. lentiscus* dry extracts, respectively. The antioxidant activity of the extracts was determined spectrophotometrically at ambient temperature and 515 nm using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and evaluated following the kinetics of the DPPH reduction.

The results obtained showed that ascorbic acid had greater antioxidant activity than the extracts. In addition, the extract of *P. lentiscus* showed more activity than that of *P. atlantica*. The parameter EC₅₀ and its time equivalent T_{EC50} have an influence on the antiradical capacity of phenolic compounds' extracts. The antiradical efficiency (AE) was regarded to be a powerful parameter to select antioxidants compared to EC₅₀. This study has revealed that *P. lentiscus* remains a considerable source of natural antioxidants.

KEYWORDS: Antiradical efficiency, DPPH, polyphenols, *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica*.

INTRODUCTION

Pistacia is a genus of the Anacardiaceae family [1]. It includes many species widely spread in the Mediterranean and Middle Eastern areas [2]. Zohary [3] recognized eleven species used as ornamentals, and some of them are valuable as fruit trees.

Pistacia lentiscus L. is a small evergreen tree or shrub, 1-8 m high, with pinnate leaves and lanceolata leaflets [2]. Due to its exceptionally high resistance to both drought and excess light stress, it plays a key role in the maintenance of ecosystems that are at incipient risk of desertification [4]. *Pistacia atlantica* Desf. is a tree which can reach 25 m in height. It grows naturally in arid and semi-arid areas [5]. These two species are the main oleoresin resources, and of immense economic and pharmaceutical importance [1]. *Pistacia* species have a long history in the ethno- and/or popular medicine. The resin produced from the bark was an embalming ingredient in ancient Egypt [6]. This species is used to treat eczema, paralyses, diarrhoea, throat infection, renal stones, jaundice, asthma and stomach-ache, as an astringent, anti-inflammatory, antipyretic, pectoral and stimulating agent [7]. The aerial part of *P. lentiscus* has also been used in some regions of Spain as a popular cure for hypertension [7].

Recently, the greatest interest of the biological, medical and scientific world has been related to research the natural antioxidant molecules. Free radicals are species which contain one or more unpaired electrons. These molecules are highly reactive transient chemical species formed in all tissues during normal aerobic cellular metabolism. They easily capture an atom from other molecules, starting a chain reaction with the potential to initiate damage to the various intracellular components [8]. They act on proteins and DNA of healthy cells, and cause peroxidation of membrane lipids [9].

The free radicals are formed continuously in the human body as a result of the oxidative phosphorylation effect. They are the main factors for ageing, tumors, arteriosclerosis and hypertension. They also cause accumulation in tissues of special pigments, the so-called lipofuscines. The biology of free radicals is a relatively new area that studies the interaction between living matter and free radicals.

Antioxidants are substances that are capable to lessen the oxidation rate in autoxidisable materials. The mechanisms by which they can inhibit the process of oxidation

include scavenging of the free radicals, chelating of free metals, and inhibition of enzymes responsible for the production of the free radicals and the prevention of the antioxidant systems of defense [10].

Living organisms have developed a complex antioxidant network to counteract reactive species. Non-enzymatic antioxidants, such as albumin, reduced glutathione (GSH), ascorbic acid, α -tocopherol, β -carotene, uric acid, bilirubin and flavonoids, constitute an important aspect of the network [11]. Tocopherols are considered to be singlet oxygen quenchers [12, 13]. Trolox C is water-soluble and reported to be more active than α - and γ -tocopherols, thus possibly interfering with the chain reaction of lipid peroxidation by reacting directly with peroxy and alkoxy radicals [14].

The study of the antioxidant capacity of the leaves of *P. lentiscus* has revealed that the activities of the scavenging of the DPPH radical, superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydroxyl (OH) radical increase according to the increase in the numbers of galloyl groups on the quinic acid skeleton [15].

No data is available for the antioxidant capacity of *P. atlantica* under *in vitro* conditions.

The purpose of this study is to evaluate the antiradical activity of phenolic compounds obtained from ethanolic extracts of *P. lentiscus* L. and *P. atlantica* Desf. leaves.

MATERIAL AND METHODS

Plant material.

The leaves of *P. lentiscus* L. and *P. atlantica* Desf. were collected at the stations Oum El Alou and Ain Fezza (area of Tlemcen, Algeria), in November, 2005. Voucher specimens of the collected plants were confirmed and deposited at the herbarium of the Department of Biology, Laboratory "Natural Products", Faculty of Sciences, University Abou Bekr Belkaid, Tlemcen (Algeria).

Chemical reagents.

Methanol and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl were purchased from Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs (Switzerland); Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, 97%, $C_{14}H_{18}O_4$) and Folin-Ciocalteu reagent were provided by Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany). L(+)-ascorbic acid was obtained from Merck, Darmstadt (Germany). All reagents used were of analytical grade.

Preparation of the extracts of the phenolic compounds.

The powder (50 g) of each plant was placed in an Erlenmeyer flask in 200 ml ethanol (96.6 °) for 15 days. After filtration, the ethanol was evaporated in a rotary evaporator (4000-efficient Laborota) at 70 °C, and the dried residues were dissolved in 20 ml methanol.

Proportioning of total phenols

Total phenolics in the extracts of the leaves of *P. lentiscus* (ELPL) and *P. atlantica* (ELPA) were determined with Folin-Ciocalteu reagent according to the method of Singleton and Rossi [16]. Aliquots (200 μ l) of each extract were transferred into test tubes, and 1 ml of 1/10-diluted Folin-Ciocalteu reagent and 0.8 ml of sodium carbonate (7.5 %) were added. The mixture was allowed to stand for 30 min at ambient temperature with intermittent shaking. The absorbance was measured at 765 nm using a Jenway 6405 UV/VIS spectrophotometer. A calibration curve to various pyrocatechol concentrations (4.746, 47.47, 63.37, 84.37, 112.5, 150 $mg L^{-1}$) was carried out.

The total phenolic contents were expressed in mg equivalent with pyrocatechol per g of the ethanolic extract.

DPPH radical scavenging activities

The effect of each extract on DPPH $^{\bullet}$ was measured using the methods described by Sanchez-Moreno et al. [17]. A volume of 0.1 ml of various concentrations of each extract expressed in $g L^{-1}$ was added to 3.9 ml of methanolic solution of DPPH $^{\bullet}$ (0.025 $g L^{-1}$) prepared daily. The absorbance at 515 nm was measured at different time intervals (in seconds) until the reaction reached a plateau. The concentration of DPPH $^{\bullet}$ ($g L^{-1}$) in the reaction medium was calculated starting from a calibration curve constructed with the following concentrations of DPPH $^{\bullet}$ [0.0125, 0.0156, 0.0187, 0.0237, 0.0243, 0.0247 $g L^{-1}$] by a linear regression.

$$A_{515\text{ nm}} = a \times [\text{DPPH}^{\bullet}]_t + b$$

where $[\text{DPPH}^{\bullet}]_t$ was expressed as $g L^{-1}$.

The percentage inhibition of radical DPPH by the extracts of phenolic compounds was calculated using the formula of Yen and Duh [18]:

$$\% \text{Inhibition} = \left[\frac{A_{C(0)} - A_{\text{échantillon}(t)}}{A_{C(0)}} \right] \times 100$$

where $A_{C(0)}$ represents the absorbance of control with $t=0$, and $A_{\text{échantillon}(t)}$ represents that in the presence of antioxidants at a time T, which varies according to the concentrations.

Statistical analysis.

All data presented are means of three replicates along with standard deviations. Correlation coefficients were determined between antioxidant capacity and phenolic constituents using Origin 6 Professional and Prism 3 statistical program packages.

RESULTS AND DISCUSSION

The free radical DPPH is used in experimental systems to evaluate the effectiveness of antioxidants and flavonoids [17, 19].

TABLE 1 - Antioxidant activity of the extracts of the phenolic compounds of *P. lentiscus* and *P. atlantica* expressed as % of inhibition.

Concentration (g L ⁻¹)	Percentage of inhibition (Trolox)	Percentage of inhibition (ELPL)	Percentage of inhibition (ELPA)	Percentage of inhibition (Ascorbic acid)
0.062	-	-	-	50.62
0.12	-	-	-	56.37
0.14	-	-	-	52.24
0.19	-	-	-	72.53
0.22	-	-	-	92.01
0.24	-	-	-	92.28
0.25	73.07	41.29	89.40	
0.5	94.97	92.90	92.36	
1	95.24	94.50	93.96	
2	95.78	94.61	94.38	
3	95.69	95.69	95.69	

ELPL = extracts from the leaves of *P. lentiscus*; ELPA = extracts from the leaves of *P. atlantica* (ascorbic acid and Trolox are positive controls).

Calculation percentages of inhibition of free radical DPPH'

The results of the antioxidant activity expressed in percentages of inhibition are illustrated in Table 1.

Ascorbic acid revealed about 92.28 % of inhibition increase at 0.24 g L⁻¹ concentration. For the two plant extracts tested, the ability to inhibit methanolic solutions of DPPH was almost complete with a high concentration. It is possible to obtain an effect of the scavenging the DPPH at 100%. The percentages of inhibition for the Trolox, ELPL and ELPA extracts varied between 73.07-95.69 %, 41.29-95.69 % and 89.40-95.69 %, respectively.

Fraction of the residual DPPH' (DPPH'_{REM}) solution plotted versus time

Reduction in the absorption of radical DPPH was explained by its reduction in the presence of *P. lentiscus*, *P. atlantica* and control extracts (Figs. 1 and 2) [20].

This reduction results from the change of the violet color towards yellow during the formation of the DPPH-H radicals, starting by the release of phenolic hydrogen atoms

from the extracts and their acceptance by radical DPPH. The results obtained for absorbance versus time are not enabling the calculation of the antioxidant activity (AOA). Consequently, it is necessary to transform these data with the residual fraction of DPPH in the methanolic solutions versus time.

This fraction (DPPH'_{REM}) was calculated by the following formula [20]:

$$\% \text{ DPPH}'_{\text{REM}} = \frac{[\text{DPPH}']_t}{[\text{DPPH}']_{t=0}}$$

where $[\text{DPPH}']_{t=0}$ is the initial concentration of the stable radical without the antioxidant and $[\text{DPPH}']_t$ is its remaining concentration at the reaction plateau step.

The concentrations of $[\text{DPPH}']_t$ were calculated by using the following linear regression equation:

$$A_{515 \text{ nm}} = 23 \times [\text{DPPH}']_t; r^2 = 0.997$$

The evaluation of the residual DPPH percentages at steady state conditions according to the concentrations is summarized in Table 2.

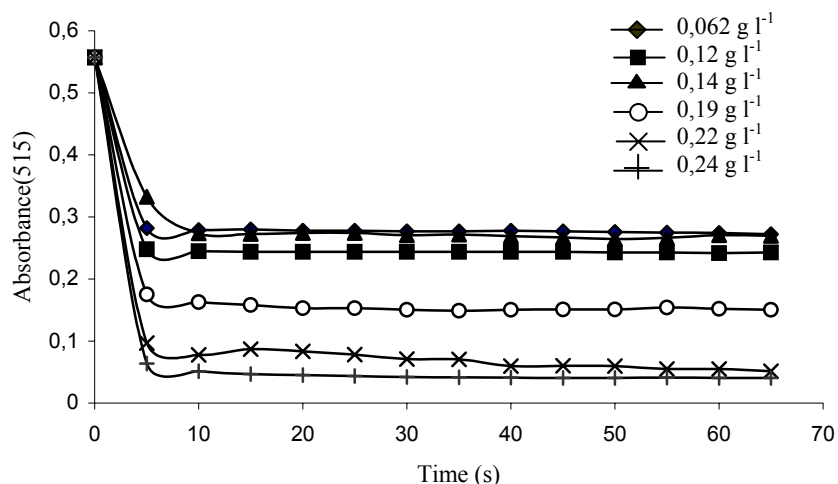


FIGURE 1 - Reduction of the absorption of ascorbic acid versus time.

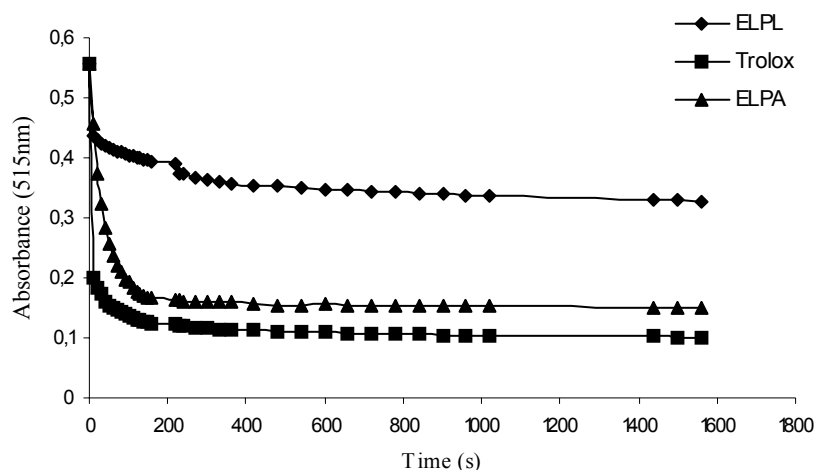


FIGURE 2 - Reduction of the absorption of ELPL, ELPA and Trolox at 0.25 g L^{-1} versus time.

TABLE 2 - Correlation between the antioxidant capacity (by the DPPH method) and concentrations of antioxidants (g L^{-1}).

Antioxidant	Concentration (g L^{-1}) of antioxidants	Concentration (mg antioxidant per g DPPH*)	Time at steady state (min)	% inhibition of DPPH* _{REM} at the steady state	Correlation coefficient (r^2)
ELPL	0.25	100	30	59.53	0.994
	0.5	200	25	7.08	0.995
	1	400	3.25	5.48	0.999
	2	800	2.58	5.39	0.999
	3	1200	5	4.29	1
ELPA	0.25	100	33.33	11.63	0.994
	0.5	200	3.16	7.62	0.999
	1	400	1	6.02	0.999
	2	800	1.16	5.13	1
	3	1200	2	4.29	0.942
Trolox	0.25	100	6.16	26.93	0.998
	0.5	200	4.33	5.03	0.999
	1	400	2	4.76	0.999
	2	800	1.08	4.22	0.995
	3	1200	1.25	4.31	0.998
Ascorbic acid	0.062	24.8	1.5	49.03	0.993
	0.12	48	0.83	43.64	0.999
	0.14	56	2.75	47.88	0.996
	0.19	76	3.41	27.49	0.998
	0.22	88	2.91	7.98	0.979
	0.24	96	1.16	7.18	0.999

In the case of fast kinetics, samples with high concentrations react quickly and reach steady state conditions immediately. On the contrary, slow kinetics and low concentrations imply a long period before reaching the steady state. ELPA possessed a high potential to scavenge DPPH radical, compared to ELPL and Trolox at concentrations of 0.25 g L^{-1} .

The concentration of each antioxidant correlated with its total antioxidant capacity, and correlation coefficients were >1 in all cases.

Concentration increase of the samples revealed a proportional reduction in percentage of residual DPPH. In the case of 3 g L^{-1} , the steady state was reached after 2 min for ELPA, 5 min for ELPL and 1.25 min for Trolox, where-

as for ascorbic acid, the steady state for 0.24 g L^{-1} was already obtained after 1.16 min.

Fraction of the residual DPPH* (DPPH*_{REM}) plotted versus the concentration of antioxidants

The concentration of a compound reducing the initial DPPH level by 50% (EC_{50}) is generally used to measure the antioxidant power [17, 21-23], respective antioxidant activity (AOA), which rose at low EC_{50} values, and conversely [24].

The EC_{50} values (Table 3) were calculated from the residual percentages of DPPH plotted versus the concentrations of the phenolic compound extracts, expressed as mg antioxidant per g DPPH* using an exponential equation (Fig. 3).

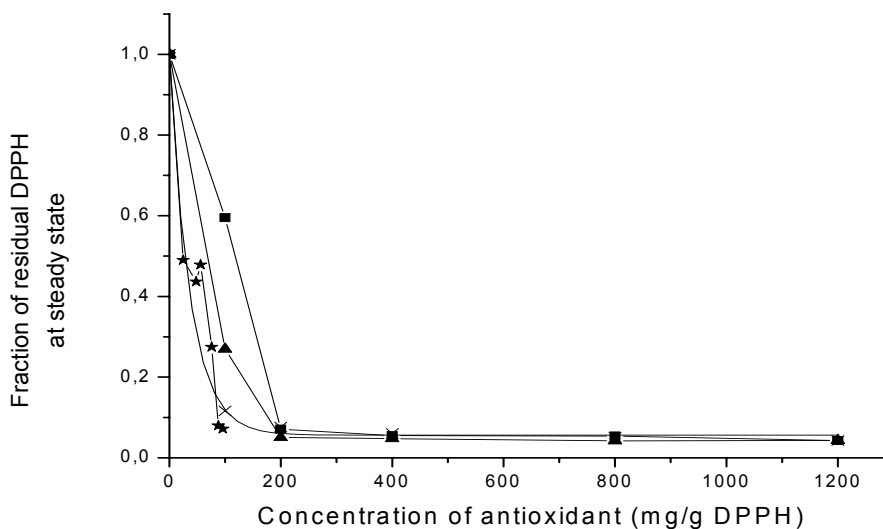


FIGURE 3 - Fractions of the residual DPPH ($DPPH_{REM}$) at the steady state plotted versus ratio (mg of antioxidant/g DPPH).

TABLE 3 - Determination of EC_{50} concentrations.

Antioxidant	EC_{50} (mg antioxidant per g DPPH*)	Range of times at the steady state (min) for different concentrations	Correlation coefficient (r^2)	T_{EC50}
ELPL	90.87	2.8-30	0.950	33.524
ELPA	27.76	1-33.33	0.999	259.56
Trolox	49.21	1.08-6.16	0.997	7.803
Ascorbic acid	39.53	0.83-3.41	0.917	0.606

TABLE 4 - Determination of the antiradical efficiency (AE) of the samples.

Antioxidants	Correlation coefficient (r^2)	EC_{50}	Time (T_{EC50})	AE ($\times 10^{-3}$)	PT ($mg\ g^{-1}$)
ELPL	0.908	90.87	33.524	0.328	0.90 ± 0.05
ELPA	0.999	27.76	259.56	0.1387	1.96 ± 0.70
Ascorbic acid	0.893	39.53	0.606	41.74	
Trolox	0.994	49.21	7.803	2.60	

PT = total phenolic contents; ELPL = extracts from the leaves of *P. lentiscus*; ELPA = extracts from the leaves of *P. atlantica*.

According to the obtained results, low EC_{50} values (ELPA, 27.76 and ELPL, 90.87 $mg\ g^{-1}$) corresponded with low-time reactions. The values for ascorbic acid and Trolox were 39.53 and 49.21 $mg\ g^{-1}$ DPPH. Comparison of these values to control indicated that ELPA has scavenging activity for the DPPH radical.

T_{EC50} was that time necessary to reach the steady state at a concentration corresponding to EC_{50} . It was obtained by the modelling of times at steady state conditions versus the concentrations for each ethanolic extract.

Antiradical efficiency

The parameter "Antiradical efficiency (AE)" is used to differentiate and classify various antioxidants (Table 4), and was obtained by the following formula:

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}} \quad [17]$$

Low EC_{50} values combined with low T_{EC50} resulted in high AE values. The EC_{50} of ELPA and ascorbic acid are similar, whereas the difference in time T_{EC50} equalizes with 258.95 min between these two antioxidants, indicating that EC_{50} values do not show time dependence (Table 4). The antiradical efficiency of ascorbic acid is higher (41.74×10^{-3}) than that of ELPL (0.328×10^{-3}), ELPA (0.1383×10^{-3}) and Trolox (2.60×10^{-3}). AEs of the samples are classified in the following order: ascorbic acid > Trolox > ELPL > ELPA. This shows that AE remains a powerful parameter for evaluating the antioxidant activity, compared to EC_{50} .

The obtained results indicate that ascorbic acid (41.74×10^{-3}) has a higher antioxidant power for scavenging of

DPPH compared to Sanchez-Moreno (11.44×10^{-3}) [17] and Qian and Nihorimbere (0.80×10^{-3}) [24]. On the contrary, the EC_{50} value was 39.53 mg g^{-1} DPPH compared to 76 and 50 mg g^{-1} DPPH found by these authors. It is suggested that ascorbic acid reacts immediately with radical DPPH, and reaches the steady state in 15 seconds [25]. In our study, this phase arrives after 1.16 min compared to 1.15 min mentioned by Sanchez-Moreno [17].

The antioxidant power of these two controls is also cited by other authors: tannic acid > quercetin > rutin > ascorbic acid > DL- α -tocopherol [17, 21, 22].

The antioxidant activity of ELPL and ELPA extracts is close to the one of gallic acid [15]. It has been shown that the antioxidant capacity of *P. lentiscus* extract is due mainly to gallic acids and their derivatives galloyls (5-O-galloyl; 3,5-O-digalloyl; 3,4,5-tri-O-galloyl). Percentage of DPPH scavenging activity increases consequently with the number of the galloyl groups. Quercetin and gallic acid are powerful natural antioxidants [26], and monophenols are less effective than polyphenols [17, 24]. With gallic acid, the inductive effect of these 3 hydroxyl groups is a significant factor influencing the increase in antioxidant activity [17].

The quantity of PT in the extracts was determined as pyrocatechol equivalent using an equation obtained from a calibration curve. The equation is given below:

$$\text{Absorbance} = 0.0198 \times \text{mg pyrocatechol} + 0.1283$$

$$(r^2 = 0.9917)$$

The total phenolic contents of ethanol extracts of *P. lentiscus* and *P. atlantica* varied from 0.90 to 1.96 mg of pyrocatechol equivalent (Table 4). According to these results, no relationship between total phenols and antioxidant activity could be related. In many cases, the high activity was not limited to phenolics, but it may be due to the presence of other antioxidative secondary metabolites, such as volatile oils, carotenoids, flavonoids, lignans, alkaloids, vitamins (ascorbic acid) etc. [27-29].

CONCLUSION

This research has examined the kinetics of free radical DPPH scavenging by using the ethanol extracts of two *Pistacia* species to evaluate antioxidant activity.

The two extracts reveal a powerful antioxidant capacity. Antiradical efficiency of *P. lentiscus* is stronger than that of *P. atlantica*. This capacity is reverse when compared with concentrations of EC_{50} . Therefore, the parameter "antiradical efficiency" remains an adequate and better one than EC_{50} , to classify various antioxidants. The ascorbic acid showed a higher antioxidant capacity than Trolox. In addition, the efficiency of free radical scavenging increases according to concentration, and this capacity depends on both the amounts and types of phenolic compounds in the

extracts. However, the industrial exploitation of the extracts of the phenolic compounds from *P. lentiscus* and *P. atlantica* appears to be promising. These two species can be used like supplements of natural antioxidants to avoid autoxidation, and the phenomenon of degradation of the foodstuffs. Moreover, the free radical scavenging activity is also useful like preventive properties against diseases. More research is required to further characterize the extracts, and possibly identify the phenolic compounds within the two species that are responsible for the antioxidant capacity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Katherine A. Hammer (School of Biomedical, Biomolecular and Chemical Sciences, University of Western Australia) for her great help, correction and support of this work.

REFERENCES

- [1] Delazar, A., Reid, R.G. and Sarker, S.D. (2004). GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. Mutica. Chemistry of Natural Compounds, 40, 1-5.
- [2] Iauk, L., Ragusa, S., Rapisarda, A., Franco, S. and Nicolosi, V.M. (1996). In vitro antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts: Preliminary report. Journal of Chemotherapy, 8, 207-209.
- [3] Atli, H.S., Arpacı, S., Karadag, S., Kaska, N., Ozguven, A.I., Eskalen, A., Kusek, M. and Danisti, L. (1999). Determination of rootstock for irrigated pistachio trees with controlled hybridisation on some *Pistacia* species. Annual Report, Pistachio Research Institute, Gaziantep.
- [4] Margaris, N.S. (1983). Adaptive strategies in plants dominating Mediterranean-type ecosystems. In: di Castri, F., Goodall, D.W. and Specht, R.L. (eds) Ecosystems of the World 11. Mediterranean-type Shrublands. Elsevier Science: New York: 309-315.
- [5] Benabid, A. (2000). Flore et écosystème du Maroc, pp 130-221, Ibis Press, Paris.
- [6] Uphof, J.C. (1959). Dictionary of Economic Plants, p. 284, H. R. Engelmann (J. Cramer), New York.
- [7] Villar, A., Sanz, M.J. and Paya, M. (1987). Hypotensive Effect of *Pistacia lentiscus* L. International Journal of Crude Drug Research, 25, No. 1, pp. 1-3.
- [8] Cheeseman, K.H. and Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin, 49, 481-93.
- [9] Vimala, S. and Adenan, M.I. (1999). Malaysian tropical forest medical plants: a source of natural antioxidants. Journal of Tropical Forest Science, 5, 28-32.
- [10] Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutrition Reviews, 52, 253-265.
- [11] Prior, R.L. and Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 27, Nos 11/12, 1173-1181.

- [12] Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd edn. Clarendon Press, Oxford.
- [13] Kaiser, S., Di Maschio, P., Murphy, M. and Sies, H. (1990). Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. Archives of Biochemistry and Biophysics, 277, 101-108.
- [14] Sies, H. and Murphy, M.E. (1991). Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology, 8, 211-224.
- [15] Baratto, M.C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., Basosi, R. and Pogni, R. (2003). Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. Free Radical Research, 37(4), 405-412.
- [16] Singleton, C.P. and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158.
- [17] Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture, 76, 270-276.
- [18] Yen, G.C. and Duh, P.D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active-oxygen species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 629-632.
- [19] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 28, 25-30.
- [20] Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. Food Science and Technology International, 8 (3), 121-137.
- [21] Robak, J. and Gryglewski, R.J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions, Biochem Pharmacol, 37 (5), 837-841.
- [22] Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. (1989). Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 37 (7), 1919-1921.
- [23] Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. and Kinsella, J.E. (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42 (1), 64-69.
- [24] Qian, H. and Nihombere, V. (2004). Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. Journal of Zhejiang University SCIENCE, 5 (6), 676-683.
- [25] Jukić, M. and Miloš, M. (2005). Catalytic oxidation and antioxidant properties of Thyme essential oils (*Thymus vulgaris* L.). Croatica Chemica ACTA CCACAA, 78 (1), 105-110.
- [26] Makris, D.P. and Kefalas, P. (2004). Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. Food Technology and Biotechnology, 42 (2), 105-108.
- [27] Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R. and Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 530-534.
- [28] Schinella, G.R., Tournier, H.A., Prieto, J.M., Mordujovich de Buschiazzo, P. and Rios, J.L. (2002). Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. Life Sciences, 70, 1023-1033.
- [29] Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. and Vivanco, J.M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. Food Chemistry, 83, 547-550.

Received: October 10, 2006

Revised: December 18, 2006; January 19, 2007

Accepted: May 30, 2007

CORRESPONDING AUTHOR

Nabila Benhammou

Department of Biology

University Abou Bekr Belkaid

LP 119

Imama Tlemcen

ALGERIA

E-mail : nabila.benhammou79@yahoo.fr

nabila.benhammou@caramail.com

ملخص

المركبات المضادة للأكسدة هي موضوع دراسات عديدة لأنه بالإضافة إلى استخدامها كمواد حافظة في المواد الغذائية عن طريق استبدال المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية، إنها تتدخل في علاج الكثير من الأمراض. في إطار اكتشاف مواد جديدة مضادة للأكسدة من المصادر الطبيعية، إهتمنا في هذا العمل بدراسة المركبات الفينولية وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة لمصنوعات عشرة (10) نباتات طبية من الغرب و الجنوب الغربي الجزائري :

Zygophyllum ، *Helianthemum lippii* ، *Anabasis articulata* ، *Atriplex halimus* ، *Marrubium deserti* ، *Thymelaea microphylla* ، *Pistacia atlantica* ، *Inula montana* و *Pentzia monodiana* ، *Cotula cinerea* ، *album*

يعتني الجزء الأول من هذه الدراسة باستخراج و تقييم كمية الفينولات الكلية، الفلافونويدات والتانات عن طريق كاشف Folin-Ciocalcu، بواسطة ثلاثي كلوريد الألومنيوم واختبار الفانيلين ، على التوالي.

أما الجزء الثاني فهو يخصص دراسة النشاط المضادة للأكسدة لمصنوعات النبات باستخدام خمسة طرق : محاصرة الجذر $DPPH^*$ ، محاصرة الهيدروكسيل (OH *)، إرجاع الحديد، تثبيط الأكسدة ل- β - كاروتين وتقدير القدرة المضادة للأكسدة الإجمالية.

النتائج التي تم الحصول عليها تظهر ثراء *P. atlantica* ، *T. microphylla* و *M. deserti* بالبوليفينول حيث تتراوح القيمة ما بين 27.353 ± 133.74 و 285.956 ملغ EAG / غ / MS. بالنسبة للنباتات الأخرى، يتراوح محتوى البوليفينول بين 3.776 و 1.188 ± 74.211 ملغ / غ. مستويات الفلافونويدات و التانات المعرب عنها بنظائر كاتشين هي في حدود 0.564 و 12.441 ملغ / غ و 1.421 و 25.021 ملغ / غ، على التوالي.

تظهر اختبارات النشاط المضاد للأكسدة أن كل المستخلصات النباتية المدروسة تظهر خصائص مضادة للأكسدة في مستويات مختلفة. يحتوي جزء خلاص الإيثيل من ثمار *P. atlantica* على أفضل قدرة إرجاعية ($IC_{50} = 0.055 \pm 0.002$ ملغ / مل) مقارنة بحمض الأسكوربيك ($IC_{50} = 0.063 \pm 0.002$ ملغ / مل) ، و هي قوية المحاصرة لجذور $DPPH^*$ ($EC_{50} = 14.641$ ملغ مضاد للأكسدة / غ $DPPH^*$) و (OH *) ($EC_{50} = 0.271$ ملغ / مل) مقارنة بـ BHA ($EC_{50} = 0.306$ ملغ / مل) و لكن قدرة تثبيط التبييض ضعيفة ل- β - كاروتين ($EC_{50} = 3.524$ ملغ / مل). هذا الجزء لديه قدرة مضادة للأكسدة كلية نحو 1.874 ± 31.209 ملغ EAA / غ. فيما يخص المستخلصات الأخرى، *P. atlantica* و جزئها البيتانولي، *H. lippii* (سيقان ، أوراق و ثمار) ، *I. montana* و *A. articulata* أظهرت قدرات مضادة للأكسدة أقل أهمية ولكن مثيرة للاهتمام بالمقارنة مع مستخلصات *P. atlantica* ، *M. deserti* ، *T. microphylla* ، والتي لديها نشاطات منخفضة.

سجلنا وجود علاقة إيجابية بين التجارب الخمس، وهو ما يفسر مساهمة أكثر من 20 % من المواد المضادة للأكسدة للنباتة وبصفة خاصة التانات ($R^2 = 0.7337-0.9393$) والفلافونويدات ($R^2 = 0.5917-0.9221$).

الكلمات المفتاحية : النباتات الطبية، البوليفينول ، الفلافونويدات، التانات، النشاطات المضادة للأكسدة، CAT، إرجاع الحديد، $DPPH^*$ ، OH * ، β - كاروتين.

Résumé

Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car, en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies. Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des composés phénoliques et l'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits de dix (10) plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien : *Pistacia atlantica*, *Thymelaea microphylla*, *Marrubium deserti*, *Atriplex halimus*, *Anabasis articulata*, *Helianthemum lippii*, *Zygophyllum album*, *Cotula cinerea*, *Pentzia monodiana* et *Inula montana*.

La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins par le réactif du Folin-Ciocalcu, par le trichlorure d'aluminium et par le test de vanilline respectivement.

La deuxième partie est l'étude de l'activité antioxydante des extraits de plantes en utilisant ainsi cinq techniques : piégeage du radical $DPPH^*$, piégeage de l'hydroxyle (OH *), réduction de fer, inhibition de l'oxydation du β -carotène et la quantification de la capacité antioxydante totale.

Les résultats obtenus montrent la richesse de *P. atlantica*, *T. microphylla* et *M. deserti* en polyphénols dont la teneur varie entre 133.744 ± 27.353 et 285.956 mg EAG/ g MS. Pour les autres plantes, le contenu en polyphénols est compris entre 3.776 et 74.211 ± 1.188 mg EAG/ g MS. Les teneurs en flavonoïdes et tannins exprimées en équivalent de catéchine sont de l'ordre de 0.564 à 12.441 mg/ g et 1.421 à 25.021 mg/ g respectivement.

Les méthodes de l'activité antioxydante montrent que tous les extraits des plantes étudiées présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux. La fraction acétate d'éthyle des fruits de *P. atlantica* possède une meilleure capacité réductrice ($IC_{50} = 0.055 \pm 0.002$ mg/ ml) par rapport à l'acide ascorbique (0.063 ± 0.002 mg/ ml), un fort piègeur des radicaux $DPPH^*$ ($EC_{50} = 14.641$ mg Antioxydant/ g $DPPH^*$) et OH * ($EC_{50} = 0.271$ mg/ ml) par rapport aux BHT ($EC_{50} = 13.468$ mg/g) et BHA ($EC_{50} = 0.306$ mg/ ml) respectivement, mais un faible pouvoir inhibiteur du blanchiment du β -carotène ($EC_{50} = 3.524$ mg/ ml). Cette fraction a une capacité antioxydante totale de l'ordre de 31.209 ± 1.874 mg EAA/ g. Concernant les autres extraits, *P. atlantica* et sa fraction butanolique, *H. lippii* (tiges, feuilles et fruits), *I. montana* et *A. articulata* montrent des pouvoirs antioxydants moins importants mais intéressants comparativement aux extraits d'*A. halimus*, *Z. album*, *C. cinerea*, *P. monodiana*, *M. deserti* et *T. microphylla* qui ont des activités faibles.

Nous avons enregistré une corrélation positive entre les cinq tests, ce qui explique la contribution de plus de 20 % des antioxydants de la plante particulièrement les tannins ($R^2 = 0.7337- 0.9393$) et les flavonoïdes ($R^2 = 0.5917 - 0.9221$).

Mots clés : Plantes médicinales ; Polyphénols ; Flavonoïdes ; Tannins ; Activités antioxydantes ; CAT ; Réduction de fer ; $DPPH^*$; OH * ; β -carotène.

Abstract

The antioxidant compounds are the subject of many works because, in addition to their use as conservatives in the foodstuffs by replacing synthesis antioxidants, they intervene in the treatment of many diseases. Within the framework of discovered new antioxidants from the natural sources, we have investigated in this work, the study of phenolic compounds and the evaluation of the antioxidant properties of extracts from ten (10) medicinal plants in the west and south-west Algeria : *Pistacia atlantica*, *Thymelaea microphylla*, *Marrubium deserti*, *Atriplex halimus*, *Anabasis articulata*, *Helianthemum lippii*, *Zygophyllum album*, *Cotula cinerea*, *Pentzia monodiana* et *Inula montana*.

The first part of this study concerns the extraction and the quantification of total phenolics, flavonoids and tannins by the Folin-Ciocalcu reagent, the aluminium trichloride and the vanillin test respectively.

The second part is the study of the antioxidant activity of the plants extracts using five techniques: DPPH radical scavenging, hydroxyl radical scavenging (OH *), iron reducing power, β -carotene bleaching method and quantification of total antioxidant capacity.

The results obtained showed the richness of *P. atlantica*, *T. microphylla* and *M. deserti* of phenolic compounds which the content varies between 133.744 ± 27.353 and 285.956 mg GAE/g DM. For the other plants, the polyphenol contents ranged from 3.776 to 74.211 ± 1.188 mg GAE/g DM. The flavonoïds and tannins contents expressed as catechine equivalent were about 0.564 to 12.441 mg/g and 1.421 to 25.021 mg/g respectively.

The antioxidant activity methods showed that all the plant extracts present the antioxidant properties at various levels. The ethyl acetate fraction from *P. atlantica* fruits has a better reducing capacity ($IC_{50} = 0.055 \pm 0.002$ mg/ml) compared to the ascorbic acid (0.063 ± 0.002 mg/ml), a strong scavenging of radicals $DPPH^*$ ($EC_{50} = 14.641$ mg Antioxydant /g $DPPH^*$) and OH * ($EC_{50} = 0.271$ mg/ ml) compared to BHT ($EC_{50} = 13.468$ mg/g) and BHA ($EC_{50} = 0.306$ mg/ ml) respectively, but a weak inhibiting capacity of β - carotene bleaching ($EC_{50} = 3.524$ mg/ ml). This fraction has a total antioxidant capacity of 31.209 ± 1.874 mg AAE/ g. Concerning the other extracts, *P. atlantica* and its butanolic fraction, *H. lippii* (stems, leaves and fruits), *I. montana* and *A. articulata* showed a less significant antioxidant capacities but interesting comparatively to the extracts of *A. halimus*, *Z. album*, *C. cinerea*, *P. monodiana*, *M. deserti* and *T. microphylla* which have weak activities.

We recorded a positive correlation between the five tests, which explains the contribution of more than 20 % of plant antioxidants particularly the tannins ($R^2 = 0.7337- 0.9393$) and the flavonoids ($R^2 = 0.5917 - 0.9221$).

Keywords : Medicinal plants; Polyphenols; Flavonoids; Tannins; antioxidant activity; TAC; Reducing power; $DPPH^*$; OH * ; β -carotene.