



*République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

Université Abou Bekr Belkaïd

Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département De Biologie

Laboratoire De Recherche : « Produits Naturels » (LAPRONA)

Thèse en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Biologie

Option : Substances Naturelles : Activités Biologiques et Synthèse

Présentée par : *M^{lle} KHOLKHAL Wahiba*

*Etude phytochimique, Activité antimicrobienne et Activité
antioxydante d'Atractylis humilis, d'Eryngium maritimum
et de Salvadora persica*

devant le jury composé de:

Président : *M^{me} Bendimerad Nassima* Professeur Univ. Tlemcen

Directeur : *M^{me} Atik Bekkara Fawzia* Professeur Univ. Tlemcen

Co-Directeur : *M^{me} Bekhechi Chahrazed* Maître de conférences « A » Univ. Tlemcen

Examineurs:

r. Abdelouahid Djamel Eddine Professeur Univ. Tlemcen

me Bennaceur Malika Professeur Univ. Oran 1

r. Bensoltane Ahmed Professeur Univ. Oran 1

Année Universitaire : 2014-2015

Remerciements

Au Nom d'**Allah**, le Clément, le Miséricordieux, louage à **Allah** seigneur des mondes, qui m'a donné la force de concevoir ce travail. Il n'y a de force ni de pouvoir en dehors d'**Allah**, le Sublime, le Très-Haut. O **Allah**! C'est Toi que nous adorons. Gloire à Toi ! Nous n'avons de savoir que ce que Tu nous as appris.

J'implore notre seigneur pour que cet humble effort lui soit sincère, et que le salut et la bénédiction de Dieu soient sur notre prophète, le loyal, celui qui corrobore la vérité, l'Aimé d'**Allah**, **Mohamed**.

J'aimerais tout d'abord remercier M^{me} Atik Bekkara Fawzia, Professeur à l'université de Tlemcen, pour m'avoir acceptée dans son groupe, et pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse en acceptant la lourde tâche d'être ma directrice. Je la remercie également pour ses précieux conseils en phytochimie, sa gentillesse et sa disponibilité, ses compétences scientifiques et son efficacité, son soutien et sa grande patience qui ont fortement contribué à la réalisation de ce travail. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance, mille mercis ma directrice, et tu resteras toujours ma directrice.

J'exprime toute ma reconnaissance à ma co-directrice, M^{me} Bekhechi Chahrazed, Maître de Conférences « A » à l'université de Tlemcen. Je n'oublierai jamais sa marque de sympathie, sa disponibilité, son soutien moral et ses encouragements. Un grand merci pour tous ce que vous avez fait et pour tous ce que j'ai appris de vous du côté scientifique et relationnel.

Ma très vive gratitude à M^{me} Bendimerad Nassima, Professeur à l'université de Tlemcen, je la remercie pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de ma thèse, de son encouragement, de sa disponibilité et de sa grande qualité humaine. Je n'oublierai jamais ton soutien dans les moments difficiles.

J'adresse mes sincères remerciements à M. Abdelouahid Djamel Eddine, Professeur à l'université de Tlemcen, pour avoir accepté de juger ce modeste travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude et reconnaissance.

Je tiens à remercier M^{me} Bennaceur Malika, Professeur à l'université d'Oran, pour avoir accepté de participer à ce jury. Qu'elle reçoive ici le témoignage de mon profond respect.

Je remercie également M. Bensoltane Ahmed, Professeur à l'université d'Oran, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ma thèse de doctorat. Je suis reconnaissante de l'honneur et du plaisir qu'il m'a fait en participant au jury de ma thèse.

J'ai eu la chance d'effectuer ce travail de recherche au laboratoire des Produits Naturels département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, université de Tlemcen, sous la direction de Monsieur le Professeur Chabane Sari Daoudi. Je tiens à le remercier pour

m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour réaliser ce travail. Pour son soutien et sa grande générosité qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

J'exprime toute ma reconnaissance à tous les enseignants du laboratoire des Produits Naturels pour l'aide, l'encouragement, la disponibilité et leurs précieux conseils.

Je remercie sincèrement le Professeur Bouazza M., Madame Stambouli-Meziane H. (Maître de conférence « A ») et le Docteur Henaoui S. E. (laboratoire d'Ecologie et Ménagement des Ecosystèmes, département de Biologie et Environnement, université de Tlemcen) pour leurs disponibilités et leurs aides.

Je remercie vivement les ingénieurs du laboratoire de Biochimie, Abdelkader et Slimane, pour leurs aides durant la réalisation du travail ainsi que leur soutien moral.

J'exprime ma profonde reconnaissance à mes collègues : Miloud, Yazid, Fouzia, Imad, Samia, Mohammed Gherib, Tarik, Lamia Abid, Zoubida, Abi Ayad Fatima et Meriem, Nadjib, Rajaa, Ikram, Nacéra Belmekki et Nacéra Belkacem.

Je remercie intensément la secrétaire et les ingénieurs du laboratoire des Produits Naturels : Fadéla, Téma et Imane.

Une pensée particulière pour

Mes parents, sans qui, je n'en serai pas là aujourd'hui. Merci pour tout leur amour et leur soutien depuis toujours. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude. Je vous dédie cette thèse en guise de remerciement et de reconnaissance pour votre soutien constant et votre présence à mes côtés.

A ma sœur Rabia, pour le soutien, l'encouragement et les précieux conseils qu'elle ma donné pendant les moments difficiles.

A mes frères Fethi, Lahcene, Houssine, Kamel Eddine et Mourad qu'ils n'ont cessé de m'aider, m'orienter et me soutenir pour réaliser ce travail par tous les moyens et les méthodes.

A la mémoire de mes grands parents.

RESUMES

Résumé

Le stress oxydatif et la résistance des microorganismes pathogènes aux antibiotiques sont préoccupante au monde entier, pour cela les chercheurs ont essayé de s'enfuir vers le monde végétal pour trouver de nouveaux médicaments.

Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps dans le processus de stress oxydatif et la lutte contre les maladies infectieuses. Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés d'origine végétale ayant des activités antimicrobiennes et antioxydantes, nous avons choisi trois plantes, à savoir : *Atractylis humilis* L., *Eryngium maritimum* L. et *Salvadora persica* Garcin., après une enquête ethnobotanique auprès des tradithérapeutes.

Dans notre étude, les réactions de caractérisation d'*Atractylis humilis* nous ont permis de détecter la présence des flavonoïdes, des saponosides, des cardénolides, des tannins catéchiqes et des tannins galliques aussi bien dans les racines que dans les feuilles. Cependant, on a révélé l'absence des alcaloïdes, des coumarines, des flavones aglycones, des triterpènes et stérols, des quinones libres et des polyuronides. Le rendement de l'extraction des saponosides des racines est important, de l'ordre de 2,5%. Cet extrait était efficace contre les bactéries : *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* (10 mm à 2 mg/ml et 8 mm à 1,5 mg/ml). La CCM de l'extrait des saponines des racines nous a permis de séparer 14 composés en utilisant le système BAW sur un support en cellulose. L'analyse chromatographique a permis de caractériser un constituant qui est probablement la diosgénine.

En ce qui concerne *Eryngium maritimum*, la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes était plus élevée dans l'extrait acétonique ($55,80 \pm 2,75$ mg EP/g ES ; $1,505 \pm 0,013$ mg ER/g ES) que dans l'extrait méthanolique ($46,72 \pm 4,69$ mg EP/g ES, $1,138 \pm 0,016$ mg ER/g ES). On a observé un piégeage des radicaux libres et une réduction du fer plus élevé de l'extrait butanolique avec EC_{50} ($0,0104 \pm 0,0004$ mg/ml et $0,1139 \pm 0,0112$ mg/ml, respectivement). Les résultats de l'activité antibactérienne ont prouvé que *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* ont été inhibées par tous les extraits. Ainsi, seulement l'extrait méthanolique et l'extrait butanolique avait une activité inhibitrice contre *Pseudomonas aeruginosa*. Le test du pouvoir antifongique a révélé que l'extrait d'acétate éthylique a indiqué une activité la plus importante contre tous les mycètes testées particulièrement, contre *Aspergillus flavus* (10 mm à 50 mg/ml).

Concernant *Salvadora persica*, le dosage des composés phénoliques a montré des taux plus élevés en phénols totaux, en tannins et en flavonoïdes dans les feuilles ($67,32 \pm 0,17$ mg EP/g ES, $39,31 \pm 3,81$ mg EP/g ES et $0,47 \pm 0,00$ mg ER/g ES). L'estimation du pouvoir antioxydant par les tests de DPPH et de FRAP a montré que l'extrait d'acétate éthylique des feuilles a une activité la plus importante avec une valeur EC_{50} ($11,8 \pm 0,07$ µg/ml et 480 ± 6 µg/ml) respectivement. Au contraire de l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne la plus remarquable de l'extrait de *Salvadora persica* a été observée avec l'extrait des alcaloïdes des tiges contre *Bacillus cereus* (17 mm à 20 mg/ml).

Mots clés : *Atractylis humilis*, *Eryngium maritimum*, *Salvadora persica*, étude phytochimique, activité antioxydante, pouvoir antimicrobien, CCM.

Abstract

The oxidative stress and the resistance of the pathogenic microorganisms to antibiotics are worrying in whole world, for it the researchers tried to run away the vegetable world to find new drugs.

Medicinal plants are used for a long time in the process of oxidative stress and the fight against the infectious diseases. Within the framework of new compounds from vegetable having antimicrobial and antioxidant activities, we chose three plants (*Atractylis humilis* L., *Eryngium maritimum* L. and *Salvadora persica* Gracin.) after an ethnobotanic investigation with tradipractitioners.

In our study, the phytochemical analysis of leaves and roots of *Atractylis humilis* revealed the presence of flavonoïds, saponins, tannins, cardiac glycoside. However, we revealed the absence of alkaloids, coumarins, flavones aglycones, triterpenes and sterols, quinones and polyuronides. The saponin's yielding extraction of roots is important with 2,5%. This extract was effective against bacteria: *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* (10 mm at 2 mg/ml and 8 mm at 1,5 mg/ml). The TLC of saponin's extract of roots allowed us to separate 14 spots by using the BAW systems on a support in cellulose. The chromatographic analysis allowed to characterize one constituent which is probably diosgenin.

As far as this is concerned *Eryngium maritimum*, the amount of total phenolic and flavonoid content was higher in acetone extract ($55,80 \pm 2,75$ mg PE/g DW ; $1,505 \pm 0,013$ mg RE/g DW) than methanol extract ($46,72 \pm 4,69$ mg PE/g DW, $1,138 \pm 0,016$ mg RE/g DW). Higher Free Radical Scavenging and Iron Reducing Power were observed with butanol extract, EC_{50} ($0,0104 \pm 0,0004$ mg /ml ; $0,1139 \pm 0,0112$ mg/ml). Results of antibacterial activity showed that *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were inhibited by all the extracts. Thus, only methanol and butanol extract was active against *Pseudomonas aeruginosa*. The test of antifungal capacity showed that ethyl acetate extract revealed the strongest activity against all the test fungi specially, toward *Aspergillus flavus* (10 mm at 50 mg/ml).

In this study, *Salvadora persica* results' showed higher levels of total phenolic, tannin and flavonoid content in leaves ($67,32 \pm 0,17$ and $39,31 \pm 3,81$ mg PE/g DW and $0,47 \pm 0,00$ mg RE/g DW). The Estimation of antioxidant capacity with DPPH and FRAP showed that the leaves ethyl acetate extract has the higher activity (EC_{50} , $11,8 \pm 0,07$ μ g/ml and 480 ± 6 μ g/ml respectively). On the contrary of antioxidant activity, the strongest antibacterial activity of *Salvadora persica* extract was exhibited by the alkaloids extract of stems against *Bacillus cereus* (17 mm at 20 mg/ml).

Key words: *Atractylis humilis*, *Eryngium maritimum* and *Salvadora persica*, phytochemical study, antioxidant activity, antimicrobial power, TLC.

المخلص

الإجهاد التأكسدي ومقاومة الكائنات المجهرية المسببة للعدوى للمضادات الحيوية تسبب القلق في جميع أنحاء العالم، لذا يحاول الباحثون إيجاد عقاقير جديدة باستعمال النباتات.

النباتات الطبية استعملت منذ الأمد في ظاهرة الإجهاد التأكسدي ومحاربة الأمراض المعدية. في إطار البحث عن مركبات نباتية جديدة ذات فعالية مضادة للمكروبات والأكسدة، قمنا باختيار ثلاث نباتات بعد بحث اثنو نباتي بمساعدة الأطباء الشعبيين وهم (*Salvadora persica* Garcin., *Eryngium maritimum* L., *Atractylis humilis* L.) في بحثنا الدراسة الفيطو كيميائية *Atractylis humilis* أثبتت وجود الفلافونويدات، السابونوزيدات، الكغدنوليدات والتانا في الجذور كما في الأوراق. من جهة أخرى، عدم وجود الالكلوبيد، كوماغين، فلافون اغليكون، تريتاربان وستيرول، الكينون وبوليايغونيد. عائد استخلاص السابونين من الجذور مهم (2,5%) أيضا مستخلص السابونين الجذري ذو فعالية ضد البكتيريا: *Bacillus cereus* و *Escherichia coli* (10 مم في 2 مغ / مل و 8 مم في 1,5 مغ / مل). سمح التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة لمستخلص السابونين الجذري بالحصول على 14 بقعة باستعمال أسلوب (البوتانول، حمض الخل، الماء) على دعامة من السيليلوز حيث أن محاولة معرفة نوع البقع بالاستعانة بالوثائق العلمية أدت إلى تمييز أحد المركبات تقريبا ألا وهو الديوسجينين.

وفي ما يخص *Eryngium maritimum* كشفت النتائج على نسبة معتبرة من الفينول الكلي والفلافونويد في مستخلص الأسيتون ($2,75 \pm 55,80$ مغ ب / غ م ج ، $0,013 \pm 1,505$ مغ م غ / غ م ج) مقارنة بمستخلص الميثانول ($4,69 \pm 46,72$ مغ م ب/غ م ج ، $0,016 \pm 1,138$ مغ م غ / غ م ج). أيضا لاحظنا أن القدرة على تثبيط الجذر الحر DPPH وإرجاع الحديد لمستخلص البيتانول هي الأعلى EC50 ($0,0104 \pm 0,0004$ مغ / مل و $0,1139$ $\pm 0,0112$ مغ/مل). أما ما يخص فعالية المستخلصات ضد البكتيريا فنلاحظ أن البكتيريا *Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes* قد تم تثبيط نموها بكل المستخلصات. لكن فقط مستخلص الميثانول والبيتانول من لديهم فعالية تثبيطية ضد *Pseudomonas aeruginosa*. أيضا، تجربة قدرة تثبيط الفطريات بينت أن مستخلص اسيتات اتيل ذو الفعالية الأكثر أهمية ضد كل الفطريات المجربة خصوصا *Aspergillus flavus* (10 مم في 50 مغ/مل).

أما *Salvadora pesica* كشفت النتائج على نسبة معتبرة من الفينول الكلي، التانا والفلافونويد في مستخلصات الأوراق ($0,17 \pm 67,32$ مغ م ب / غ م ج ، $3,18 \pm 39,31$ مغ م ب / غ م ج و $0,00 \pm 0,47$ مغ م غ / غ م ج). أيضا لاحظنا أن القدرة على تثبيط الجذر الحر DPPH وإرجاع الحديد لمستخلص الاسيتات اتيل للأوراق هي الأعلى EC50 ($0,07 \pm 11,8$ ميكروغ / مل و 6 ± 480 ميكروغ/مل). على عكس فعالية ضد الأكسدة، فان الفعالية التثبيطية لنمو البكتيريا الأكثر أهمية فهي تلك المتعلقة بمستخلص الالكالويد الجذري ضد *Bacillus cereus* (17 مم في 20 مغ / مل).

الكلمات المفتاح: *Salvadora persica*, *Eryngium maritimum*, *Atractylis humilis*، الفيطوكيميائية

،الفعالية ضد الأكسدة، الفعالية التثبيطية للحياض الدقيقة، الكروماتوغرافيا.

Table de matières

Introduction	13
Synthèse bibliographique	17
Chapitre 1 : Les plantes médicinales	18
1-Propriétés médicinales des plantes.....	18
2-Historique.....	19
3-Etude phytochimique des extraits des plantes.....	21
3-1-Introduction.....	21
3-2-Classification des métabolites secondaires.....	22
3-2-1-Les composés phénoliques.....	22
3-2-1-1-Les non flavonoïdes.....	23
3-2-1-1-1-Les acides phénoliques.....	23
3-2-1-1-2-Les stilbènes.....	23
3-2-1-1-3-Les lignanes et les lignines.....	23
3-2-1-1-4-Les coumarines.....	24
3-2-1-1-5-Les xanthones.....	24
3-2-1-2-Les flavonoïdes.....	24
3-2-1-2-1-Définition.....	24
3-2-1-2-2-Rôle des flavonoïdes.....	25
3-2-1-2-3-Les différentes classes de flavonoïdes.....	25
A-Les flavonoïdes.....	25
B-Les isoflavonoïdes.....	25
C-Les anthocyanes.....	26
D-Les tannins.....	26
E-Les quinones.....	26
3-2-2-Les alcaloïdes.....	26
3-2-3-Les terpénoïdes et les stéroïdes.....	27
3-2-3-1-Les saponosides.....	28
3-2-3-2-Les hétérosides cardiotoniques ou les cardénolides.....	28
Chapitre 2 : Les antioxydants	29
1-Introduction.....	29
2-Historique.....	29
3-Rappel sur le processus d'oxydation.....	29

4-Mécanisme d'action des radicaux libres.....	30
5-Les antioxydants	30
6-Les sources d'antioxydants	30
7-Test de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	32
Chapitre 3 : Les agents antimicrobiens	36
1-Introduction	36
2-L'infection microbienne	36
3-Morphologie et Structure des bactéries et des micromycètes	37
4-Bactériologie médicale	38
5-Les micromycètes	39
6-Les antimicrobiens	42
7-Technique de mesure de l'activité antimicrobienne	46
Chapitre 4 : Présentation des plantes étudiées	47
1- <i>Atractylis humilis</i>	47
1-1-La famille des Astéracées	47
1-2-Le genre <i>Atractylis</i>	48
1-3- <i>Atractylis humilis</i>	49
2- <i>Eryngium maritimum</i>	50
2-1-La famille des Apiacées.....	50
2-2-Le genre <i>Eryngium</i>	51
2-3- <i>Eryngium maritimum</i>	52
3- <i>Salvadora persica</i>	53
3-1-La famille des Salvadoracées	53
3-2-Le genre <i>Salvadora</i>	54
3-3- <i>Salvadora persica</i>	55
Matériels et Méthodes	56
Chapitre 1 : Le choix des plantes médicinales	57
1-Présentation de la zone d'étude.....	57
2-Enquête ethnobotanique.....	57
3-La sélection des plantes à étudier	58
Chapitre 2 : Etude phytochimique	60
1-Collection du matériel végétal.....	60
2-Extraction des composés phytochimiques	62
3-Réactions de caractérisation	62
4-Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins.....	63
5-Extraction des alcaloïdes, des flavonoïdes et des saponosides.....	66

Chapitre 3 : Activités Biologiques	68
1-Activité antioxydante.....	68
1-1-La réduction du fer (méthode de FRAP).....	68
1-2-Activité antiradicalaire par le test de DPPH	68
2-Activité antibactérienne	68
3-Activité antifongique	71
Chapitre 4 : Séparation chromatographique	72
1-Principe	72
2-Chromatographie sur couche mince analytique.....	72
Résultats et discussion	74
Chapitre 1 : Enquête ethnobotanique de quinze plantes médicinales	75
Chapitre 2 : <i>Atractylis humilis</i>	79
1-Réactions de caractérisation	79
2-Extraction des saponosides	79
3-Activité antibactérienne	79
4-Séparation chromatographique sur couche mince analytique des saponosides.....	80
5-Discussion	81
Chapitre 3 : <i>Eryngium maritimum</i>	85
1-Rendements.....	85
2-Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes	85
3-Activité antioxydante.....	86
4-Activité antibactérienne	88
5-Activité antifongique	90
6-Discussion	91
Chapitre 4 : <i>Salvadora persica</i>	93
1-Rendements.....	93
2-Dosage des phénols totaux, des tannins et des flavonoïdes.....	93
3-Activité antioxydante.....	94
4-Activité antibactérienne	95
5-Discussion	97
Conclusion	99
Références bibliographiques	102
Annexes	123

Liste des tableaux

Tableau 1 : Lieux, périodes de prélèvement et parties utilisées des espèces étudiées.....	54
Tableau 2 : Les différentes souches bactériennes utilisées.....	64
Tableau 3 : Milieux d'isolement spécifique de chaque souche utilisée.....	65
Tableau 4 : Les systèmes d'éluant testés pour chromatographie sur couche mince des saponosides des racines d' <i>Atractylis humilis</i>	70
Tableau 5 : Résultats du screening phytochimique des racines et des feuilles d' <i>Atractylis humilis</i>	77
Tableau 6 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des saponosides des racines d' <i>Atractylis humilis</i> relatives aux différentes souches bactériennes selon la méthode des disques	78
Tableau 7 : Résultats de séparation chromatographique sur couche mince des saponosides des racines d' <i>Atractylis humilis</i>	79
Tableau 8 : Rendements des différents extraits des racines d' <i>Eryngium maritimum</i>	84
Tableau 9 : Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes des racines d' <i>Eryngium maritimum</i>	86
Tableau 10 : Résultats de l'activité antiradicalaire DPPH et du pouvoir de réduction du fer des extraits des racines d' <i>Eryngium maritimum</i>	86
Tableau 11 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des extraits des racines d' <i>Eryngium maritimum</i> relatives aux différentes souches bactériennes selon la méthode des disques.....	89
Tableau 12 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des extraits des racines d' <i>Eryngium maritimum</i> relatives aux différentes souches fongiques selon la méthode des disques.....	90
Tableau 13 : Rendements des extraits des tiges et des feuilles de <i>Salvadora persica</i>	93
Tableau 14 : Dosage des phénols totaux, des tannins et des flavonoïdes des extraits des tiges et des feuilles de <i>Salvadora persica</i>	94
Tableau 15 : Résultats de l'activité antiradicalaire et du pouvoir de réduction de fer des extraits de <i>Salvadora persica</i>	95
Tableau 16 : Activité antibactérienne des extraits de <i>Salvadora persica</i> à différentes concentrations.....	97

Liste des figures

Figure 1 : Structure générale des phénols.....	12
Figure 2 : Structure générale des flavonoïdes.....	14
Figure 3 : Structure chimique du radical libre DPPH•(2,2 diphényle-1-picryl-hydrazyle).....	25
Figure 4 : Photos des plantes sélectionnées.....	50
Figure 5 : Carte administratif d'Algérie montrant les lieux de prélèvements.....	55
Figure 6 : Un broyeur- homogénéiseur.....	58
Figure 7 : Chromatogramme des saponosides des racines d' <i>Atractylis humilis</i> , solvant : BAW (4:1:5) sur cellulose.....	80
Figure 8 : Courbe d'étalonnage du pyrocatechol pour le dosage des phénols.....	85
Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonoïdes.....	85
Figure 10 : Pouvoir de réduction de fer des extraits des racines d' <i>Eryngium maritimum</i>	87

Liste des abréviations

ABTS : acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulphonique

ADN : Acide désoxyribonucléique

°C : degrés Celsius

CPG : chromatographie en phase gazeuse

DMSO: Diméthylsulfoxyde

FeCl₃ : Chlorure ferrique

g : Gramme

g : Gravité

h : Heure

CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance

J.C : Jésus Chris

MeOH : Méthanol

µg : Microgramme

µl : Microlitre

µm : Micromètre

mg : Milligramme

mM : Millimole

nm : Nanomètre

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium

Na₂SO₄ : Sulfate de sodium

N : Normalité

% : Pourcentage

SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise

SM : Spectrométrie de masse

t/mn : Tour/minute

CAT : Capacité *antioxydante* totale

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultraviolet

INTRODUCTION

Malgré l'arsenal thérapeutique existant au cours des dernières décennies, les traitements médicamenteux restent insuffisants face aux maladies, telles que les infections d'origine bactérienne ou fongique et les pathologies liées au stress oxydatif.

Dans le domaine des anti-infectieux, la découverte de nouvelles substances est le but de l'homme depuis toujours, car la cause principale des décès autrefois était les maladies infectieuses, malgré les excellentes défenses contre l'infection dont est pourvu le corps humain (Stanier et *al.*, 1966).

Ainsi, les infections microbiennes autrefois qualifiées de banales, sont maintenant classées parmi les infections graves pouvant engendrer un taux élevé de mortalité et de morbidité chez les immunodéprimés et les diabétiques (Obame Engonga, 2009).

En plus des maladies infectieuses, le stress oxydatif occupe une place importante en domaine de recherche. Il a été incriminé ces deux dernières décennies comme étant la cause insidieuse principale dans la genèse de diverses pathologies : maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer), cancer, athérosclérose, cataractes, vieillissement accéléré, arthrite rhumatoïde, diabète (Laroche, 2005).

Le moyen efficace pour lutter contre le stress oxydatif est l'utilisation des antioxydants. De nos jours, il y a un intérêt croissant pour la mesure et l'utilisation des antioxydants d'origine végétale pour la recherche scientifique (Ksouri et *al.*, 2009).

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont été une source inépuisable de médicaments pour les tradipraticiens pour guérir certaines pathologies souvent mortelles sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques (Djahara, 2014).

En effet les plantes représentent une immense source de chimiodiversité, avec souvent des structures très originales, l'extraction bruts, naturels de ces composés et l'isolation à partir d'espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle peuvent être des ressources prolifiques de nouveaux médicaments à action antimicrobienne ou antioxydante (Karmakar et *al.*, 2011 ; Djahara, 2014).

Comparée aux autres continents, la flore de l'Afrique qui a vu naître le premier hominidé de l'univers terrestre, semble connaître un frémissement moindre. Pourtant, cette dernière constitue une formidable source d'étude de milliers d'espèces végétales dont nombreuses sont encore inexploitées (Aberkane, 2006).

L'Algérie est le dixième plus grand pays dans le monde et le premier plus grand en Afrique. Il se prolonge au-dessus d'une aire de 2.381.741 km², dont plus de 85% est le Sahara et le désert subsaharien avec des précipitations légèrement moins de 150 mm par an. Le pays offre une mosaïque de systèmes écologiques décrits par l'interpénétration des éléments climatiques tropicaux, sahariens et méditerranéens démontrant des ressources biologiques riches et diverses (Boukhalifa, 2003 ; Statistique mondiale, 2014).

L'Algérie, pays connu pour ses ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. Son potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts et

constituent un axe de recherche scientifique et plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles (Aberkane, 2006).

Alors, le territoire algérien offre un espace qui reste vierge vu les conditions climatiques diverses qui conditionnent le métabolisme des plantes qui peut engendrer des produits jamais découvert sous d'autres cieux (Nacer, 2008).

Notre laboratoire et particulièrement notre équipe s'intéresse à la phytochimie et aussi aux activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire) des extraits végétaux de plantes médicinales dans le but d'élargir les perspectives de valorisation de produits naturels (Bendimered et *al.*, 2007 ; Bekkara Atik et *al.*, 2008 ; Bekhechi et *al.*, 2012).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux trois plantes, à savoir : *Salvadora persica*, une espèce non exploitée en Algérie, *Eryngium maritimum* qui est utilisée fréquemment en médecine traditionnelle locale et non exploitée et enfin, *Atractylis humilis* une espèce non connue en phytothérapie mondiale et non exploitée par les phytochimistes.

C'est en tenant compte de cet aspect que la présente étude est menée. Donc, cette thèse est partagée en 3 parties :

La première partie est essentiellement consacrée aux données bibliographiques.

Elle traite en premier chapitre les plantes médicinales : on commence par la propriété médicinale des plantes, ensuite l'historique de leur utilisation depuis des siècles jusqu'à ce jour et on termine par l'étude phytochimique des extraits de ces plantes.

Le deuxième chapitre est consacré aux antioxydants : les principales définitions sur le stress oxydatif et les antioxydants, les sources d'antioxydants et le principe des techniques d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* utilisées durant nos expérimentations.

Le troisième chapitre concerne les agents antimicrobiens : l'essentiel sur le monde microbien et l'infection microbienne, la description des espèces microbiennes utilisées durant nos expérimentations et les moyens de lutte contre ces germes (les antibiotiques, les antifongiques et les antimicrobiens d'origine végétale).

Alors que le dernier chapitre présente une connaissance détaillée des trois plantes médicinales choisies (*Atractylis humilis*, *Eryngium maritimum* et *Salvadora persica*) : la classification, la description botanique, l'usage thérapeutique et les travaux antérieurs.

La deuxième partie comporte la section expérimentale. Au préalable, un travail de terrain est effectué dont le but consiste à mener une enquête ethnobotanique auprès des tradithérapeutes. Cette enquête, nous a aidé à choisir les plantes à étudier (*Atractylis humilis*, *Eryngium maritimum* et *Salvadora persica*). La sélection de ces plantes est basé sur plusieurs critères (l'utilisation traditionnelle, la bibliographie, la fréquence d'utilisation par la population de la région, l'intérêt économique, l'abondance et le degré de toxicité).

Ensuite, en deuxième chapitre, on commence par la collection du matériel végétal.

Par ailleurs, on passe à l'extraction des composés chimiques afin de faire une analyse quantitative et qualitative de notre matériel végétal. En premier lieu, on présente les méthodes utilisées pour la caractérisation phytochimique d'*Atractylis humilis*. Puis, on passe aux différents dosages des composés phénoliques des espèces (*Eryngium maritimum* et *Salvadora persica*). Enfin, on termine ce chapitre par les extractions sélectives : les flavonoïdes des racines d'*Eryngium maritimum* ; les flavonoïdes et les alcaloïdes des feuilles et des tiges de *Salvadora persica* ; des saponosides des racines d'*Atractylis humilis*.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude des activités biologiques : les tests des activités antioxydantes FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) et DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyle) pour les extraits d'*Eryngium maritimum* et *Salvadora persica* ; les tests des activités antifongiques des extraits d'*Eryngium maritimum* ; les tests des activités antibactériennes des extraits d'*Atractylis humilis*, d'*Eryngium maritimum* et *Salvadora persica*.

Le quatrième chapitre est destiné pour la séparation chromatographique par CCM des saponines des racines d'*Atractylis humilis*.

La troisième partie regroupe les principaux résultats et leur discussion. Enfin, le manuscrit se terminera par une conclusion générale avec nos recommandations sur les travaux futurs.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les plantes médicinales

1-Propriétés médicinales des plantes

La plupart des moyens découverts par l'homme, dès son apparition, pour se soigner et remédier à ses maux sont d'origine végétale. Depuis l'antiquité, les hommes pour traiter les problèmes de santé, utilisèrent les ressources présentes dans leur environnement naturel. Les plantes tinrent une place très importante qui ne s'est jamais démentie (Aberkane, 2006).

Une plante médicinale est une plante dont un des organes possède des vertus curatives et même toxiques parfois, selon son dosage, dont la plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques. En Chine, au Mexique, à Cuba, en Egypte, au Ghana, en Inde, en Mongolie, les plantes médicinales sont cultivées de manière intensive. Les médecins mais aussi les praticiens traditionnels, les prescrivent. De même, divers types de traitement sont apparus pour répondre aux besoins différenciés des populations (Andrew, 2001 ; Aberkane, 2006).

Le traitement par ces plantes ou bien la phytothérapie se fait par la consommation ou l'utilisation en voie externe, de produits préparés à partir des plantes traitées de manière très sommaire : mélangée à de l'eau par infusion, décoction ou macération sans passer par une étape de sélection des molécules ; ce n'est pas seulement le principe actif qui est consommé, mais tout ce que contient la plante. Le hasard est toute l'attention accordée à l'observation ont permis peu à peu de découvrir de nombreuses vertus aux plantes : adoucissantes, antiseptiques, dépuratives, cardiotoniques (Andrew, 2001 ; Aberkane, 2006).

En général, le corps humain est bien mieux adapté à un traitement à base de plante qu'à une thérapeutique exclusivement chimique. L'homme et les plantes vivent côte à côte depuis des dizaines de milliers d'années. Il est habitué à consommer et à digérer différentes espèces de plantes, qui sont bien souvent appréciées pour leurs qualités aussi bien médicinales que nutritives. La ligne de démarcation entre les propriétés nutritives et les propriétés curatives n'est pas toujours très nette (Andrew, 2001).

S'il est capital de maîtriser l'action des différents principes pris isolément, la phytothérapie, à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Disséquer une plante médicinale pour isoler ses principes actifs ne suffit pas pour expliquer comment elle agit. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants. Ainsi, des chercheurs ont démontré que les principes actifs de nombreux végétaux agissent de manière complexe et combinée pour produire un effet thérapeutique global. Les plantes contiennent des centaines, voire des milliers de substances chimiques actives (Andrew, 2001).

Malgré le développement phénoménal de l'industrie pharmaceutique et chimique, l'intérêt populaire pour la médecine par les plantes n'a jamais cessé d'évoluer. Les plus grandes firmes pharmaceutiques savent que les forêts tropicales, les champs et les haies abritent des sources potentielles de médicaments précieux. Elles investissent d'importants capitaux pour trouver de nouvelles substances chimiques afin de les commercialiser. La recherche dans ce domaine devient automatique (Andrew, 2001).

2-Historique

Depuis la plus haute antiquité, l'homme dès son apparition, s'oriente rapidement vers le monde végétal omniprésent autour de lui pour se soigner et remédier à ses maux. Qu'est ce qui les a guidés à employer une plante plutôt qu'une autre ? Le hasard ? La religion ? La superstition ? L'expérience, certainement. Plusieurs théoriciens ont entrepris d'expliquer l'action des plantes sur l'organisme (Andrew, 2001 ; Aberkane, 2006).

Dés 3 000 avant J.C. la civilisation s'est épanouie en Egypte, au Moyen-Orient, en Inde et en Chine et l'utilisation des plantes est devenue plus élaborée. Les égyptiens furent parmi les premiers hommes qui ont enregistré sur leur papyrus leurs connaissances sur les vertus des plantes médicinales, ils faisaient appel à quelques 400 drogues dont la majorité était d'origine végétale. Le premier recueil consacré aux plantes médicinales, le papyrus égyptien Ebers, que l'on fait remonter à 1 500 avant J.C., est le plus ancien exemple encore conservé. Il dresse l'inventaire d'une douzaine de plantes médicinales, avec leurs modes d'utilisations, incantations et sorts (Andrew, 2001 ; Ahmim, 2008).

Les babyloniens eux, nous ont laissé des tablettes d'argiles cuites portant des listes de drogues soigneusement établies, les substances utilisées entre le Tigre et l'Euphrate, étaient presque les mêmes que celles des égyptiens, et les habitants de Babylone utilisaient plus de 64 espèces de plantes médicinales qu'ils cultivaient (Ahmim, 2008).

En Inde, les plus anciens documents religieux indous (Vagbhata et Rigveda) datant du 2^{ième} millénaire avant J. C, nous montrent que les indous ne donnaient la tâche de récolte des plantes médicinales qu'aux hommes de culte, pieux, et aussi la récolte doit se faire à jeun et dans des endroits difficiles d'accès (Ahmim, 2008).

Les chinois, voisin des indous, mentionnèrent dans leur ancien manuel de médecine intitulé « Ts'ao Kang Mou » que certaines plantes peuvent guérir des maladies allant de la stérilité jusqu'au cancer, et qu'elles peuvent jouer un rôle important dans le rajeunissement de l'être humain. Le Shen'ngong Bencaojing, écrit au 1^{ier} siècle après J.C., recense 252 plantes médicinales (Andrew, 2001 ; Ahmim, 2008).

Dans l'antiquité gréco-romaine, Hippocrate (460 avant J.C-377 avant J.C) grand médecin de l'antiquité fut appelé père de la médecine a écrit beaucoup d'ouvrages. Mais, il a fallu attendre la conquête d'Alexandre le Grand (356 avant J.C-323 avant J.C) pour que la phytothérapie grecque s'enrichisse de plus en plus des connaissances de l'extrême orient après avoir hérité des connaissances égyptiennes et babyloniennes. Théophraste (372 avant J.C-278 avant J.C) a écrit le premier traité grec de botanique (De Historia Des Plantes). En 1^{ier} siècle après J.C., le médecin grec Dioscoride a rédigé le premier herbier en Europe (De materiameâica). Cet ouvrage, qui recense environ 600 plantes, a eu une influence considérable sur la médecine occidentale. Il reste la référence principale en Europe jusqu'au 17^{ième} siècle (Andrew, 2001 ; Ahmim, 2008).

Galien (200 avant J.C-131 avant J.C), médecin personnel de l'empereur romain Marc Aurèle, eut également beaucoup d'influence. Le romain Pline l'Ancien (23 après J.C-79 après J.C), à la fois amiral, écrivain et naturaliste, a écrit une Histoire Naturelle en 37 volumes (Andrew, 2001).

Chez le monde arabe, il a fallu attendre la révélation d'islam en 6^{ième} siècle pour que la science prenne son essor dont la médecine et la phytothérapie. Après la chute des empires romains et perses, les musulmans héritèrent des connaissances accumulées dans l'extrême orient et dans la méditerranée, et c'est durant cette période que beaucoup de livres ont été traduits du grec, du latin et du perse (Ahmim, 2008).

En plus, grâce à leurs contacts avec les traditions chinoises et hindoues, les arabes ont largement développé leurs connaissances médicales et pharmaceutiques. Ils mélangeaient les plantes pour en accroître les effets et en améliorer le goût (Andrew, 2001). Parmi ces savants qui ont préservé et développé les acquis de la phytothérapie des anciennes civilisations on cite :

- ✚ Abou Bakr El Razi (865-925), qui parmi ses écrits les plus importants, le livre (El Haoui fi tib) qui fût un récapitulatif de toutes les connaissances depuis Hippocrate et les résultats de ces expériences et ces observations (Ahmim, 2008).
- ✚ Abu Ali Ibn Sina (980-1037), qui dès l'âge de 17 ans s'adonna à la médecine, et il écrivit son célèbre livre intitulé (El Kanoun fi Tib) qui servit de base à l'enseignement de la médecine en Europe jusqu'au 17^{ième} siècle. Il y introduisit les propriétés et l'emploi de plus de 811 plantes médicinales expérimentées par sa propre personne. Avicenne fut le premier à rédiger une nomenclature exhaustive (à l'époque) des plantes médicinales (Andrew, 2001 ; Ahmim, 2008 ; Pourmazâheri, 2012).
- ✚ Abol Ghâsem Khalaf ibn al-Abbas al-Zahravi connu sous le nom d'Abulcasis (936-1013) compte également parmi les médecins de renommés de l'époque. Contemporain d'Avicenne, il apporta sa contribution aux études médicales dans l'Andalousie. Son œuvre majeure (Al-Tasrif) est constituée de 30 articles dont 29 sont consacrés aux différentes maladies et à leur traitement à l'aide des herbes médicinales, notamment à base d'épices et de plantes aromatiques rares (Pourmazâheri, 2012).
- ✚ Ibn Abi Hajla El Tilimçani (1375), il est né à Tlemcen où il a grandi et fait ses études. Il a laissé au moins un livre : La médecine traditionnelle dans la lutte contre la peste (FNPSDR, 2012).
- ✚ Abou Ishak Ibrahim Ibn Ahmed Et Thaghri Et Tilimçani vécu au 14^{ième} siècle. Il a écrit un dictionnaire médical qui classe par ordre alphabétique les plantes médicinales en usage chez les anciens auxquelles, il a ajouté des données propres sur les médicaments les plus répandus à son époque. Bien que de nombreux médicaments soient mentionnés dans leur nom d'origine, l'intérêt de ce livre est qu'il cite le médicament et donne ses indications. Ce manuscrit existe à la bibliothèque nationale d'Alger (FNPSDR, 2012).
- ✚ Abderezak Ibn Hamadouche El Djazaïri né à Alger (1695-1785). Parmi les ouvrages qu'il a écrit, on peut citer : Kechf Erroumouz Fi Bayane el Aâchab (secret des plantes) où l'on peut noter sa parfaite connaissance des plantes médicinales de l'époque. El Jawhar El Makknoun Min Bahr El Kanoun, important ouvrage en quatre tomes où il traite des poisons, des maladies, des plantes et des drogues médicinales (Abid, 2006 ; FNPSDR, 2012).

Grâce à ces savants, on fonda de leur vivant un hôpital bien fourni en ouvrage de références médicales et médicinales, une salle d'enseignement, une pharmacie. Tandis qu'en Occident, à la même époque, ils continuaient à vivre plus ou moins sous le régime de la sorcellerie et de la magie (Pourmazâheri, 2012).

C'est qu'au début du moyen âge, que les érudits européens assimilent progressivement les leçons de la médecine arabe et ils prirent le relais suite à l'autorité des arabes et des musulmans sur la médecine jusqu'au 18^{ème} siècle (Andrew, 2001 ; Ahmim, 2008). C'est grâce à Paracelse (1493-1541) que l'herboristerie se transforma en pharmacie où les plantes médicinales servaient de base aux préparations des médicaments (Ahmim, 2008). Aussi, le professeur suisse Alexandre Wilhem Oswald Tschirch (1856-1969) qui avec son manuel de pharmacognosie (Handbuch de pharmacognosie) que la discipline de l'étude des plantes médicinales fût reconnue comme science à part entière (Ahmim, 2008).

La mise au point de nouveaux médicaments artificiels ou extraits de plantes médicinales en laboratoire rappelle le début du 19^{ème} siècle, lorsque les chimistes isolent des composants tel que la morphine à partir du pavot, ou la cocaïne à partir du coca. Dés lors, les chimistes réussissent à déterminer comment les substances chimiques extraites des plantes agissent sur l'organisme et à comprendre le fonctionnement du corps (Andrew, 2001).

C'est alors que les chimistes ont réussi à isoler les principes actifs de certaines plantes importantes poursuivant leurs recherches, au début du 20^{ème} siècle, ils ont fabriqué des molécules synthétiques. Désormais, croyait-on, ils allaient prescrire exclusivement des médicaments issus des cornues, les plantes ne servant plus que de réserves à molécules chimiques utiles (Andrew, 2001).

La notion de principe actif des plantes permet à la chimie de dominer le 21^{ème} siècle par les multiples travaux entrepris consistant à leur isolation. Les principes actifs, plus efficaces, plus faciles à doser sont préférés à l'ensemble de la plante dont l'efficacité est plus difficile à obtenir. Plus de 22 000 plantes médicinales sont répertoriées par l'organisation mondiale de la santé (O.M.S) mais seules certaines sont couramment exploitées aujourd'hui. Elles possèdent toutes une activité pharmacologique reconnue. L'Afrique possède à elle seul près de 65% des espèces végétales angiospermes recensées sur l'ensemble de la planète (Aberkane, 2006).

De nos jours presque toutes les substances peuvent être synthétisées, mais les expériences ont montré que certaines composantes chimiques reconnues des plantes ne peuvent pas toujours être reproduites, c'est ainsi que nous pouvons dire que la phytothérapie joue un rôle très important (Ahmim, 2008).

3-Etude phytochimique des extraits des plantes

3-1-Introduction

Les plantes renferment une part importante de composés classés en métabolites primaires et secondaires.

Les métabolites primaires se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont classés en quatre principaux groupes : les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Aberkane, 2006).

Les métabolites secondaires dont certains possèdent des vertus thérapeutiques sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Ils sont émis en très faible quantité et d'une grande variété structurale (plus de 200 000). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique (Aberkane, 2006 ; Muanda, 2010).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique (Muanda, 2010).

Ils constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti-carcinogènes (Epifano *et al.*, 2007).

Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt. A l'heure actuelle, cette opinion a changé, du fait de nombreuses recherches qui ont largement montrées que ces composés ne sont pas inertes et contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme. Ils sont soumis à d'importantes variations quantitatives et qualitatives, ce qui témoigne d'une dynamique biochimique incontestable (Brzozowska et Hanower, 1976).

Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers. D'où l'importance croissante des études consacrées à ces composés. Leurs modes d'action et leurs significations physiologiques ne sont pas encore suffisamment claires, d'où la place de plus en plus large qui revient aux études de ces composés et de leurs fonctions. On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes sont : les composées phénoliques, les alcaloïdes, les terpénoïdes et les stéroïdes (Muanda, 2010).

3-2-Classification des métabolites secondaires

3-2-1-Les composés phénoliques

Le terme « polyphénols » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux (Fleuriet *et al.*, 2005).

Près de 8 000 composés naturels appartiennent à cette famille ; ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyle (Figure 1). Selon le nombre d'unités phénoliques présents, on les classe en composés phénoliques simples et polyphénols. Par abus, on les appelle indifféremment composés phénoliques et polyphénols. Ils comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tannins, les coumarines, les lignanes, les lignines et les xanthones (Harborne, 1998 ; Stalikas, 2007).

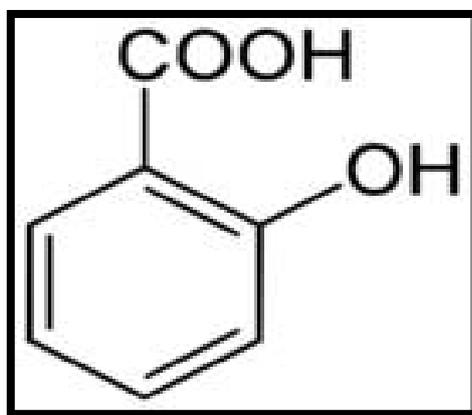


Figure 1. Structure générale des phénols (Chkarnat, 2013)

Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées) (Muanda, 2010).

3-2-1-1- Les non flavonoïdes

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels, on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et les xanthones.

3-2-1-1-1-Les acides phénoliques

On distingue tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque, composé d'un squelette à sept carbones. Ils sont représentés par les acides : p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique, et gentisique (Harborne, 1998 ; Perret, 2001).

D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C₆-C₃. Les composés les plus fréquents sont les acides : p-coumarique, caféique et sinapique (Singleton et *al.*, 1978 ; Goetz et *al.*, 1999). Sans négliger les phénols simples (cathécol, guaiacol, phloroglucinol) bien qu'ils soient rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Bruneton, 1999).

3-2-1-1-2-Les stilbènes

Ce sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité. Les plus abondants sont le resvératrol et l'acide lunularique (Harborne, 1998 ; Perret, 2001).

Ils sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL). Aussi, comme protecteur contre les maladies cardiovasculaires (Frankel et *al.*, 1993 ; Jang et *al.*, 1997).

3-2-1-1-3-Les lignanes et les lignines

Le terme de lignane désigne habituellement des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phényl propane. Les lignanes possèdent des propriétés cytostatiques et antimétaboliques (Bruneton, 1999). Les lignines sont des substances qui se déposent à la fin de la formation des parois primaires et secondaires, imprégnant principalement les micelles de cellulose de la lamelle moyenne et de la paroi primaire. Chimiquement, ce

sont des polymères provenant de la co-polymérisation d'alcools possédant une structure p-hydroxycinnamique (Bruneton, 1999).

3-2-1-1-4-Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone d'où furent isolées, pour la première fois, en 1820. Aujourd'hui, près de 1 000 composés coumariniques sont isolés à partir de plus de 800 espèces de plantes et à partir des microorganismes. L'intérêt pharmacologique des drogues à coumarines est limité (Bruneton, 1999 ; Iwueke et Nwodo, 2008).

3-2-1-1-5-Les xanthones

Ils sont formés par cyclisation des benzophénones résultant de l'addition d'unités dicarbonées sur un précurseur en C₆-C₁. On notera que plusieurs molécules de cette série sont des stimulants du système nerveux central (SNC), des fongicides, fortement antibactériennes, des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire et des anti-inflammatoires (Bruneton, 1999).

3-2-1-2-Les flavonoïdes

3-2-1-2-1-Définition

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ils sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Guignard, 1996).

Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles (Bruneton, 1999).

On les trouve dissout dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants des plastes en particuliers, les chromoplastes (Guignard, 1996). Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane C₆-C₃-C₆ (Figure 2) (Mamyrbékova-Békro, 2008).

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs (Milane, 2004).

Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000). 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanines (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich, 2006).

Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B (Heim *et al.*, 2002).

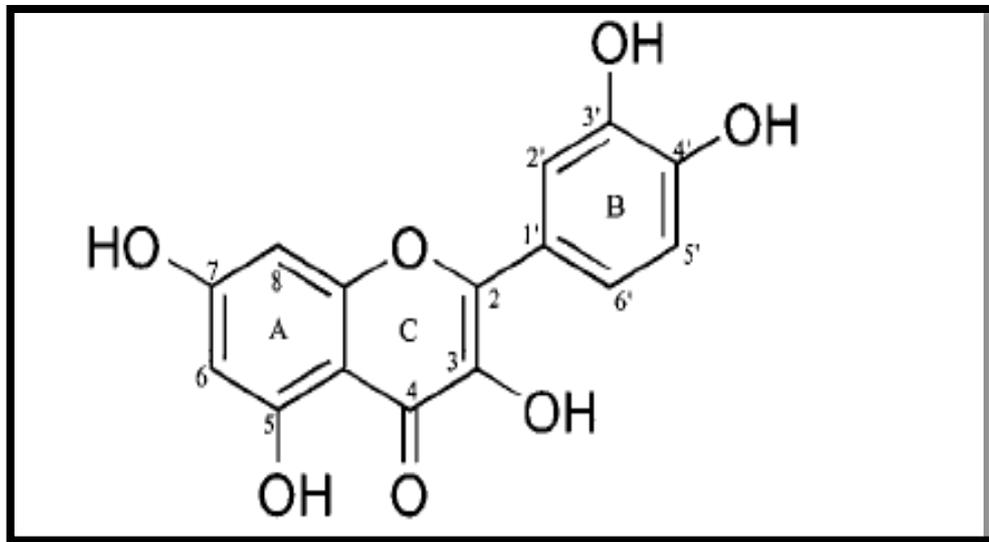


Figure 2. Structure générale des flavonoïdes (Heim et *al.*, 2002)

3-2-1-2-2-Rôle des flavonoïdes

a- Chez les plantes

Les flavonoïdes seraient impliqués dans un certain nombre de fonctions :

- Leur fonction principale semble être la coloration des plantes par leur rôle de pigments directement visibles : tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, auronnes et flavonols), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets, ou bien, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments : tel est le cas des flavones et des flavonols (Bruneton, 1999) ;
- Ils assurent le transport du pollen par les insectes attirés par la coloration de ces composés (Bruneton, 1999) ;
- Ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (Milane, 2004) ;
- Ils représentent un système de défense contre les microorganismes pathogènes (Koné, 2009).

b- Chez l'homme

Plusieurs propriétés biologiques ont été attribuées aux flavonoïdes : anticancérigènes, anti-inflammatoires, analgésiques, antiparasitaire, vasodilatateurs, antivirales, antibactériennes, ostéogènes, anti-athérogénique, anti-thrombotique et anti-allergénique (Koné, 2009).

3-2-1-2-3-Les différentes classes de flavonoïdes

A. Les flavonoïdes

Dans ce groupe, on distingue les chalcones, les auronnes, les flavones, les flavanes, les flavanones, les flavanols, les flavonols et les flavanonols (Heard, 1994).

B. Les isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes constituent une grande et très diversifiée sous classe des flavonoïdes. Ils sont presque spécifiques de la famille des Fabacées. Ils peuvent être classés en une douzaine de catégories structurales (isoflavones, roténoïdes). Leurs propriétés pharmacologiques sont peu connues (Muanda, 2010).

C. Les anthocyanes

Le terme d'anthocyanes, initialement forgé pour désigner la substance responsable de la coloration des fleurs du bleuet, s'applique à un groupe de pigments hydrosolubles responsables de la coloration rouge, rose, mauve, pourpre, bleue ou violette de la plupart des fleurs et des fruits. Ces pigments existent sous la forme d'hétérosides (les anthocyanosides) et leurs génines (les anthocyanidols), se sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium, ce qui souligne l'appartenance de ces molécules au vaste groupe des flavonoïdes au sens large (Bruneton, 1999).

Les anthocyanosides ont un rôle majeur dans la pollinisation et la dispersion des graines. Un fort pouvoir colorant et l'absence de toxicité les font de bons colorants naturels en industrie alimentaire. L'intérêt thérapeutique est pratiquement limité au domaine vasculaire (fragilité capillaire, insuffisance veineuse) (Bruneton, 1999).

D. Les tannins

Le terme tannin dérive de la capacité de tannage de la peau fraîche en la transformant en matériau imputrescible : le cuir. Les tannins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire, hydrosolubles, fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles en s'associant aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestifs. On distingue les tannins hydrolysables et condensés. (Bruneton, 1999, Alkurd et al., 2008).

➤ **Les tannins hydrolysables**

Ce sont des esters d'un sucre ou d'un polyol apparenté et d'un nombre variable de molécules d'acide phénol. Le sucre est très généralement le glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des tannins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés d'oxydation dans le cas des tannins ellagiques (Bruneton, 1999).

➤ **Les tannins condensés**

Ce sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent 4→8 ou 4→6 (Bruneton, 1999).

E. Les quinones

Les quinones étant issus de l'oxydation des phénols, on peut aussi s'attendre à trouver le motif quinonique dans différentes classes de métabolites secondaires. On trouve les benzoquinones, les naphthoquinones, les anthraquinones.

Pendant longtemps, certaines drogues à quinones ont été recherchées pour leurs propriétés tinctoriales (Bruneton, 1999).

3-2-2-Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde vient d'un mot arabe « al-qali » en se référant au carbonate de potassium que contiennent les cendres végétales (Osborn et Lanzoti, 2009). Ce terme a été introduit par W. Meisner au début du 19^{ème} siècle. La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910. Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés

physiologiques prononcées même à faible dose (Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007). Avec plus de 12 000 structures connues, les alcaloïdes représentent l'un des grands groupes de produits naturels (Osborn et Lanzoti, 2009).

Les alcaloïdes les plus connus sont : les alcaloïdes pyrrolizidiniques, tropaniques et quinoléiques (Koné, 2009).

Chez le végétal, les alcaloïdes existent sous la forme, soluble, sels (citrate, malate) ou sous celle d'une combinaison avec les tannins. La microchimie permet de montrer que les alcaloïdes sont le plus souvent localisés dans les tissus périphériques : assises externes des écorces des tiges, des racines et des téguments des graines (Bruneton, 1999).

La fonction principale de ces composés dans les végétaux n'est pas connue (Bruneton, 1999). Mais du point de vue pharmacologique, ils existent plusieurs applications : dépresseurs (morphine), stimulants (caféine), ganglioplégiques (nicotine), anesthésiques locaux (cocaïne), antitumoraux (ellipticine) (Bruneton, 1999).

3-2-3-Les terpénoïdes et les stéroïdes

Les terpénoïdes, appelés fréquemment les isoprénoïdes, constituent une large famille de produits naturels et comprend plus de 40 000 structures différentes (Osborn et Lanzoti, 2009). Ils dérivent d'un isoprène de « C₅ » d'où en fonction du nombre de molécules d'isoprène, ils sont classés en : Hémiterpènes (C₅), Monoterpènes (C₁₀), Sesquiterpènes (C₁₅), Diterpènes (C₂₀), Sesterpènes (C₂₅), Triterpènes (C₃₀), Tétraterpènes (C₄₀) et Polyterpènes (plus de C₄₀) (Dewick, 2002).

Les stéroïdes végétaux sont issus, comme les triterpènes, du mévalonate : le mécanisme de leur formation est légèrement différent de celui qui aboutit à la formation des triterpènes. Du point de vue structural, ils sont regardés comme des triterpènes tétracycliques qui ont perdu au moins trois méthyles. Le plus souvent, leur structure signe leur spécificité végétale : cardénolides cardiotoniques, alcalamines stéroïdiques, saponosides (Bruneton, 1999).

Les triterpènes sont caractérisés par une diversité structurale remarquable. Cette diversité chimique se traduit par des propriétés biologiques et pharmacologiques variées et des potentialités thérapeutiques dans les domaines les plus divers : cytostatiques, antiviraux, anti-inflammatoires, anti-œdémateuses, cytoprotecteurs, immunomodulatrices, analgésiques et antifongiques (Bruneton, 1999 ; Kazumasa et al., 2001; Jiri, 2003 ; Hua et al., 2006 ; Eder et al., 2008)

L'activité à l'encontre des champignons est bien établie *in vitro*, aussi bien à l'égard d'espèces phytopathogènes, qu'à l'encontre de divers *Candida* ou les dermatophytes. Elle est sans doute la conséquence de la réaction des triterpènes avec les stérols membranaires du micro-organisme (Bruneton, 1999).

3-2-3-1-Les saponosides

Les saponosides sont des substances non volatiles et des tensioactives largement répandus dans la nature et principalement en monde végétal (Oleszek, 2002). Le nom est venu du mot latin « sapon=savon » parce qu'ils moussent les solutions aqueuses après agitation. En Orient, ces composés ont été utilisés comme des savons d'où l'appellation commune des diverses espèces végétales riches en ces composés : *Saponaria officinalis* (soapwort), *Chlorogalum pomeridianum* (soaproot), *Quillaja saponaria* (soapbark) (Oleszek, 2002 ; Hostettman et Marston, 1995).

La plupart d'entre eux ont des applications commerciales comme médicaments, additifs, émulsifiants, précurseurs de synthèse d'hormone, édulcorants (Hostettman et Marston, 1995 ; Shan et al., 2001).

Les saponosides sont des molécules complexes composés par une partie aglycone et une partie glycoside. La partie aglycone divise les saponosides en deux groupes : les saponosides triterpènes et les saponosides stéroïdes (Oleszek et Bialy, 2006).

La combinaison entre une partie polaire et non polaire de leurs structures explique le caractère moussant en solution aqueuse (Kitagawa, 2002 ; Heng et al., 2006).

3-2-3-2-Les hétérosides cardiotoniques ou les cardénolides

Ils constituent un groupe bien individualisé et d'une grande homogénéité tant structurale que pharmacologique. Malgré une marge thérapeutique étroite et l'arrivée sur le marché de nouveaux isotropes synthétiques, les hétérosides cardiotoniques d'origine végétale demeurent des médicaments majeurs de l'insuffisance cardiaque (Bruneton, 1999).

Du point de vue structural, toutes les génines possèdent en commun le noyau tétracyclique habituel des stéroïdes. Cependant les oses rencontrés dans les hétérosides cardiotoniques sont étroitement spécifiques de ces molécules. L'activité cardiotonique est liée à la génine, tandis que la partie osidique n'intervient pas directement mais sa présence l'augmente et la module en faisant varier la polarité de la molécule (Bruneton, 1999).

Chapitre 2 : Les antioxydants

1-Introduction

Radicaux libres, espèces oxygénées activées (EOA), stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. Au début des années 2 000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusés des informations relatives aux antioxydants (Defraigne et Pincemail, 2007).

Actuellement, dans ce sujet médiatisé à outrance, un écart existe entre les messages délivrés par les scientifiques spécialistes du domaine et la sensibilité ou la perception qu'en ont les médecins spécialistes ou généralistes. Face aux liens évoqués entre les radicaux libres et l'apparition de certaines pathologies, certains réagissent négativement et affirment que rien n'est prouvé dans ce domaine. Alors que, pour la seule année 2003, plus de 45 000 publications ont été consacrées aux antioxydants ; d'autres s'enthousiasment (souvent avec excès) sur les vertus bénéfiques des antioxydants. Dans les deux cas de figure, il apparaît clairement que l'information en provenance des milieux de scientifiques n'est pas toujours correctement transmise et comprise (Defraigne et Pincemail, 2007).

2-Historique

Au milieu des années 50, parmi les premiers, Gerschman montre que l'oxygène, molécule pourtant indispensable à la vie, présente également une toxicité pour l'organisme (Gerschman et *al.*, 2001). Inspiré par ces travaux, Harman propose la «free radical theory of ageing» (Harman, 1956) : *via* la production des radicaux libres, l'oxygène est à l'origine du processus de vieillissement cellulaire. En 1969, date clé dans l'histoire du stress oxydant, les américains McCord et Fridovich isolent à partir des globules rouges humains un système enzymatique antioxydant : le superoxyde dismutase (SOD) (Pincemail et *al.*, 1990).

Dans la foulée de la découverte de la SOD, les scientifiques élaborent également de multiples expériences *in vitro* qui montrent la toxicité des radicaux libres responsables des dégâts cellulaires importants (Defraigne et Pincemail, 2007).

Grâce à l'ensemble de ces méthodes, l'efficacité des molécules à caractère antioxydant peut alors être testée *in vivo* dans divers modèles de stress oxydant animaux et humains (Defraigne et Pincemail, 2007).

3-Rappel sur le processus d'oxydation

Les mécanismes d'oxydation des composés biologiques insaturés sont souvent des réactions radicalaires avec l'oxygène moléculaire. Des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons UV, des radiations ionisantes et des métaux de transition (Ekoumou, 2003). Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont : l'oxygène singulier O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les peroxydes alkyles ROOH, le radical superoxyde O_2^{\bullet} , les radicaux hydroxyles OH^{\bullet} , les radicaux peroxydes ROO^{\bullet} et les radicaux alkoxydes RO^{\bullet} (Cavin, 1999).

4-Mécanisme d'action des radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. L'organisme se défend contre eux grâce aux enzymes antioxydants, comme la glutathion peroxydase contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidés par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium. Si ces systèmes de défense sont insuffisants, les radicaux libres ont tout le loisir d'être nuisible : ils s'attaquent alors aux membranes cellulaires dont les acides gras insaturés sont dénaturés ; ils agressent également les protéines, les microfibrilles de collagène, les acides nucléiques des chromosomes et l'ADN lui-même est transformé entraînant l'apparition des anomalies (Muanda, 2010).

Ce dysfonctionnement est à l'origine des phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré (Favier, 2003). En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (Pincemail *et al.*, 2002) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète et même des processus physiologiques tel que le vieillissement (Martinez-Cayuella, 1995 ; Lehucher –Michel *et al.*, 2001 ; Sorg, 2004 ; Valko *et al.*, 2007).

5-Les antioxydants

Un antioxydant est une substance qui en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable qui, de manière significative retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat. Il peut agir en supprimant les radicaux libres ou en empêchant leur formation ou encore en réparant les dommages causés par ceux-ci (Halliwell, 1991). Des activités antioxydantes liées aux saponines, aux triterpènes et aux esters gras dérivant tous des plantes ont été rapportées (Djeridane *et al.*, 2006). Mais l'activité antioxydante d'extraits de plante, la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux et aussi déterminée dans le but d'établir une corrélation essentielle entre teneur en composés phénoliques et activité antioxydante et ou entre teneur en flavonoïdes et activité antioxydante. Les antioxydants de synthèse tels que le butyl-hydroxy-anisole (BHA) et le butyl-hydroxy-toluène (BHT) sont certes très efficaces mais susceptibles de manifester des effets secondaires et voir même toxiques (Manian *et al.*, 2008). Plusieurs molécules à propriétés antioxydantes sont isolées des plantes (Lee *et al.*, 2000 ; Cakir *et al.*, 2003 ; Kumaran et Karunakaran, 2007). Il est donc louable de chercher des antioxydants naturels efficaces sans ou présentant moins d'effets secondaires pour remplacer les synthétiques ou pour plus de choix à partir des plantes alimentaires et médicinales (Koné, 2009).

6-Les sources d'antioxydants

En plus des substances propres à l'organisme, les médicaments, l'alimentation et les plantes peuvent être également des sources d'antioxydants (Ekoumou, 2003).

6-1-Les médicaments

Plusieurs agents thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéïnémiques, les β bloquants et les antihypertensifs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes. Le Probucol par exemple est un médicament qui en plus de ses effets reconnus dans la baisse du taux sanguin du cholestérol, prévient l'athérogénèse en agissant comme un antioxydant et en supprimant la modification oxydative des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Ekoumou, 2003).

6-2-La source alimentaire

L'organisme utilise les substances ingérées comme antioxydants (Ekoumou, 2003). Les principaux antioxydants sont :

6-2-1-La vitamine C ou l'acide ascorbique

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E. Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron, le persil, les agrumes (Ekoumou, 2003).

6-2-2-La vitamine E ou tocophérol

Elle prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxyles. Elle est retrouvée dans les huiles végétales (huile d'arachide, de soja, de palme, de maïs, de chardon, de tournesol et d'olives pressées à froid), ainsi que dans les noix, les amandes, le lait et les œufs (Ekoumou, 2003).

6-2-3-Le β -carotène

Il possède la capacité de capter l'oxygène singulet. Il est retrouvé dans les légumes verts, les épinards, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, le potiron, la papaye et d'autres fruits jaunes (Tolo, 2002).

6-2-4- Une source particulière d'antioxydants naturels (la plante)

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les plantes supérieures et dans toutes les parties de la plante (Ekoumou, 2003).

6-2-4-1-Les flavonoïdes

Ils constituent un groupe de métabolites secondaires les plus répandus parmi les plantes, et par conséquent également un des groupes les plus étudiés. Ils sont retrouvés dans presque toutes les parties de la plante à différentes concentrations où ils jouent un rôle déterminant dans le système de défense comme antioxydants. Les flavonoïdes sont largement présents dans les fruits, les légumes et le thé (Ekoumou, 2003).

6-2-4-2-Les xanthonnes

Des études sur la mangiférine ont démontré que ces polyphénols possèdent également de très intéressantes propriétés d'inhibition envers la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs des radicaux libres contre les anions superoxydes (Ekoumou, 2003).

6-2-4-3-Les coumarines

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles (Ekoumou, 2003).

6-2-4-4-Les caroténoïdes

Ce sont des constituants membranaires des chloroplastes. Ils forment un groupe de pigments liposolubles et contribuent à la coloration jaune, orange ou rouge des fruits et des légumes. Ils sont retrouvés souvent dans les plantes alimentaires. Les caroténoïdes réagissent avec l'oxygène singulet, les radicaux peroxydes et alcoyles en capturant les radicaux libres (Ekoumou, 2003).

6-2-4-5-Dérivés d'acides phénoliques et divers composés phénoliques

Le nombre des publications concernant l'activité antioxydante des acides phénoliques et de leurs dérivés est considérable. La plupart de ces composés sont des dérivés de l'acide hydroxycinnamique, plus exactement des dérivés des acides coumarique, caféique, férulique et chlorogénique. Ils sont présents dans de nombreux fruits et légumes soit sous forme libres soit sous forme de dérivés. On le retrouve principalement dans le café, les prunes, les myrtilles, les pêches, le raisin et les pommes (Potterat, 1997).

Ces composés possèdent des activités antioxydantes et antiradicalaires. Ainsi, l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique captent non seulement les radicaux superoxydes produits par le système NADPH par méthosulfate de phénazin, mais présentent en plus de fortes activités antioxydantes et antiradicalaires envers le radical DPPH (Potterat, 1997).

Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol est le composé qui est le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin, possède de fortes propriétés antioxydantes (Ekoumou, 2003).

6-2-4-6-Les tannins

Ils présentent des propriétés antioxydantes significatives. On a pu démontrer qu'ils inhibent aussi bien l'auto-oxydation de l'acide ascorbique et du linoléate que la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes. Les tannins agissent en donneurs de protons face aux radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique (Ekoumou, 2003).

Ils sont par conséquent de très bons capteurs de radicaux libres. Un exemple très souvent relaté est celui du thé vert. Les effets bénéfiques des polyphénols du thé vert, particulièrement le gallate d'épigallocatechine, sont attribués à leurs propriétés antioxydantes et à leurs capacités de capter des radicaux libres (Ekoumou, 2003).

6-2-4-7-Les lignanes

Les plus étudiés du point de vue de leurs activités antioxydantes sont les dérivés bifuranyles des graines de sésame. La forte résistance à la détérioration oxydative de l'huile de sésame a suscité depuis plusieurs années de nombreuses recherches sur les graines de sésame. Les lignanes diarylfuranofuraniques tels que le sésaminol ont démontré des propriétés antioxydantes expliquant ainsi la stabilité de cette huile (Ekoumou, 2003).

7-Test d'activité antioxydante *in vitro*

Ces dernières années, l'intérêt porte aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été

développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Sanchez-Moreno, 2002 ; Marc et *al.*, 2004 ; Huang et *al.*, 2005). L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation (Popovici et *al.*, 2009).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent, il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (De Gaulejac et *al.*, 1999 ; Hua et *al.*, 2008 ; Tabart et *al.*, 2009).

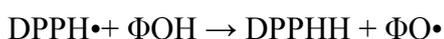
7-1-La méthode de DPPH

7-1-1-Principe

Du point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant SH-, NH- et OH- groupes (Salah et *al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles en provenance de thé vert, des jus de fruits et des raisins, pépins et pulpes, très riches en composés phénoliques (Yi-Zhong et *al.*, 2006 ; Hatzidimitriou et *al.*, 2007).

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyle (α,α -diphényl- β -picryl-hydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-Williams et *al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 3). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, le DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm. Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes : (i) la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ; (ii) la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) (Nanjo et *al.*, 1996 ; Huang et *al.*, 2005).

Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH. Alors, il se transforme en une molécule stable DPPHH (Sanchez-Moreno et *al.*, 1998 ; Molyneux, 2004) :



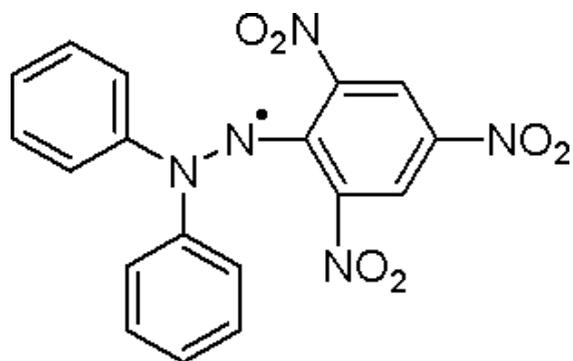


Figure 3. Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 diphényle-1-picryl-hydrazyle) (Popovici et al., 2009)

7-1-2-Evaluation du potentiel antiradicalaire

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de DPPH et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction (Sanchez-Moreno et al., 1998 ; Scherer et Godoy, 2009).

Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité antiradicalaire en pourcentage % RSA (Radical Scavenger Activity), où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) a un temps t :

$$[\% \text{ RSA} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs t}) / \text{Abs contrôle} \times 100\%] \text{ (Molyneux, 2004).}$$

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox R (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (Molyneux, 2004).

L'indice relative % RSA montre seulement la capacité de l'échantillon, à une concentration fixée, de réduire ou non les radicaux et dans beaucoup de cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène l'augmentation de ces indices relatifs (Sanchez-Moreno et al., 1998).

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par EC₅₀ (the median effective concentration) de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son EC₅₀ est petite (Sanchez-Moreno et al., 1998).

7-2-Réduction de fer ou FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

Comme son nom l'indique, cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺). En effet le Fe³⁺ participe à la formation du radical

hydroxyle par la réaction de Fenton. Le Fe^{2+} à un pH faible forme un complexe avec la 2,4,6-Tris-(2-Pyridyl)-1,3,5-Triazine (TPTZ) de couleur bleue qui a une absorption maximale à 594 nm. Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 594 nm du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester avec celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en Fe^{2+} (Liu et *al.*, 1982 ; Benzie, 1996).

Le test de FRAP est un test rapide et simple. La réaction est reproductible et linéairement reliée à la concentration molaire des antioxydants présents sur une gamme très large de concentrations (Benzie et Strain, 1996).

Chapitre 3 : Les agents antimicrobiens

1- Introduction

L'homme vit dans un environnement peuplé d'un grand nombre de microorganismes qui sont présents dans l'air, dans le sol, dans les eaux douces, dans les eaux marines, à la surface de la peau et les muqueuses ainsi qu'au niveau du tube digestif, de l'appareil respiratoire et de l'appareil urinaire. Ces microorganismes sont constitués par les bactéries, les virus et les champignons microscopiques (Khiati, 1998).

Le monde bactérien est très vaste et les bactéries peuplent notre environnement. Elles assurent à la surface du globe, sur le sol et dans les eaux d'innombrables fonctions ; elles exercent des actions bénéfiques (bactéries fertilisantes du sol), mais d'autres peuvent provoquer des infections chez les plantes, les animaux et également chez l'homme (Khiati, 1998).

Les champignons sont cosmopolites, ils sont retrouvés partout dans la nature. Ils jouent un rôle essentiel dans le recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir des sources carbonées externes (hétérotrophie). Les champignons microscopiques (micromycètes) peuvent être à l'origine d'infections humaines parfois redoutables. Ces champignons, habituellement microscopiques, deviennent dans certaines circonstances, visibles dans notre environnement. C'est ce que l'on appelle couramment les moisissures, véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères recouvrant des substrats divers (fruits ou végétaux en décomposition, vieux murs et tapisserie), et capables de produire des quantités extraordinaires de spores (Chabasse et *al.*, 2002).

Les champignons, partout présents, établissent aussi avec les espèces animales ou végétales des interactions qui vont du saprophytisme au parasitisme, en passant parfois par le commensalisme, ou encore participent à des phénomènes symbiotiques (Chabasse et *al.*, 2002).

2-L'infection microbienne

L'infection est la conséquence du développement, dans un organisme sain, de microorganismes pathogènes : bactérie, champignons, virus ou autres. Elle résulte de la rupture d'équilibre qui existe entre le germe et l'hôte. Ce déséquilibre provient donc soit d'une diminution des défenses du sujet (congénitale ou acquise), soit d'un accroissement de virulence des germes (Khiati, 1998).

Le monde bactérien comprend plusieurs milliers d'espèces mais, seulement près d'une centaine qui sont pathogène pour l'homme et l'animal. Une bactérie pathogène est susceptible d'induire, lorsqu'elle infecte un hôte, une maladie se traduisant par des signes anormaux, l'un des plus constants étant la fièvre. Mais il faut distinguer, les pathogènes authentiques qui déclenchent régulièrement une maladie chez des individus aux défenses immunitaires normales, des pathogènes dits opportunistes qui, dans la grande majorité des cas, ne sont à l'origine d'infections que chez des sujets aux défenses immunitaires altérées (Leclerc et *al.*, 1995a).

Le pouvoir pathogène des champignons peut s'exprimer de diverses façons (Chabasse et *al.*, 2002). Dans la vie courante, ils sont capables de provoquer d'importants dégâts. Dans le domaine agricole, la contamination fongique des denrées alimentaires, destinées à l'homme ou à l'animal, est le principal dommage qui va entraîner de nombreux problèmes. Ainsi, la présence indésirable des moisissures modifie

l'aspect des produits alimentaires, dû notamment à la production des pigments, comme par exemple un pigment foncé, la mélanine (Butler et Day, 1998). Le développement de ces champignons sur les aliments peut leur donner des odeurs de moisi. Il y a donc une réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire de la denrée, et une baisse du rendement des récoltes. Les métabolites produits par ces champignons lors de leur croissance sont aussi des éléments majeurs dans l'altération des denrées alimentaires (Dao, 2005).

Des manifestations dans la qualité organoleptique (en modifiant le goût de la denrée par exemple), mais aussi de graves problèmes sanitaires surgissent, comme par exemple des risques d'intoxication due à la présence des mycotoxines. Ainsi, l'apparition des mycoses et des allergies chez l'homme peut résulter de l'ingestion des denrées contaminées par des moisissures. Dans certains pays de l'Est de l'Europe, il a été démontré que la néphropathie endémique des Balkans (cancer du rein et des voies urinaires) est liée à la consommation des céréales contaminées par l'ochratoxine A (Krogh, 1987).

Chez l'être humain les maladies provoquées par les champignons microscopiques sont appelées les mycoses. Elles sont à l'origine de plusieurs infections qui peuvent être soit superficielles, sous-cutanées ou encore systémiques (Dao, 2005). Le développement du champignon dans l'organisme humain ou animal passe par une colonisation, invasion et dissémination (Chabasse et *al.*, 2002).

Chez les végétaux les maladies provoquées par les champignons microscopiques sont appelées des maladies cryptogamiques. Les différentes formes de maladies cryptogamiques représentent environ 90% des maladies des végétaux. Pour que la maladie d'une plante se développe, trois composantes sont nécessaires : la plante, le pathogène, qui doivent se mettre en contact et interagir, et les conditions de l'environnement qui favorisent la prolifération du pathogène (Bouزيد, 2002). Une série d'événements s'opère et conduit au développement de la maladie. Ces événements sont l'inoculation, la pénétration, l'infection, la dissémination du pathogène et la conservation du pathogène (Bouزيد, 2002).

3- Morphologie et Structure des bactéries et des micromycètes

3-1-Les bactéries

Les bactéries sont les plus petits organismes connus doués de métabolisme et capable de croître et de se diviser aux dépens des substances nutritives, leur diamètre est habituellement d'environ 1 μm (Leclerc et *al.*, 1995b). Ils sont constitués d'une seule cellule dépourvue d'un vrai noyau. Elles contiennent un seul chromosome qui se présente sous la forme d'un long filament d'ADN pelotonné sur lui-même.

Lorsqu'une cellule bactérienne est placée dans un milieu convenable qui assure ses besoins nutritifs, elle va se multiplier en se divisant en deux. Selon les conditions d'environnement, une bactérie peut se trouver sous deux états principaux :

- **l'état végétatif** ou de croissance,
- **l'état de repos** où elle fait un minimum d'échange avec l'extérieur, qui lui permet de rester vivante mais sans croissance (Petignat et *al.*, 2006).

Certaines bactéries ont le pouvoir de se transformer en petites unités ovales ou sphériques douées d'une résistance extraordinairement élevée, lorsque le milieu s'épuise en éléments nutritifs ou lorsque les

conditions physico-chimiques extérieures changent. Ils peuvent retourner à l'état végétatif lorsque les conditions deviennent favorables. Ce sont les spores (Leclerc et *al.*, 1995b).

Les formes des bactéries sont extrêmement diverses : la forme sphérique ou coccoïde, la forme cylindrique ou en bâtonnet, et la forme spiralée ou hélicoïdale (Leclerc et *al.*, 1995b). En plus de la forme, les bactéries sont classées selon une coloration spécifique en bactériologie c'est la coloration de Gram. Cette coloration permet de classer les bactéries en deux grands groupes, les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Petignat et *al.*, 2006).

3-2-Les micromycètes

Les micromycètes sont des eucaryotes non photosynthétiques, multicellulaire et immobiles. L'élément structural de base est l'hyphe. Ramifiés entre eux, plusieurs hyphes forment le mycélium ou le thalle pluricellulaire. Les thalles sont cloisonnés (cellules séparées) ou siphonnés (sans séparation entre les cellules). Des structures fructifères et reproductrices servent à la multiplication et à la dissémination de l'espèce : ces structures sont d'origine végétative ou sexuelle (Leclerc et *al.*, 1995b). Les spores asexuées sont produites, soit à l'intérieur d'un sac fermé (sporange) porté par un filament spécialisé (sporangiophore) et on les appelle les sporangiospores, soit par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée appelée cellule conidiogène porté par un filament spécialisé (conidiophore) et on les appelle des conidiospores (Chabasse et *al.*, 2002).

4-Bactériologie médicale

Avec la diversité des bactéries responsables des maladies infectieuses plus ou moins graves, il ne sera étudié que celles faisant l'objet des expérimentations pratiques.

4-1-Bactéries à Gram négatif

4-1-1-*Pseudomonas aeruginosa*

Elle est bâtonnet, mobile par des cils polaires, aérobie stricte. La production d'un pigment la pyocyanine, pigment phénazinique, soluble dans l'eau et le chloroforme est spécifique de cette espèce. *P. aeruginosa* est un germe ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux, capable de se multiplier à 41°C, fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, il est aussi particulièrement résistant aux antibiotiques et même aux antiseptiques. En milieu hospitalier, il est à l'origine des surinfections et des suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficiência locale ou générale (brûlés et cancéreux), et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires et cutanées). De même, il est phytopathogène (Leclerc et *al.*, 1995a).

4-1-2-*Salmonella typhimurium*

C'est une sous-espèce de l'espèce *Salmonella enterica*. Elle appartient à la famille des entérobactéries. C'est une bactérie mobile, bâtonnet et aéroanaérobie facultatif. Elle se multiplie entre 7°C et 45°C avec un optimum à 35°C/37°C. Elle peut engendrer des toxi-infections alimentaires (Leclerc et *al.*, 1995a ; Delamare, 1992), qui peuvent déterminer des infections très graves chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales (Berche et *al.*, 1989). La lutte contre la maladie est difficile du fait de la multi-résistance

de la bactérie aux antibiotiques. Un manque d'hygiène est très souvent à l'origine de la transmission (Acha et Szyfres, 1982).

4-1-3- *Escherichia coli*

C'est un bâtonnet, aéroanaérobie facultatif, appartenant à la famille des entérobactéries. Elle présente parmi la microflore digestive de l'homme et des animaux à sang chaud. Mais certaines souches d'*E. coli* sont pathogènes car elles ont acquis des facteurs de virulence (ANSES, 2011a).

Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents. *E. coli*, un hôte commun de l'intestin de l'homme (10^8 /g de selles), et des animaux ; elle est recherchée à ce titre, comme germe témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments. A l'intérieur de l'espèce, il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastroentérites et diarrhées), leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes (Leclerc et *al.*, 1995a).

4-1-4-*Proteus mirabilis*

Elle est caractérisée par sa grande mobilité, et elle est vraisemblablement d'origine tellurique. C'est un bâtonnet, aéroanaérobie facultatif, appartenant à la famille des entérobactéries. Elle peut induire des infections des voies urinaires, des infections cutanées (surinfections des plaies chirurgicales et brûlures), des infections des voies respiratoires et même des septicémies (Berche et *al.*, 1989).

4-1-5-*Klebsiella pneumoniae*

C'est un bâtonnet, aéroanaérobie facultatif, appartenant à la famille des entérobactéries. Elle est commensale, et actuellement responsable d'un grand nombre de complication infectieuse en milieu hospitalier. Les infections broncho-pulmonaires souvent dues à *K. pneumoniae* (1 à 5% de toutes les pneumonies bactériennes). Autres infections secondaires dues à des soins ou des gestes chirurgicaux causées par un matériel souillé (la mortalité reste élevée malgré une antibiothérapie adaptée) (Berche et *al.*, 1989). En plus, cette bactérie est multi-résistante (Jarlie et *al.*, 2004).

4-1-6-*Enterobacter cloacae*

C'est un bâtonnet, aéroanaérobie facultatif, appartenant à la famille des entérobactéries. Elle est commensale, et actuellement responsable d'un grand nombre de complication infectieuse en milieu hospitalier. Elle provoque des infections urinaires nosocomiales. Autres infections secondaires dues à des soins ou des gestes chirurgicaux causées par un matériel souillé (la mortalité reste élevée malgré une antibiothérapie adaptée) (Berche et *al.*, 1989).

4-1-7-*Citrobacter freundii*

C'est un bâtonnet, aéroanaérobie facultatif, appartenant à la famille des entérobactéries. Elle fait partie du groupe des coliformes intestinaux qui sont des indicateurs de contamination fécale, recherchée dans l'eau et les aliments (Leclerc et *al.*, 1995a). *Citrobacter freundii* est rarement observé dans les infections urinaires,

respiratoires ou septicémiques uniquement chez les malades immunodéprimés. Ces bactéries commensales posent un problème de diagnostic différentiel avec les Salmonelles (Berche et *al.*, 1989).

4-2-Bactéries à Gram positif

4-2-1-*Bacillus cereus*

Il s'agit d'un bâtonnet sporulant et aéroanaérobie facultatif. La température optimale de croissance est entre 30°C et 37°C. *B. cereus* est responsable d'intoxications se traduisant par des symptômes émétiques et des toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques. Elle est retrouvée sous forme de spores dans le sol, à des concentrations de l'ordre de 10⁴ à 10⁵ spores par gramme de sol. La principale voie de transmission de cette bactérie à l'homme est alimentaire. En effet, de par son abondance dans le sol et la résistance de ses spores, *B. cereus* peut contaminer pratiquement toutes les catégories d'aliments et particulièrement les végétaux. Des infections à *B. cereus*, différentes de celles transmises par les aliments ont été décrites. Les portes d'entrée de l'infection sont des contaminations de plaie ou de cathéter ou encore *via* les injections pratiquées par les toxicomanes (ANSES, 2011b).

4-2-2-*Listeria monocytogenes*

Elle est un petit bacille (0,5 - 2 µm x 0,5 µm), isolé ou en chaînettes, mobile à 20-25°C, non sporulé, aéroanaérobie facultatif. La température optimale de croissance est entre 30°C et 37°C. Elle est responsable d'une maladie touchant l'homme et les animaux appelée la listériose. *L. monocytogenes* est une bactérie ubiquiste, tellurique, très largement répandue dans l'environnement, et résistante dans le milieu extérieur (sol, lacs, rivières, eaux d'égouts ou de baies et la végétation principalement en décomposition). La transmission par voie alimentaire est de loin la transmission la plus importante (99% des cas). La transmission directe est possible mais rare (ANSES, 2011c).

4-2-3- *Staphylococcus aureus*

Elle est une bactérie sphérique (cocci), qui se divise sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, elle est immobile, anaérobies facultatifs. *Staphylococcus aureus* est un germe ubiquiste largement distribué dans l'environnement naturel de l'homme, mais elle l'est plus fréquemment et en plus forte densité sur les surfaces cutano-muqueuses des mammifères. Elle est prédominante chez l'homme et autres mammifères, la cavité nasale de l'homme est sa niche préférentielle. Elle est responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses, mais aussi osseuses, digestives et septicémiques (Leclerc et *al.*, 1995a).

4-2-4- *Enterococcus faecalis*

C'est des coques d'aspect ovoïde en courtes chaînes, immobiles, aéroanaérobies facultatifs et pousse à 45°C comme tous les entérocoques. *E. faecalis* fait partie de la flore digestive de l'homme et des animaux. Elle peut, par contamination de voisinage, coloniser la peau, notamment la région périnéale et le vagin. Comme les entérocoques, cette espèce peut se rencontrer dans l'environnement (eaux usées, eau douce et sol), et contaminer les aliments. *E. faecalis* est principalement responsable d'infections urinaires. Les infections peuvent avoir un caractère nosocomial (Archambaud et Clave, 2007).

5-Les micromycètes

5-1-*Aspergillus*

Ce genre fait partie des *Deutéromycètes* (champignons imparfaits, reproduction asexuelle), ordre des *Hyphomycètes*, famille des *Moniliaceae* qui sont des champignons à conidiophores (Dao, 2005). Ils sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. A l'examen microscopique, ils sont identifiés par la présence des têtes aspergillaires. Ils poussent à 22-25°C et à 37°C pour l'espèce thermophile (*A. fumigatus*). Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans le milieu extérieur. Ce sont des champignons ubiquistes : ils se rencontrent aussi bien en milieu rural (silos à grains, foin, paille tassée et humide, céréales ou fruits moisissés et matières organiques en décomposition) qu'en milieu urbain, et aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations (poussières accumulées derrière les meubles, cadres, faux plafonds, conduits d'aération et plantes en pots). Les différentes enquêtes aéromycologiques révèlent que les spores aspergillaires se situent au 4^e rang des spores fongiques de l'air (après les spores d'*Alternaria*, de *Cladosporium* et de *Penicillium*) (Chabasse et al., 2002).

Les *Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes. Leur développement chez l'hôte nécessite l'existence de conditions favorables, locales (cavernes tuberculeuse et cancer broncho-pulmonaire) ou générales (corticothérapies prolongées et SIDA). En outre, des facteurs environnementaux (abondance des spores aspergillaires dans l'air inhalé lors de la manipulation du fumier, du foin moisissé) ou liés au champignon (taille des spores aspergillaires, thermotolérance et facteurs de virulence) contribuent à la fréquence de la pathologie aspergillaire. Les *Aspergillus* sont ainsi à l'origine de diverses mycoses. Ils sont principalement des pathogènes respiratoires. *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus pathogène, responsable d'environ 80 à 90% des aspergilloses humaines suivie par *Aspergillus flavus* qui est un agent d'aspergillose pulmonaire ou généralisée chez l'immunodéprimé (Chabasse et al., 2002).

5-2-*Alternaria*

Ce genre fait partie des *Deutéromycètes* (champignons imparfaits, reproduction asexuelle), ordre des *Hyphomycètes*, famille des *Dematiaceae*. Ils ont des hyphes septés, ramifiés et certains filaments sont pigmentés en brun. En microscope optique, ils sont identifiés par la présence des conidies brunes, pluricellulaires, d'aspect piriforme ou ovoïde avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important (dictyospore). Les *Alternaria* sont des saprophytes ou des parasites des plantes très répandus. Chez l'immunodéprimé, ils sont impliqués dans des lésions de phaeohyphomycoses cutanées ou sous-cutanées, plus rarement profondes. Ce sont très rarement des agents d'onychomycoses (Chabasse et al., 2002). *Alternaria alternata* est pathogène pour l'homme, les mammifères et elle est aussi phytopathogène (OFEPF, 2004).

5-3-*Cladosporium*

Ce genre fait partie des *Deutéromycètes* (champignons imparfaits, reproduction asexuelle), ordre des *Hyphomycètes*, famille des *Dematiaceae*. Ces hyphes sont septés, pigmentés. Les conidiophores sont plus fongés de longueur variable. Les conidies formées à l'extrémité des conidiophores sont de grande taille, uni

ou pluricellulaire ; les suivants sont les plus petites et unicellulaire. Les conidies sont des dictyospore. Les *Cladosporium* sont largement retrouvés dans le sol et sur de nombreux végétaux. Ils sont souvent isolés de l'air ambiant (Chabasse et *al.*, 2002). L'espèce type *Cladosporium herbarum* est pathogène pour l'homme (OFEFP, 2004).

6-Les antimicrobiens

6-1-Les Antibiotiques

6-1-1- Introduction

Pour de multiples raisons, il est apparu utile et, dans certains cas indispensable, de contrôler le développement des microorganismes, car certaines bactéries sont hautement pathogènes pour l'homme ou l'animal et qu'il fallait tout naturellement se protéger de leurs effets néfastes et empêcher la transmission des maladies infectieuses. Les bactéries ne sont pas seulement nuisibles pour l'homme et l'animal, mais d'autres produits, substances ou matériaux peuvent être détruits ou altérés sous l'effet de leur multiplication : détérioration des produits alimentaires ; plusieurs monuments d'un grand intérêt historique sont dégradés (*maladie de la pierre*) ; les canalisations aussi peuvent être perforées. Alors, il est devenu indispensable à l'homme de mener une lutte contre l'envahissement des microorganismes, pour conserver ses biens, son potentiel industriel, son patrimoine artistique et pour "*protéger son existence*" même. Les moyens de lutte sont nombreux, les agents physiques (température et rayonnements), les agents chimiques (métaux lourds, chlore et dérivés et alcools) sont très actifs mais nocifs, aussi bien pour les bactéries que pour les cellules humaines ou animales. Mais il y a d'autres agents, possédants une "toxicité sélective" : ils s'opposent à la multiplication bactérienne sans nuire aux cellules de l'hôte, et ils sont utilisés pour cette raison en thérapeutique, ce sont les "Antibiotiques" (Leclerc et *al.*, 1995a). Les antibiotiques sont utilisés dans la lutte contre les infections bactériennes depuis la découverte de la pénicilline (antibiotique naturel produit par les champignons) en 1929 et des sulfamides (antibiotique synthétique) en 1935 (Peyrou, 2001).

6-1-2-Définition

Qui s'oppose à la vie, terme créé par Waksman (Berche et *al.*, 1989). Ce sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes ; ces substances possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance ou le développement d'autres microorganismes (bactéries) (Khiati, 1998), dans lesquelles elles pénètrent en perturbant le métabolisme (Delamare, 1992) ou en agissant spécifiquement sur une étape essentielle de ce dernier (Berche et *al.*, 1989), mais qui sont dépourvus de toxicité pour les autres cellules humaines ou animales (Leclerc et *al.*, 1995a). Le cadre des antibiotiques était limité d'abord à des substances d'origine biologique produites par des champignons, s'est élargi plus tard et comprend actuellement d'autres produits possédant la même action antibactérienne, mais obtenus par synthèse (Delamare, 1992). Selon leur formule chimique, la manière dont-ils agissent sur les microorganismes et leurs effets cliniques, les antibiotiques sont groupés en dix familles (Leclerc et *al.*, 1995a ; Madigan et *al.*, 1997).

Le mode d'action des antibiotiques est, soit bactériostatique (empêche le développement microbien) ; soit bactéricide (qui détruit les germes) (Delamare, 1992 ; Khiati, 1998). Chaque antibiotique possède un spectre d'action, sur la flore microbienne sur laquelle, il exerce son activité bactéricide ou bactériostatique, il

est d'autant plus large, ou étendu, que le nombre des espèces microbiennes sensibles est grand. Le spectre d'action varie d'un antibiotique à l'autre (Delamare, 1992).

6-1-3-Mode d'action des antibiotiques et résistance bactérienne

Des docteurs dans un hôpital en Australie rapportèrent en 1948 que certaines bactéries semblaient être plus puissantes que la pénicilline. Une nouvelle question s'est imposée désormais : comment ces bactéries pouvaient-elles échapper à l'action destructive de la pénicilline? (Hamza, 1993).

A la différence des antiseptiques, les antibiotiques agissent sur des cibles bactériennes précises, à des concentrations mille à dix mille fois plus faibles que les antiseptiques. Chaque famille d'antibiotiques regroupe un nombre de molécules très variable, ayant une structure de base identique (Berche *et al.*, 1989 ; Leclerc *et al.*, 1995a). En revanche, les bactéries avaient trouvé les moyens pour résister et par conséquent, éviter l'action des antibiotiques, et se développer en présence d'une concentration en antibiotique significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce (Leclerc *et al.*, 1995a).

En plus de son action sur les bactéries, un antibiotique peut exercer des effets néfastes sur les cellules eucaryotes. Cette toxicité se manifeste la plupart du temps quand la dose administrée est trop élevée ou lorsque le traitement est de longue durée (Berche *et al.*, 1989).

6-2-Les antifongiques

6-2-1-Introduction

Pour lutter contre les mycoses, divers antifongiques sont utilisés. Les antifongiques agissent différemment selon leur famille chimique sur les organites cibles des champignons (Viguié, 2000). Actuellement, l'emploi du terme antifongique s'est élargi pour inclure à côté des produits naturels élaborés au cours du métabolisme secondaire de certains micro-organismes, des composés synthétiques et semi-synthétiques. Selon l'activité qu'il exerce, un antifongique peut avoir un effet fongistatique (arrête la croissance des champignons) ou fongicide (détruit complètement la cellule fongique). Comparé aux infections bactériennes, le traitement des mycoses est souvent beaucoup plus difficile. Cela s'explique par le fait que les cellules des mycètes sont très proches des cellules humaines et animales, ainsi les produits qui sont toxiques pour le champignon pathogène peuvent l'être aussi pour les cellules de leurs hôtes. Par conséquent, la mise au point des drogues ayant une activité antifongique est délicate car ces composés peuvent perturber également le fonctionnement des cellules hôtes (Smaoui, 2010).

En agriculture, les antifongiques (qu'on appelle aussi "fongicides") sont devenus une partie intégrale de production efficace. Plusieurs fongicides sont employés pour combattre des infections fongiques dans l'environnement mais ne sont pas utilisés en médecine en raison de leur toxicité. L'utilisation d'agents antifongiques de même classe chez l'homme et dans l'environnement pose des problèmes potentiels, particulièrement le développement des résistances. Les méthodes de lutte utilisées contre les micromycètes phytopathogènes sont généralement chimiques. Ces fongicides peuvent être organiques ou inorganiques. Cependant, l'utilisation massive des fongicides chimique a engendré des problèmes très graves sur

l'environnement, la faune et la flore. Il est donc grand temps de limiter voir même d'interdire leur application et les remplacer par des usages biologiques (Smaoui, 2010).

6-2-2- Résistance aux antifongiques

A l'exemple des bactéries qui deviennent résistantes aux antibiotiques, les champignons pathogènes pour l'homme (causant des mycoses) ainsi que les phytopathogènes développent des formes de résistance aux antifongiques et aux fongicides respectivement. La résistance clinique d'*Aspergillus fumigatus* aux traitements par l'itraconazole, un des antifongiques les plus utilisés en médecine pour combattre les aspegilloses, augmente de plus en plus (Smaoui, 2010).

6-3- Les antimicrobiens d'origine végétale

6-3-1- Introduction

Malgré l'importance des antibiotiques et des antifongiques, leur utilité dans le traitement des diverses maladies infectieuses, plusieurs obstacles se sont manifestés : résistance, multi résistance, toxicité. L'usage des plantes médicinales et leurs extraits contre ces maladies a été pratiqué chez toutes les civilisations anciennes. De nos jours, les plantes offrent un nouvel espoir de lutte contre les maladies infectieuses causées par des bactéries, des champignons, des levures ou des virus, puisque le rapport effet thérapeutique/toxicité est maximal. Un nombre important de publications scientifiques traite les effets antimicrobiens des plantes médicinales et aromatiques (Benzeggouta, 2015).

6-3-2- Les plantes, source naturelle d'antimicrobiens

La rareté des maladies chez les plantes sauvages s'explique par l'élaboration d'un système de défense naturelle, qui leur permet de lutter efficacement contre les pathogènes (Guinoiseau, 2010). Pour se protéger contre les bactéries, les champignons et les virus, les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes (Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons, 2008). L'originalité de ce système de défense réside dans l'exceptionnelle variabilité chimique des molécules produites (Murphy Cowan, 1999 ; Gibbons, 2008).

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. En général, cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (Tegos et al., 2002 ; Lewis et Ausubel, 2006).

6-3-2-1- Les flavonoïdes

L'activité antimicrobienne des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études. Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (Ulanowska et al., 2006).

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve : les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance des différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (Babayi et al. 2004), *Escherichia coli* (Ulanowska et al., 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* (Didrak 1999, Modak 2001, Okigbo et al., 2005).

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Exemple : sur plusieurs bactéries testées, l'apigénine n'a montré une faible activité que contre *Staphylococcus aureus*, toutes les autres ont été fort sensibles à ce flavonoïde. Au contraire, la galangine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus* ; les autres microorganismes se sont avérés résistants contre cette molécule (Basile et al., 1999 ; Cushnie et al., 2003 ; Martini et al., 2004).

Les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des études les plus importantes sur cette activité était celle d'Ortuno et al. en 2006 qui ont démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones extraites de *Citrus parasidi* et *Citrus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. En effet, la naringénine, l'héspéridine, la nobilétine, la simensétine et la tangerétine extraites de ces deux espèces de *Citrus* servent à protéger ces dernières contre les attaques de *Penicillium digitatum* (Ortuno et al., 2006).

Batawita et al. en 2002, ont aussi démontré que les flavonoïdes extraites de *Conyza aegyptiaca* L., avaient une action fongicide et fongistatique sur les différents agents de mycoses : *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Candida zeylanoïdes*. D'autres flavonoïdes extraits de *Tibouchina grandifolia* ont montré une forte activité antifongique contre différents types de moisissures (Kuster et al., 2009).

Bien que le mécanisme d'action des flavonoïdes sur les microorganismes demeure encore imprécis, certaines études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne en citant des exemples bien explicites ; comme celui de la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* (Dadi et al., 2009).

La sophoroflavanone G, certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2,4,2'-trihydroxy-5'-méthylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interfèrent avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH cytochrome c réductase (Cushnie et al., 2005).

6-3-2-2-Les tannins

Les tannins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales (dont certains sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Butyrvibrio fibrisolvens*, *Clostridium proteoclasterium*, ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis* (Chatterjee, 2004 ; Leitao, 2005). L'inhibition bactérienne par les tannins est dépendante de la structure et du degré de polymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (Sivakumaran et al., 2004).

Les tannins condensés comme les hydrolysables, ont une action inhibitrice contre les moisissures et les levures. Comme exemple, on a les proanthocyanidines du thé qui ont montré un rôle dans la protection de cette plante contre *Exobasidium vexans* (Punyasiri et al., 2005).

6-3-2-3-Les saponines

Bader et al. en 2000 ont montré que l'activité antimycotique des saponines contre *Candida albicans* peut être sous l'influence de la variation des unités hétéroglycosidiques et les acyles glycosidique liés au carbone C-28 de l'aglycone.

6-3-2-4-Autres

La berbérine, un alcaloïde isolé de *Berberis vulgaris*, a des propriétés antimicrobiennes ayant pour cible cellulaire l'ADN (Amin *et al.*, 1969 ; Rabbani, 1987).

La xanthone, molécule géranylée, isolée des plantes *Garcinia cambodgiae*, présente une haute activité antistaphylococcique (Inuma *et al.*, 1998).

Chomnawang *et al.* (2009) a identifié un dérivé prénylé de la xanthone, l' α -mangostine, actif contre un isolat clinique SARM (Staphylocoques dorés résistants à la méthicilline).

7-Technique de mesure de l'activité antimicrobienne

Il existe de nombreuses méthodes d'essais de sensibilité des agents pathogènes aux antimicrobiens. Les 3 méthodes suivantes sont les seules qui fournissent des résultats reproductibles et répétables quand elles sont réalisées correctement (OIE, 2008) :

- ✚ La diffusion sur disque
- ✚ La dilution en bouillon
- ✚ La dilution en gélose.

On va détailler simplement la technique qu'on a utilisée durant nos expérimentations.

❖ Méthode de la diffusion sur disque

Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, l'application des disques imprégnés de principes actifs sur des milieux de cultureensemencés par des microorganismes. L'activité antimicrobienne, quand elle était présente, se manifestait alors par des zones d'inhibition autour des disques (Osato, 2009 ; Liao *et al.*, 2010).

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de cultureensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai. Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible. Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour des disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Généralement, cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépend de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose (El kalamouni, 2010).

Chapitre 4 : Présentation des plantes étudiées

1-*Atractylis humilis*

Cette espèce est classée selon l'APG II (Dupont et Guignard, 2007), comme suit :

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous classe :	Euastéridées II
Ordre :	Astérales
Famille :	Astéracées
Genre :	<i>Atractylis</i>
Espèce :	<i>Atractylis humilis</i> L.

1-1-La famille des Astéracées

Les Astéracées ont été connu sous le nom des Composées (Composacées, Compositae) (Giseke, 1792). Cette famille est l'une des plus vastes familles dans le règne végétal. Elle comprend plus de 1 000 genres et entre 20 000 et 25 000 espèces (Spichiger et *al.*, 2004 ; Dupont et Guignard, 2007). C'est la famille la plus importante de notre territoire puisqu'elle renferme 408 espèces réparties en 109 genres (Quézel et Santa, 1963).

Les plantes de la famille des Astéracées sont les plus importantes des plantes à ovaires. Elles sont répandues dans le monde entier, surtout dans les régions tempérées, moins fréquentes dans les forêts tropicales humides (Spichiger et *al.*, 2004 ; Dupont et Guignard, 2007).

Les Astéracées est une famille particulièrement riche en espèces médicinales. Elle comprend notamment, des plantes utilisées dans le traitement des maladies parasitaires et anti-infectieuses (Bruneton, 2001). Citant les espèces *Echinops ellenbeckii* et *Echinops longisetus*, dont l'activité antifongique des extraits des feuilles et des racines tels que les alcaloïdes, les saponosides et les polyphénols est remarquable (Hymete et *al.*, 2005). Aussi, les flavonoïdes extraites des feuilles des espèces *Flauresia cernua*, *Flauresia microphylla*, *Flauresia oxysporum*, *Flauresia setinophylla* ont une activité antifongique (Jasso et *al.*, 2007).

En médecine populaire africaine, on peut citer l'activité antidiabétique des espèces *Ageratum conyzoides* L., *Eclipta prostrata* L., *Vernonia colorata* (Willd.) Drake (Tra Bi et *al.*, 2008).

1-2-Le genre *Atractylis*

Le genre *Atractylis* est distribué partout dans le monde, mais il est abondant spécialement dans la région méditerranéenne. Ce genre est représenté en Afrique du nord par 16 espèces (Ozenda, 1991 ; Quézel et Santa, 1963).

L'espèce *Atractylis gummifera* occupe la première position des plantes responsables d'intoxications (Larabi et *al.*, 2012). Mais, elle a des utilisations thérapeutiques surtout contre les parasites intestinaux, l'ulcère, la morsure des serpents et l'hydropisie (Larrey et Pageaux, 1995). La racine des espèces (*Atractylis*

carduus et *Atractylis mernepthae*) est utilisée pour le traitement des problèmes du système nerveux central, l'hystérie et le rhumatisme (Ahmed Fahmi Aissa, 2013).

Les espèces d'*Atractylis* ont attiré peu d'attention concernant l'étude phytochimique (Chabani et al., 2013)

Les principaux composés phytochimiques d'*Atractylis gummifera* des racines sont les diterpènes glycosides, les carboxyatractylosides et les wedelosides (Georgiou, 1988).

1-3-Atractylis humilis

1-3-1-Description

Elle est appelée aussi en Algérie Teskeur ou Taboq. Plante avec capitules non enfoncés dans les feuilles des rosettes, solitaires au sommet des rameaux. Capitules globuleux (Figure 4). Fleurs du rayon parfois rayonnantes (var. *radians*). Plante constituant des touffes épaisses. Feuilles petites, lancéolées-linéaires, pubescentes ou glabres, à bords épaissis en nervure marginale et régulièrement dentés-épineux. Capitules de 15 mm sur 20 en moyenne (parfois plus). Involucre supplémentaire à bractées assez semblables aux feuilles ou plus épineuses. Involucre proprement dit à bractées tronquées et dont la nervure dorsale se prolonge en épine subulée. Bractées parfois tâchées de noir au sommet (Quézel et Santa, 1963).

Habitat naturel : Forêts, pâturages pierreux, steppes (Quézel et Santa, 1963).

1-3-2-Travaux antérieurs

1-3-2-1-Le genre *Atractylis*

Très peu de travaux ont été réalisés sur le genre *Atractylis*, la seule espèce qui a attirée les chercheurs c'est *Atractylis gummifera*.

En 1866, Lefranc a essayé d'isoler pour la première fois une substance toxique à partir des racines d'*Atractylis gummifera*.

En 1964, Stanislis et Vignais ont isolé pour la première fois le carboxyatractyloside à partir des racines d'*Atractylis gummifera*.

En 1975, Norman et al. ont rapporté l'utilisation traditionnelle des racines d'*Atractylis gummifera* contre la fertilité humaine.

En 1985, Caravaca Magarinos et al. ont étudié l'effet d'intoxication par les racines d'*Atractylis gummifera* sur les reins et le foie. L'étude a porté sur des humains à l'état clinique. Ensuite une étude proprement dite a été réalisée sur des rats de laboratoire.

Georgiou en 1988, a étudié la composition phytochimique des racines d'*Atractylis gummifera*. Les principaux composés sont : des diterpènes glycosides, les carboxyatractylosides et les wedelosides.

En 2009, Bouaziz et al. ont étudié la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits des parties aériennes d'*Atractylis serratuloides*, récoltée au sud tunisien.

En 2011, Abdel Rahman et al. ont réalisé un screening phytochimique sur les parties aériennes d'*Atractylis carduus* récoltés en Egypte. Ils ont révélé la présence des alcaloïdes, des stéroïdes, des saponines, des anthraquinones et des flavonoïdes. Parallèlement, ils ont étudié l'activité antibactérienne des extraits méthanolique et hexanique.

1-3-2-2-*Atractylis humilis*

La seule étude de l'activité biologique d'*Atractylis humilis* qu'on a trouvé est celle de Pascual-Villalobos et Robledo (1998), ils ont mis en évidence l'activité insecticide contre *Tribolium castaneum*.

2-*Eryngium maritimum*

Cette espèce est classée selon l'APG II (Dupont et Guignard, 2007), comme suit :

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous classe :	Euastéridées II
Ordre :	Apiales
Famille :	Apiacées
Genre :	<i>Eryngium</i>
Espèce :	<i>Eryngium maritimum</i> L.

2-1-La famille des Apiacées

La famille des Apiacées (Ombellifères) comprend environ 2 000 espèces (Lupoli, 1994). C'est la famille la plus importante dans la flore algérienne dont elle est représentée par 55 genres (Quézel et Santa, 1963).

Cette famille comprend beaucoup d'espèces d'intérêts alimentaires. Quelques unes sont cultivées pour leurs racines comme la carotte ou le panais. De nombreuses autres contiennent des substances aromatiques spécifiques et sont donc cultivées pour leur fruits, leurs tiges ou leurs feuilles pour servir de condiments ou d'épices (le céleri, le fenouil, le persil). D'autre sont toxiques pour l'homme (la grande ciguë, le cerfeuil enivrant, l'œnanthe) (Lupoli, 1994).

Le panais est riche en antioxydants (l'apigénine) et en polyacétylènes qui réduisent l'activité d'un enzyme impliqué dans le développement du cancer (Devaure, 2011).

Foeniculum vulgare est une plante aromatique riche en huile essentielle. Elle possède des propriétés antiseptiques, emménagogues et traite les gastroentérites (EL Rhaffari, 2008).

2-2-Le genre *Eryngium*

Le genre *Eryngium* comprend 250 espèces. Il est considéré comme le plus large genre dans la famille des Apiacées avec approximativement trois quart des espèces de la sous-famille (Saniculoideae). Le genre *Eryngium* est distribué dans les régions tempérées de tous les continents. La richesse en espèces est inégal entre l'hémisphère est et ouest du globe terrestre (Erdelmeier et sticher, 1986 ; Calvino et al., 2008).

L'effet des racines des différentes espèces d'*Eryngium* contre les maladies inflammatoires est connu en médecine traditionnelle à travers le monde ; à titre d'exemple *Eryngium campestre* soulage les œdèmes (Leporatti et Ivancheva, 2003), aussi les inflammations urinaires et rénales (Gruenwald et al., 2000). *Eryngium creticum* est utilisée en blessure inflammatoire (Ali-Shtayeh et al., 1998). *Eryngium triquetrum* est utilisée contre les douleurs des intestins et contre l'amygdalite des enfants (Bellakhdar, 1997).

Les espèces du genre *Eryngium* sont connues pour leurs richesses en acétylènes, en flavonoïdes, en coumarines et en saponines triterpènes (Erdelmeier et sticher, 1986).

2-3-Eryngium maritimum

1-3-1-Description

Cette espèce est connue par les noms : Chardon bleu, Chardon des dunes, Panicaut de mer, Panicaut des dunes ou Panicaut maritime ; en Algérie : Guorgaâ. C'est une plante vivace glabre, peu rameuse, teintée de bleu acier ou de bleu-vert (Figure 4). Feuilles radicales arrondies avec 3-5 lobes et un long pétiole. Feuilles caulinaires sessiles, lobée, épineuse. Inflorescence globuleuse à ovale de 1-3 cm, très florifères, entourées à la base de 3-5 larges bractées spinescentes. Sépales lancéolées et apiculés de 5 mm de long. 5 pétales bleus plus courts que les sépales. Fruit de 13-15 mm de long avec le calice persistant, couvert d'écaillés quadrangulaires (Lippert et Podlech, 2010). Son habitat est le sable du littoral. L'aire de distribution de cette espèce, les côtes d'Afrique du nord et presque toute l'Europe, à l'exception de l'extrême nord (Lippert et Podlech, 2010).

1-3-2-Travaux antérieurs

Heywood en 1971 a décrit l'utilisation d'*E. maritimum* : comestible et comme substituant d'*E. campestre*.

Une équipe de recherche allemande, dirigé par le Dr. Hiller, est celle qui a contribué à l'étude des saponines d'*E. maritimum* (Hiller et al., 1976).

Font Quer en 1979, dans son traité des plantes médicinales, rassemble les propriétés attribuées traditionnellement à *E. maritimum* présente dans la Péninsule Ibérienne. La décoction des racines est diurétique, emménagogue, carminatif et traite les crampes abdominales. Par son contenu en saponine, la racine est recommandée contre l'hydropisie et les œdèmes des membres inférieurs.

Lisciani et al. en 1984 ont effectué une étude sur les propriétés anti-inflammatoires d'*E. maritimum*. Les extraits chloroformique et éthanolique des racines ont été administrés à des rats de laboratoire avec des œdèmes de jambe induits. L'extrait chloroformique a inhibé l'œdème de jambe à partir d'une dose 1248 mg/kg (4 g de plante sèche). L'étude phytochimique a révélé la présence des saponines triterpènes, des flavonoïdes et trois acides organiques (acide pipécolique, acide tiglique et acide angélique).

Kubeczka et al. en 1998 ont étudié les huiles essentielles d'*E. maritimum*. Les huiles essentielles des feuilles et des fruits sont caractérisées par l'abondance du germacrène D (43,1% et 42,0%) respectivement, et la présence d'un nouvel aldéhyde sesquiterpène, soit le 9-muurooléne-15-aldéhyde (22,4% et 16,4%) respectivement. Les principaux composés des huiles essentielles des racines sont γ -guaïène (40,2%), 2,3,4-triméthyl benzaldéhyde (24,0%) et germacrène D (10,6%).

Andrew en 2001, dans son Larousse des plantes médicinales, a donné la description botanique, l'habitat, l'usage thérapeutique d'*E. maritimum* et les principaux constituants phytochimiques des racines, à savoir : les saponines, les coumarines et les flavonoïdes.

Kupeli et al. en 2006 ont étudié l'activité anti-inflammatoire des extraits éthanolique et aqueux des parties aériennes et des racines d'*Eryngium maritimum*.

Meot-Duros et al. en 2008 ont étudié l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits chloroformique et méthanolique des feuilles d'*E. maritimum*.

Thiem et *al.* en 2010 ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits éthanolique des feuilles et des racines d'*E. maritimum* contre deux bactéries-cibles et cinq champignons-cibles. Les résultats ont prouvé une activité inhibitrice remarquable contre *Staphylococcus aureus* et tous les champignons-cibles.

3-Salvadora persica

Cette espèce est classée selon l'APG II (Dupont et Guignard, 2007), comme suit :

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous classe :	Eurosidées II
Ordre :	Brassicales
Famille :	Salvadoraceae
Genre :	<i>Salvadora</i>
Espèce :	<i>Salvadora persica</i> Garcin

3-1-La famille des Salvadoracées

La famille des Salvadoracées est une famille de plantes dicotylédones comprenant une dizaine d'espèces réparties en 2 à 3 genres. Ce sont des arbres, arbustes parfois épineux, parfois rampants, des milieux arides ou salés, des régions subtropicales à tropicales. On les rencontre en Afrique, à Madagascar, au sud de l'Asie et en Malaisie (Chuang, 1981).

3-2-Le genre *Salvadora*

Les deux espèces les plus connus sont : *Salvadora oleoides* et *Salvadora persica*. *Salvadora oleoides* a une activité stomachique, antimicrobienne, diurétique, astringente, aphrodisiaque, anti-inflammatoire, analgésique, hypolipidémique. Elle est utilisée pour le traitement des bronchites, les tumeurs, les troubles de nez et les gonorrhées (Verma et al., 2011).

Les constituants phytochimiques de *Salvadora oleoides* sont : les alcaloïdes et les méthylamines dans les feuilles et les racines et les acides gras dans les graines (Jayvir et al., 2002).

3-3-*Salvadora persica*

3-3-1-Description

Salvadora persica (nom commun : Miswak ou Araak) est un petit arbre ou un arbuste avec un tronc tortueux, rarement plus d'un pied de diamètre (Figure 4). Son écorce est scabreuse et fissurée, blanchâtre avec extrémités pendantes. L'écorce de la racine de l'arborescence est similaire au sable et les surfaces intérieures ont une même légère nuance de brun. Cette plante a un parfum agréable, mais aussi un goût chaud et piquant. Elle perd ses feuilles depuis la fin de décembre à janvier. Au Pakistan, ces arbres anciens, majestueux et robustes sont plus étroitement associés aux cimetières comme le *Cyprès* dans la culture anglaise (Flora of Pakistan, 2013).

Salvadora persica est un arbuste avec les branches blanches, localement connues sous le nom d'Araak. Il est largement distribué, particulièrement dans le Moyen-Orient, l'Afrique, le sous-continent Indien, et le Soudan. Cette plante est adaptée aux sols salins où la concentration en sel du sol empêche la croissance de la plupart des plantes (Tackholm, 1974 ; Nadkarni, 1976 ; Zodape et Indusekhar, 1997).

3-3-2-Usage thérapeutique

Salvadora persica est employée comme décoction pour le traitement de la splénomégalie, le rhumatisme, des tumeurs et des calculs rénaux par les médecins populaires. L'utilisation la plus importante de cette plante est celle de la tige et de la racine par les musulmans comme des brosses de dents, connue sous le nom de miswak. L'effet antibactérien, anti-inflammatoire et les effets modérément hypoglycémiques de la plante ont été rapportés par Harfi et Lundberg en 1997. Le bâton de mastication est pris la plupart du temps de la racine de la plante *S. persica* (Harfi et Lundberg, 1997). Elle est utilisée en Sénégal pour le traitement de l'appareil respiratoire (Sarr et *al.*, 2010). Les feuilles ont un effet diurétique (Watt et Breyer-Brandwijk, 1962). En Algérie, la tige est employée comme brosse de dent. Par ailleurs, les feuilles sont utilisées en décoction pour le traitement de l'ictère, des aphtes, l'aménorrhée, la gonorrhée et la syphilis (Hammiche and Maiza, 2006).

En plus, l'effet antimicrobien connu de cette plante a encouragé les industriels à utiliser la tige broyée comme ingrédients dans les produits d'hygiène buccale (Ainamo et Etemadzadeh, 1987 ; Smith et *al.*, 1996 ; Ahmed et *al.*, 2008).

3-3-3-Travaux antérieurs

Farooqi et Srivastava (1968) ont étudié la composition phytochimique des racines. Ils ont isolé le benzy-lisothiocyanate. Ils ont aussi révélé la présence des saponines, des tannins, de la silice, la résine, le triméthylamine et les alcaloïdes.

Ray et *al.* en 1975 ont étudié la composition phytochimique. Ils ont isolé le β -sitostérol, l'acide anisique et le salvadourée.

En étudiant la racine, Lewis et Elvin-lewis en 1977 ont révélé la présence d'une proportion très élevée de minéraux (27,06%).

En 1981, Ezmirly et El-Nasr ont isolé le glucotropaéoline des racines de *Salvadora persica*.

El-Mostehy et *al.* en 1983 ont rapporté la présence des substances phytochimiques : Triméthylamine, les alcaloïdes, les chlorides, les fluorides, la silice, le sulfure, la vitamine C, les tannins, les saponines, les flavonoïdes et les stérols.

En 1984, Ma'Ayergi et *al.* ont étudié l'écologie, la distribution géographique et les constituants chimiques de *Salvadora persica*. Ils ont prouvé que le miswak contient le mucilage (2,2%) et les stérols (β -sitostérol, stigmastérol, campestérol). Ils ont aussi analysé les acides gras constituant le miswak.

Al-Lafi et Ababneh en 1995 ont étudié l'activité antibactérienne des extraits de miswak contre les bactéries buccales (aérobies et anaérobies). L'effet le plus remarquable était observé contre *Staphylococcus aureus*.

Mansour et *al.* en 1996 ont étudié l'effet analgésique de la décoction de miswak chez des rats injectés.

El-Sadhan et Almaz en 1999 ont étudié la composition phytochimique du miswak. Ils ont révélé la présence des constituants phytochimiques : les alcaloïdes, les tannins, les saponosides, les flavonoïdes et les stérols.

Jayvir et *al.* en 2002 ont sélectionné des plantes médicinales utilisées fréquemment en Inde dans un glossaire. Ils ont décrit pour chaque espèce, le nom vernaculaire, l'utilisation traditionnelle, la partie utilisée et la composition phytochimique. Parmi ces espèces, on trouve *Salvadora persica*.

Darmani et *al.* en 2003 ont étudié l'effet de l'extrait de miswak sur le système reproductrice des rats.

En 2003, Alali et Al-Lafi ont rapporté les analyses CPG-SM des huiles essentielles des feuilles de *Salvadora persica* collectées des arbres poussant en Jordanie. Ils ont identifié sept composés majeurs (benzyle nitrile, isothymol, thymol, eugénol, β -caryophyllène, eucalyptol et isoterpinolène).

En 2007, Arora et Kaushik ont étudié l'activité antioxydante des racines de *Salvadora persica in vitro*. Cette étude comprend le test de l'activité antioxydante des extraits alcoolique et aqueux en utilisant différentes méthodes.

En 2008, Ahmed et *al.* ont étudié la composition phytochimique des graines de *Salvadora persica* récoltées des arbres poussant en sud-est de l'Egypte. Le screening phytochimique a révélé la présence des carbohydrates, des glycosides, des stérols, des terpènes, des flavonoïdes et des alcaloïdes. L'extrait alcoolique possède une activité antimicrobienne contre *Proteus vulgaris*.

En 2008, Al-Bayati et Sulaiman ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits des tiges de *Salvadora persica*. L'extrait méthanolique et l'extrait aqueux étaient testés contre sept microorganismes isolés des infections bucco-dentaires d'Iraq.



Figure 4. Photos des plantes sélectionnées. A : *Eryngium maritimum* (wikimedia commons, 2013). B : *Atractylis humilis* (wikimedia commons, 2013). C : *Salvadora persica* 'Rameau' (wikimedia commons, 2013). D : *Salvadora persica* 'L'arbre entier' (wikimedia commons, 2013).

MATERIELS ET METHODES

Chapitre 1 : Le choix des plantes médicinales

1-Présentation de la zone d'étude

Nous avons mené nos investigations dans la commune d'Aïn Fezza qui fait partie de la daïra de Chetouane, wilaya de Tlemcen. Elle est constituée à partir des localités suivantes : Aïn Fezza, Ouchebe, Oum El Allou, Tizi, Tagma, Aïn Beni Add. Le territoire de cette commune est situé au nord-est de la wilaya de Tlemcen, à environ 8 km à vol d'oiseau à l'est de Tlemcen, avec les coordonnées géographiques suivantes : 34°52'45''N et 1°14'18''E en DMS (degrés, minutes, secondes).

Aïn Fezza par sa situation géographique présente une grande diversité de biotope occupée par une importante richesse floristique. On trouve des formations arborescentes qui occupent surtout les montagnes d'Ourit au sud ouest de la commune (Bouazza et *al.*, 2001). Aussi, des formations arbustives et herbacées qui occupent la grande surface de la commune.

2-Enquête ethnobotanique

Afin de sélectionner les plantes médicinales utilisées contre les affections à caractère épidémique (infections bactérienne et fongique, diabète et maladie cardiovasculaire), nous avons fait appel aux tradithérapeutes de la région d'Aïn Fezza. Cette enquête a été réalisée en 2007.

Les différentes espèces récoltées ont été identifiées par : Pr. Bouazza M., Dr. Stambouli-Meziane H. (Maître de conférence « A ») et le Dr. Henaoui S. E. (laboratoire Ecologie et Ménagement des Ecosystèmes, département de Biologie et Environnement, université de Tlemcen). Les différents spécimens ont été conservés dans l'herbier du laboratoire des Produits naturels (département de Biologie, université de Tlemcen). Nous avons attribué pour chaque espèce, le nom scientifique, le nom commun, l'utilisation traditionnelle, la partie utilisée, le mode d'emploi, la répartition géographique, l'importance populaire et la fréquence d'utilisation de ces plantes. Nous avons attribué également un code pour chaque spécimen : PNkw1, PNkw2, PNkw3, PNkw4, PNkw5, PNkw6, PNkw7, PNkw8, PNkw9, PNkw10, PNkw11, PNkw12, PNkw13, PNkw14 et PNkw15.

3-La sélection des plantes à étudier

Le choix des plantes à étudier a été basé sur plusieurs critères :

- ❖ L'utilisation traditionnelle ;
- ❖ La bibliographie : La composition phytochimique, l'activité biologique et les travaux antérieurs ;
- ❖ La fréquence d'utilisation par la population de la région ;
- ❖ L'intérêt économique ;
- ❖ L'abondance de l'espèce à l'état spontanée ;
- ❖ Le degré de toxicité.

Finalement, le choix est porté sur les plantes suivantes : *Atractylis humilis*, *Eryngium maritimum* et *Salvadora persica*.

Atractylis humilis était choisie pour les raisons suivantes :

- L'utilisation traditionnelle par la population d'Aïn Fezza contre les dermatophytes et les infections intestinales ;
- L'abondance de l'espèce à l'état spontanée dans la région d'Aïn Fezza ;
- La valorisation économique : elle n'est pas utilisée dans les secteurs suivants : l'agriculture, l'industrie ou bien l'élevage du bétail ;
- Cette espèce végétale n'est pas toxique.

Eryngium maritimum a été choisie pour les raisons citées ci-dessous :

- L'utilisation traditionnelle des racines par la population d'Aïn Fezza dans les soupes à titre préventive ;
- La fréquence d'utilisation par la population d'Aïn Fezza ;
- Les travaux antérieurs : traitement du Scorbut ;
- Cette espèce végétale n'est pas toxique.

Enfin, nous avons choisi *Salvadora persica* selon les critères suivants :

- L'utilisation traditionnelle des feuilles et des tiges par de nombreux pays contre les microbes ;
- La fréquence d'utilisation par le monde entier des tiges « Miswak » en vie courante.
- L'ouverture du marché industrielle sur la manufacture de différents produits d'hygiène et cosmétique à base de cette plante ;
- La non-exploitation de cette plante en Algérie.

Chapitre 2 : Etude phytochimique

1-Collection du matériel végétal

Les espèces sélectionnées suivantes : *Atractylis humilis* et *Eryngium maritimum* ont été identifiées par le laboratoire d'Ecologie et Ménagement des Ecosystèmes, département de Biologie et Environnement, université de Tlemcen alors que l'espèce *Salvadora persica* était identifié par le Parc National de Tassili N'Ajjer. Les plantes ont été classées dans le laboratoire des Produits Naturels.

Tableau 1. Lieux, périodes des prélèvements et parties utilisées des espèces étudiées

Plante	Lieu du prélèvement	Période de prélèvement	Partie de la plante utilisée
<i>Atractylis humilis</i>	Aïn Fezza	Juin 2007	Racines et Feuilles
<i>Eryngium maritimum</i>	Tlemcen	Avril 2010	Racines
<i>Salvadora persica</i>	Ahaggar	2005	Feuilles et Tiges

1-1-*Atractylis humilis*

Les plantes entières d'*Atractylis humilis* ont été récoltées dans la région d'Aïn Fezza en 2007 (Tableau 1 et Figure 5). On a séparé les différents organes à savoir : racines et feuilles. Puis, ils ont été séchés à l'air libre et à l'obscurité, broyés et stockés à 4°C.

1-2-*Eryngium maritimum*

Les racines d'*Eryngium maritimum* ont été récoltées dans la région de Tlemcen en 2010 (Tableau 1 et Figure 5). Puis, elles ont été séchées à l'air libre et à l'obscurité, broyées et stockées à 4°C.

1-3-*Salvadora persica*

Les feuilles et les tiges de *Salvadora persica* ont été récoltées dans la région d'Ahaggar à Tamanrasset (sud d'Algérie) en 2005 (Tableau 1 et Figure 5). Puis, elles ont été séchées à l'air libre et à l'obscurité, broyées et stockées à 4°C.



— : Frontière **→** : Lieu de prélèvement | 300 km |

Figure 5. Carte administratif de l'Algérie montrant les lieux des prélèvements

2-Extraction des composés phytochimiques

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative proprement dite. Elle est influencée par la méthode d'extraction choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. Des étapes supplémentaires de purification des échantillons peuvent être nécessaires en vue d'éliminer des composés tels que les cires, les graisses, les terpènes et les chlorophylles (Muanda, 2010).

3-Réactions de caractérisation

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée (Badiaga, 2011).

Il consiste à effectuer des tests chimiques simples pour détecter la présence des familles chimiques dans un extrait de plante (Harborne, 1973). Des tests utilisés dans des criblages phytochimiques devraient être simple et rapide, car beaucoup d'échantillons devront être traités (Sofowara, 2010). Le principe est basé soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant des réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration (Sofowara, 2010). Ils présentent des imprécisions car ils sont basés sur l'analyse qualitative (Badiaga, 2011).

3-1-Préparation des extraits aqueux

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 6 g de matériel végétal est mis en présence de 100 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait aqueux a subi la caractérisation phytochimique (Badiaga, 2011).

La caractérisation phytochimique était réalisée seulement pour *Atractylis humilis* en raison du manque d'information sur la composition phytochimique sur cette espèce. Par contre, on connaît les principales familles chimiques des deux autres plantes (*Eryngiumm maritimum* et *Salvadora persica*) d'après la littérature.

3-2-Les alcaloïdes

On a mélangé 0,2 ml des extraits aqueux avec 5 ml d'acide chlorhydrique (1%) et on a chauffé les solutions au bain-marie. Ensuite, les filtrats obtenus étaient soumis à des tests avec le réactif de Mayer et le réactif de Wagner séparément. Un précipité a indiqué la présence des alcaloïdes (Karumi et al., 2004).

3-3-Les cardénolides

On a mis 0,5 g d'extrait sec dans 2 ml d'acide acétique glacial. Ensuite, on a ajouté une goutte de la solution du chlorure de fer. Puis, on a ajouté 1 ml d'acide sulfurique concentré. Un anneau marron à l'interface indique la présence des cardénolides (Trease et Evans, 1996).

3-4-Les coumarines

1 g de poudre végétale était placé dans un tube, en présence de quelques gouttes d'eau. Les tubes ont été recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué puis portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne la présence des coumarines après examen sous UV (Rizk, 1982).

3-5-Les flavones aglycones

On a chauffé 2 ml d'extrait aqueux. Ensuite on a ajouté la tournure de magnésium et l'acide chlorhydrique concentré. La coloration orange ou rouge a indiqué la présence des flavones aglycones (Karumi et *al.*, 2004).

3-6-Les flavonoïdes

On a ajouté à 2 ml de chaque extrait, 1 ml de NaOH (2N). La couleur jaune indique la présence des flavonoïdes (Olabiyi et *al.*, 2008).

3-7-Les quinones libres

Un gramme de matériel végétal sec et broyé était placé dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 h, les extraits ont été filtrés et concentrés par un évaporateur rotatif. La présence des quinones libres était confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH à 1/10, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1968).

3-8-Les polyuronides

On a mélangé 2 ml d'extrait aqueux avec 10 ml d'éthanol. Un précipité violet ou bleu a indiqué la présence des polyuronides (Karumi et *al.*, 2004).

3-9-Les saponosides

La capacité des saponines à mousser les solutions aqueuses est utilisée pour la mise en évidence des saponosides. 0,5 g du matériel végétal sec et broyé était mélangé avec de l'eau dans un tube à essai. La mousse persistante après le chauffage et l'agitation du mélange indique la présence des saponosides (Oloyede, 2005).

3-10-Les tannins

1,5 g de matériel végétal sec a été placé dans 10 ml de MeOH à 80%. Après 15 minutes d'agitation, les extraits étaient filtrés et mis dans des tubes. L'ajout de FeCl₃ à 1% a permis de détecter la présence ou non de tannins. La couleur vire au bleu noir en présence des tannins galliques et au brun verdâtre en présence de tannins catéchiques (Rizk, 1982).

3-11-Les triterpènes et les stérols

On a évaporé 10 ml d'extrait aqueux à sec. Ensuite, on a solubilisé le résidu par 0,5 ml d'acide acétique anhydride et 0,5 ml du chloroforme. Puis, on a mélangé la solution avec 2 ml d'acide sulfurique concentré. Un anneau marron rougeâtre ou violet à la surface de la solution et la couleur vert ou violet de toute la solution indique la présence des triterpènes et des stérols (Karumi et *al.*, 2004).

4-Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins

4-1- Préparation des extraits

4-1-1-Principe

Nous avons utilisé la technique d'extraction par un broyeur- homogénéiseur (Figure 6) de type (ULTRA TURRAX, IKAR WERKE) inspirée de la méthode d'extraction des protéines animales (Voet et Voet, 2005) et des protéines fongiques (Ravindra et *al.*, 2004).

Le bécher contenant la matière végétale et le solvant était suspendu dans un bain d'eau contenant de la glace et il a subi un broyage et une homogénéisation avec (ULTRA TURRAX, IKAR WERKE) à 13 500 t/mn pendant 30 mn. Le contenu du bécher a été filtré à l'aide du papier filtre. Le résidu a été de nouveau traité de la même façon.



Figure 6 : Un broyeur- homogénéiseur

4-1-2-Préparation des extraits d'*Eryngium maritimum*

Le dosage des flavonoïdes et des polyphénols totaux a été déterminé en utilisant l'extrait méthanolique et l'extrait acétonique.

On a ajouté à 0,25 g des racines d'*Eryngium maritimum*, 10 ml d'acétone aqueuse (70%) et 10 ml du méthanol aqueux (80%) indépendamment.

4-1-3- Préparation des extraits de *Salvadora persica*

Le dosage des flavonoïdes, des polyphénols et des tannins a été déterminé en utilisant l'extrait acétonique en raison de la solubilité plus élevée des tannins et des composés phénoliques dans la solution d'acétone aqueuse, en plus l'acétone empêche l'oxydation des phénols (Makkar et *al.*, 2007).

Nous avons pris 0,25 g des feuilles et des tiges de *Salvadora persica* broyées avec 10 ml d'acétone aqueuse (70%).

4-2-Dosage des polyphénols totaux

4-2-1-Principe

La détermination quantitative des phénols totaux est réalisée par la méthode colorimétrique du Folin-Ciocalteu. Cette méthode est basée sur la réduction chimique du réactif (un mélange d'acide phosphotungstique et phosphomolibdique) en oxyde de couleur bleu dont son maximum d'absorption par colorimètre est exhibé à 765 nm. L'intensité d'absorption est proportionnelle à la concentration des polyphénols. Cette méthode a été adaptée par Singleton pour l'analyse du Vin (Singleton et Rossi, 1965), ensuite elle était appliquée pour d'autres aliments : le thé (Wiseman et *al.*, 2001), les légumes (Kaur et

Kapoor, 2002) et les fruits (Pearson et *al.*, 1999 ; Vinson et *al.*, 2001). Elle est aussi utilisée pour l'analyse des médicaments (Sadler et Jacobs, 1995) et de l'eau douce (Thoss et *al.*, 2002). Mais l'utilisation de cette méthode en phytochimie des plantes médicinales est la plus marquée (Waterhouse, 2002).

4-2-2-Préparation de la gamme d'étalonnage

Afin d'obtenir une courbe d'étalonnage des polyphénols, on a utilisé comme étalon le pyrocatechol, à une concentration de 15 mg/l (solution mère). A partir de cette solution nous avons préparé les différentes dilutions allant de 14 mg/l jusqu'à 1 mg/l.

4-2-3-Protocole expérimental

On a utilisé le procédé du Folin-Ciocalteu de Singleton et Rossi (1965). 0,1 ml de chaque échantillon a été transférée dans les tubes à essai et leurs volumes ont été complétés à 3 ml avec de l'eau distillée. Après addition de 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans l'eau) et 2 ml de carbonate de sodium (20%), les tubes étaient agités par un vortex et ils ont été incubés à la température ambiante dans l'obscurité. L'absorbance a été mesurée après 1h à 650 nm au spectrophotomètre (JEN WAY 6405 UV/Vis) contre un blanc (même solution sans le pyrocatechol ou l'extrait). Ensuite, à partir des valeurs de l'absorbance des solutions de pyrocatechol, on a tracé la courbe d'étalonnage en utilisant le programme Microsoft Office Excel 2007.

La teneur en phénols totaux de l'extrait était calculé à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage et exprimé en mg d'équivalent pyrocatechol par g d'extrait sec (mg EP/g ES).

4-3-Dosage des tannins

4-3-1-Principe

On a utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu pour le dosage des tannins décrits par Makkar et *al.* en 1993. La méthode se décompose en deux dosages colorimétriques successifs : le dosage des phénols totaux puis le dosage des phénols non-tanniques. Ce second dosage est réalisé après déplétion des tannins de l'extrait par le PolyVinyl Pyrrolidone (PVP). Ce produit est capable de se lier aux tannins présents dans l'extrait dont le complexe est retiré de l'extrait par centrifugation. Indirectement, la teneur en tannins totaux d'un échantillon est déterminée par la différence entre les teneurs en phénols totaux et en phénols non-tanniques.

4-3-2-Protocole expérimental

On a ajouté à 1 ml de l'extrait, 1 ml d'eau distillée et 100 mg de PVP, ensuite on a laissé le mélange à 4°C pendant 15 mn. Puis, on a centrifugé le mélange pendant 10 mn à 3 000g pour enfin récupérer le surnageant. 0,1 ml du surnageant était transféré dans des tubes à essai afin de déterminer la teneur en phénols non-tanniques par la méthode de dosage des phénols décrit précédemment. La teneur en phénols non-tanniques était calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage et exprimée en mg d'équivalent pyrocatechol par g d'extrait sec (mg EP/g ES). Ensuite la teneur en tannins totaux de l'extrait a été déterminée par la différence entre les teneurs en phénols totaux et en phénols non-tanniques.

4-4-Dosage des flavonoïdes

4-4-1-Principe

Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium) (Boulekbache, 2005). Ceci se traduit par le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1968).

Alors, dans notre travail, on s'est basé sur le principe de complexation des flavonoïdes par l'aluminium de Djeridane et *al.* en 2006 pour l'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits.

4-4-2-La courbe d'étalonnage

Afin d'obtenir une courbe d'étalonnage des flavonoïdes, on a utilisé comme étalon la rutine, à une concentration de 1g/l (solution mère). A partir de cette solution nous avons préparé les différentes dilutions allant de 0,9 g/l jusqu'à 0,1 g/l.

4-4-3-Protocole expérimental

On a mélangé 1 ml de chaque dilution avec 1 ml de la solution aqueuse du chlorure d'aluminium (2%). Après incubation à la température ambiante pendant 15 mn, l'absorbance a été déterminé à 430 nm en utilisant le spectrophotomètre (JEN WAY 6405 UV/Vis) contre un blanc (même solution sans la rutine ou l'extrait). Ensuite, à partir des valeurs d'absorbance des solutions de rutine, on a tracé la courbe d'étalonnage en utilisant le programme Microsoft Office Excel 2007.

La teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait était calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage et exprimée en mg d'équivalent rutine par g d'extrait sec (mg ER/g ES).

5-Extraction des alcaloïdes, des flavonoïdes et des saponosides

Nous avons utilisé la technique d'extraction par un broyeur- homogénéiseur de type (ULTRA TURRAX, IKAR WERKE) inspirée de la méthode d'extraction des protéines animales (Voet et Voet, 2005) et des protéines fongiques (Ravindra et *al.*, 2004).

5-1-Extraction des alcaloïdes

Nous avons utilisé la méthode de Harborne (1998). 10 g du matériel végétal broyé a été mélangé avec un volume de 500 ml d'éthanol mélangé avec l'acide acétique à 10%. Le bécher contenant ce mélange a été suspendu dans un bain d'eau contenant de la glace et il a subi un broyage et une homogénéisation avec (ULTRA TURRAX, IKAR WERKE) à 13 500 t/mn pendant 30 mn. Le contenu de bécher a été filtré et le filtrat obtenu était concentré à un quart du volume initial. Puis, on a précipité les alcaloïdes par l'addition du NH₄OH concentré jusqu'à l'obtention du pH égal à 10. Ensuite, il a subi une centrifugation à 3 000g à 4°C pendant 10 mn et le précipité était lavé avec 1% NH₄OH et recentrifugé. Enfin, le précipité était séché, pesé et stockés à 4°C pour d'autres essais.

5-2-Extraction des flavonoïdes

Afin d'extraire les flavonoïdes, l'extraction liquide - liquide et/ou solide-liquide sont les procédures les plus couramment utilisées. En effet, ces techniques sont faciles d'utilisation, très efficaces et peuvent être

largement appliquées. Les solvants d'extraction les plus communément utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle et n-butanol. Les solvants moins polaires (dichlorométhane, chloroforme, hexane et benzène) sont utilisés pour éliminer les composés apolaires (cires, huiles, stérols et chlorophylle). Les extractions sont répétées deux à trois fois et les extraits sont ensuite combinés. Les techniques d'extraction liquide-solide les plus utilisées sont : l'extraction à reflux et la macération (Muanda, 2010).

10 g du matériel végétal broyé a été mélangé avec un volume de 500 ml du méthanol aqueux (80%). Le bécher contenant ce mélange a été suspendu dans un bain d'eau contenant de la glace et il a subi un broyage et une homogénéisation avec (ULTRA TURRAX, IKAR WERKE) à 13 500 t/mn pendant 30 mn. Le contenu du bécher a été filtré et le résidu a été de nouveau traité de la même façon. Le volume total du filtrat était évaporé à sec par un évaporateur rotatif à 45°C. L'extraction liquide-liquide des flavonoïdes a été réalisée selon Bekkara Atik (1999). Alors, le résidu sec obtenu a été pesé et traité avec 10 ml d'eau distillée bouillante. Puis, l'extrait brut a été soumis à plusieurs affrontements par divers solvants organiques (acétate d'éthyle et n-butanol). Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter. La phase aqueuse et le solvant (V/V) sont mélangés et après un repos de 1h, on récupère séparément la phase eau et le solvant utilisé chargé de ses composés spécifiques. Pour chaque solvant, on refait trois fois cette opération pour un entraînement maximal des flavonoïdes. Les fractions obtenues (acétate d'éthyle et n-butanol) ont été lavées avec du Na₂SO₄ et évaporées à sec par un évaporateur rotatif à 45°C. Les résidus secs ont été pesés et stockés à 4°C pour d'autres essais.

5-3-Extraction des saponosides

On a utilisé la méthode de Makkar et *al.* (2007). 10 g du matériel végétal broyé a été mélangé avec un volume de 500 ml du méthanol aqueux (50%). Le bécher contenant ce mélange a été suspendu dans un bain d'eau contenant de la glace et il a subi un broyage et une homogénéisation avec (ULTRA TURRAX, IKAR WERKE) à 13 500 t/mn pendant 30 mn. Le contenu de bécher a été centrifugé à 3 000 g à 4°C pendant 10 mn. Le surnageant a été filtré et le résidu de l'extraction par homogénéisation a été de nouveau traité par le même procédé. Le méthanol du volume total du filtrat était évaporé à sec par un évaporateur rotatif à 42°C. La phase aqueuse a été centrifugée à 3 000 g à 4°C pendant 10 mn afin d'éliminer les molécules insolubles dans l'eau. Enfin, l'extrait aqueux a été soumis à l'épuisement dans une ampoule à décanter par le n-butanol. La phase butanolique obtenue a été lavée avec du Na₂SO₄ et évaporée à sec par un évaporateur rotatif à 45°C. Le résidu sec obtenu a été pesé et stocké à 4°C pour d'autres utilisations.

5-4-Calculs du rendement

Rendement = (le poids de l'extrait / le poids de la plante à traiter) x 100

Chapitre 3 : Activités Biologiques

1-Activité antioxydante

1-1-La réduction du fer (méthode de FRAP)

La capacité de nos extraits végétales à réduire Fe^{3+} a été évaluée par la méthode d'Oyaizu (1986). L'extrait végétal a été dissout par le méthanol afin de préparer les différentes concentrations. Un millilitre de chaque concentration a été mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon de phosphate de sodium (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium à 1%. Ensuite le mélange était incubé à 50°C dans un bain-marie pendant 20 mn. Après incubation on a ajouté 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10%, et le mélange a été centrifugé à 3 000g pendant 10 mn. La fraction supérieure (2,5 ml) a été mélangée à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique à 0,1%. Après agitation du mélange, l'absorbance a été déterminée à 700 nm en utilisant le spectrophotomètre (JEN WAY 6405 UV/Vis) contre un blanc (même solution sans extrait). L'acide ascorbique a été employé comme contrôle positif.

Afin d'explorer les résultats obtenus, on trace un graphe des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations testées en utilisant le programme Microsoft Office Excel 2007 et le programme Origin Pro 8 SRO v8.0724 (B724). L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé. La valeur EC_{50} est la concentration en extrait à laquelle l'absorbance est égale à 0,5 du pouvoir réducteur. Cette valeur est obtenue à partir du graphe.

1-2- Activité antiradicalaire par le test de DPPH

Le procédé de Brand-Williams et *al.* (1995) a été adopté pour l'évaluation de la capacité de piégeage des radicaux libres des extraits. Brièvement, l'extrait sec a été dissout par le méthanol afin d'obtenir des concentrations différentes. Le mélange contenu dans le volume total de 1 ml, 500 μ l de l'extrait, 125 μ l de DPPH préparés (1 mM en méthanol) et 375 μ l de méthanol. L'acide ascorbique a été employé comme contrôle positif. Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes à 25°C, la diminution de l'absorbance a été mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre (JEN WAY 6405 UV/Vis) contre le blanc de chaque concentration (extrait plus le méthanol). La capacité de piéger le radical DPPH a été calculée comme suit :
[% RSA= (Abs contrôle – Abs t) / Abs contrôle x 100%]

La corrélation entre chaque concentration et son pourcentage d'inhibition a été tracée, et l' EC_{50} a été calculée par interpolation. L'activité a été exprimée comme EC_{50} (la concentration de l'extrait nécessaire pour réduire 50% des radicaux de DPPH).

2-Activité antibactérienne

2-1-Les souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes utilisées ont été conservées sur gélose nutritive en tubes inclinés à 4°C. Toutes ces souches proviennent du laboratoire de recherche (Produits Naturels, Tlemcen) à l'exception du *Bacillus cereus* ATCC 11778 qui provient du Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem. Le tableau 2 rapporte l'ensemble des souches bactériennes testées.

Tableau 2. Les différentes souches bactériennes utilisées

Souches microbiennes testées
Bactéries :
<ul style="list-style-type: none">• <i>Bactéries à Gram positif</i><ul style="list-style-type: none"><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212• <i>Bactéries à Gram négatif</i><ul style="list-style-type: none"><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090

2-2-Préparation de l'inoculum bactérien

La préparation de l'inoculum bactérien du test nécessite, premièrement le contrôle de pureté des souches utilisées. On a réalisé cette étape par ré-isolément de chacune des souches sur leur milieu spécifique (Tableau 3).

Tableau 3. Milieux d'isolement spécifique pour chaque souche utilisée

Souches	Milieux d'isolement
<i>Bacillus cereus</i>	Gélose nutritive
<i>Citrobacter freundii</i>	Mac Conkey
<i>Enterobacter cloacae</i>	Mac Conkey
<i>Enterococcus faecalis</i>	Mac Conkey
<i>Escherichia coli</i>	Mac Conkey
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mac Conkey
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gélose nutritive
<i>Proteus mirabilis</i>	Mac Conkey
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose nutritive
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mac Conkey

Après 24 h d'incubation, on a effectué des précultures en bouillon nutritif à partir des souches purifiées. Ces précultures ont été incubées à 37°C pendant 18 h à 24 h. Lors des essais, ces précultures servent à la préparation des suspensions bactériennes dans l'eau physiologie avec ajustement à $1,5 \times 10^6$ UFC/ml. Ce nombre correspond à une absorbance de 0,1 en utilisant le spectrophotomètre (JEN WAY 6405 UV/Vis) à la longueur d'onde 600 nm (Tereschuck et al., 1997).

2-3-Protocole expérimental du pouvoir antibactérien

Le pouvoir antibactérien des extraits a été évalué en utilisant la méthode de diffusion sur disque décrite par Berghe et Vlietinck (1991). Le milieu utilisé est Muller-Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens. Les disques sont fabriqués à partir de papier filtre avec un diamètre d'environ 6 mm en utilisant l'emporte-pièce. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai et stérilisés à l'autoclave. Entre temps, l'extrait sec a été solubilisé dans le DMSO et à partir de cette solution, on a préparé différentes dilutions (0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml pour l'extrait d'*Atractylis humilis* ; 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml et 50 mg/ml pour les extraits d'*Eryngium maritimum* ; 5 mg/ml, 10 mg/ml et 20 mg/ml pour les extraits de *Salvadora persica*).

Afin de réaliser le test, tout d'abord on a coulé le milieu de culture Mueller-Hinton dans une boîte de Pétri. Ensuite, on a déposé 1 ml d'inoculum bactérien sur la surface du milieu de culture après son solidification. Après étalement homogène de cet inoculum et un repos de 15 mn, on a jeté le surplus et on a séché la boîte de Pétri.

A l'aide d'une pince stérile, on a placé les disques (trois par boîte) sur la gélose, ensuite on a déposé par micropipette 5 µl de l'extrait sélectionné. Le DMSO était utilisé comme contrôle négatif. La boîte de Pétri était laissée 30 mn à la température ambiante afin de faciliter la diffusion de l'extrait.

La boîte était incubée à l'étuve à 37°C durant 24 h. Après incubation, l'absence de la croissance bactérienne était traduite par un halo translucide autour du disque, dont le diamètre était mesuré et exprimé en millimètre.

3-Activité antifongique

3-1-Les souches fongiques utilisées

Afin de réaliser le test d'activité antifongique des extraits, on a utilisé des souches qui proviennent du laboratoire de Produits naturels. Ces souches : *Cladosporium herbarum* MNHN 3369, *Alternaria alternata* MNHN 843390, *Aspergillus fumigatus* MNHN 566, *Aspergillus flavus* MNHN 994294 ont été conservées sur PDA en tubes inclinés à 4°C.

3-2-Préparation de l'inoculum fongique

La préparation de l'inoculum fongique du test nécessite, premièrement le contrôle de pureté des souches utilisées. On a réalisé cette étape par ré-isolément de chacune des souches sur le milieu de culture PDA. Après 7 jours d'incubation à 30°C, un disque de champignon de 6 mm de diamètre était découpé stérilement par la face inférieure de la pipette Pasteur. Il était transféré, ensuite, dans un tube d'eau physiologie afin de préparer une suspension de spores fongiques de 10^4 spore/ml (Murray et *al.*, 1995 ; Attrassi et *al.*, 2008).

3-3-Protocole expérimental du pouvoir antifongique

Le pouvoir antifongique des extraits a été évalué en utilisant la méthode de diffusion sur disque décrite par Murray et *al.* en 1995. Le milieu de culture utilisé est le PDA. Les disques sont fabriqués à partir de papier filtre avec un diamètre d'environ 6 mm en utilisant l'emporte-pièce. Ensuite ces disques sont mis dans un tube à essai et stérilisés à l'autoclave.

Entre temps, l'extrait sec a été solubilisé par le DMSO et à partir de cette solution, on a préparé différentes dilutions (20 mg/ml, 30 mg/ml et 50 mg/ml) pour les extraits d'*Eryngium maritimum*.

Afin de réaliser le test, tout d'abord on a coulé le milieu de culture PDA dans une boîte de Pétri. Ensuite, on a déposé 1 ml d'inoculum fongique sur la surface du milieu de culture après son solidification. Après étalement homogène de cet inoculum et un repos de 15 mn, on a jeté le surplus et on a séché la boîte de Pétri.

A l'aide d'une pince stérile, on a placé les disques (trois par boîte) sur la gélose, ensuite on a déposé par micropipette 5 µl de l'extrait sélectionné. Le DMSO était utilisé comme contrôle négatif. La boîte de Pétri était laissée 30 mn à la température ambiante afin de faciliter la diffusion de l'extrait.

La boîte était incubée à l'étuve à 30°C durant 72 h. Après incubation, l'absence de la croissance fongique s'était traduite par un halo translucide autour du disque, dont le diamètre était mesuré et exprimé en millimètre.

Chapitre 4 : Séparation chromatographique

Cette étape a été effectuée pour l'extrait des saponosides des racines d'*Atractylis humilis*.

1-Principe

La chromatographie est aujourd'hui, une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre la phase stationnaire et la phase mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence des groupements d'atomes formant des sites particuliers. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs par rapport à l'autre, mais il faut noter que l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique (Lagnika, 2005).

2-Chromatographie sur couche mince analytique

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques (Lagnika, 2005).

La mise en œuvre d'une CCM nécessite plusieurs matériels tel que :

- ❖ Une cuve chromatographique : c'est un récipient en verre, de forme variable (selon les manipulations à effectuer) fermé par un couvercle maintenu étanche.
- ❖ Une phase stationnaire : c'est une couche d'adsorbant étalée uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10 cm ou 5 x 10 cm) avec une épaisseur comprise entre 0,5 et 2 mm. L'adsorbant que nous avons testé, est le gel de silice, la cellulose et l'alumine.
- ❖ La phase mobile : c'est l'éluant, il est composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants qui migrent lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé.
- ❖ Les échantillons : ils sont le plus souvent solubilisés dans un solvant volatil qui n'est pas forcément le même que l'éluant. On a utilisé le méthanol comme solvant.

A l'aide d'un crayon, on a tracé sur la plaque une ligne de dépôt de l'échantillon à 1 cm de l'extrémité immergée dans l'éluant. Les échantillons à analyser sont appliqués en petits spots sous forme de points sur la plaque par appositions successives au moyen d'une micropipette, et éventuellement séché par ventilation. La plaque est déposée verticalement contre l'une des parois et elle est immergée d'environ 0,5 cm dans la phase mobile constituée, comme on a préalablement indiqué, par un ou plusieurs solvants organiques. Pour une bonne élution, la cuve contenant le solvant d'élution doit être saturée préalablement par la vapeur (Lagnika, 2005).

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée à l'UV (longueurs d'ondes $\lambda = 254$ nm et 365 nm) (Lagnika, 2005). Après 12h, on répète l'examen à l'UV. Si nécessaire, les tâches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés (Lagnika, 2005). On détermine alors, pour chaque constituant, le rapport frontal :

$R_f = \text{distance parcourue par le constituant} / \text{distance parcourue par le solvant}$.

❖ Les systèmes d'éluant testés sont résumés dans le tableau 4.

❖

Tableau 4. Les systèmes d'éluant testés pour chromatographie sur couche mince des saponosides des racines d'*Atractylis humilis*

Eluants	Adsorbants	Détection	Références
Hexane, acétone (1 :4)	Silice avec indicateur de fluorescence UV ₂₅₄	UV	Harborne, 1998
n-butanol, acide acétique, eau (BAW) (4:1:5)	Cellulose avec indicateur de fluorescence UV ₂₅₄	UV	Males et Medic-Saric, 2001
Chloroforme, acide acétique, eau (CAW) (30:15:2)	Silice avec indicateur de fluorescence UV ₂₅₄	UV	Menemen et <i>al.</i> , 2002
Acétate d'éthyle, acide acétique, eau (7:2:2)	Silice avec indicateur de fluorescence UV ₂₅₄	UV	Tava et <i>al.</i> , 2003
Toluène, acétone, éthanol (96%), ammonium (25%) (100:140:32:9)	Oxyde d'alumine avec indicateur de fluorescence UV ₂₅₄	UV	Bathori et <i>al.</i> , 2003
Chloroforme, méthanol, eau (65:35:7)	Silice avec indicateur de fluorescence UV ₂₅₄	Acide sulfurique	Makkar et <i>al.</i> , 2007

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1 : Enquête ethnobotanique de quinze plantes médicinales

Les monographies des espèces retrouvées après notre enquête ethnobotanique sont présentées selon l'ordre alphabétique. En effet, pour chaque espèce, nous avons précisé la position systématique, le nom vernaculaire arabe, le nom vernaculaire français, l'utilisation locale (UL), d'autres utilisations (AU : l'utilisation complétée par la littérature) et la toxicité (T).

1- *Anacyclus pyrethrum* (PNkw1), le Pyrèthre d'Afrique (Astéracées)

UL : Elle est connue sous le nom Tigantas. Elle est utilisée contre les maux de dents par mastication de la racine.

AU : En amazigh, elle est appelée Tiganthas et en arabe Aoud al Athas. La racine est utilisée surtout en usage externe. Elle est recommandée contre les douleurs de dents, la paralysie de la langue. Elle est utilisée soit par mastication des petits morceaux, soit par des bains de bouches et des gargarismes (Beloued, 2009).

2- *Aristolochia longa* (PNkw2), l'Aristolochie longue (Aristolochiacées)

UL : Elle est connue sous le nom Beroustoum, la racine est utilisée en poudre pour le traitement et le nettoyage des dermatoses purulentes.

AU : En arabe, elle est appelée Beroustoum. D'après Ibn Sina, *Aristolochia longa* est utilisée pour le traitement des dermatophytes, les blessures, le maux de dents, et aussi comme nettoyant des pus (Halimi, 1997).

La racine en décoction est utilisée contre les affections intestinales, les intoxications aiguës et pour provoquer l'avortement chez les femmes (Lahsissene et al., 2009).

T : A forte dose, cette plante est très toxique. Elle a en outre un effet cancérigène et tératogène (Hmamouchi, 1999).

3- *Asphodelus microcarpus* (PNkw3), l'Asphodèle à petits fruits (Liliacées)

UL : Elle est connue sous le nom Elberouagh, la racine est utilisée en poudre pour le traitement des dermatoses.

AU : En arabe, elle est appelée Elberouagh. La tubercule est creusé, puis rempli d'huile d'olive qui par la suite est administré en instillation auriculaire, pour le traitement des affections de l'oreille. La poudre ou la décoction du tubercule, est utilisée, en cataplasme, dans les soins des abcès (Lahsissene et al., 2009). Les bulbes pelés sont utilisés en usage externe contre les hémorroïdes et les mycoses (Benchaâbane et Abbad, 1997).

Cette plante était citée par Ibn Sina dans le traitement des dermatoses, des blessures et des pathologies de l'oreille (Halimi, 1997).

4- *Atractylis gummifera* (PNkw4), Chardon à glu (Astéracées)

UL : Elle est connue sous le nom Alddad, elle n'a aucune utilisation thérapeutique, elle est connue par sa toxicité. La ressemblance de ces feuilles à la période sèche (période de récolte des racines) avec les feuilles d'*Eryngium maritimum* rend possible les accidents de toxicité chez les citoyens de cette région.

AU : En arabe, elle est appelée Dad. La racine sèche est utilisée comme fumigation rituelle contre les douleurs buccales (Benkhniq et *al.*, 2011). Elle est aussi employée en fumigation dans le traitement des vertiges, des céphalées et des accouchements difficiles (Mouhib et El Omari, 1988).

Une décoction des racines dans l'eau de javel en utilisation externe, est conseillée contre le rhumatisme (Benkhniq et *al.*, 2011).

La racine en poudre, associée au henné, est recommandée comme assouplissant des cheveux et antipelliculaire. En inhalation, elle est utilisée pour soigner la fièvre et le rhume (Lahsissene et *al.*, 2009).

T : Cette plante est incriminée dans plusieurs cas d'intoxications sévères, souvent accidentelles (confusion avec d'autre plante) mais pouvant être volontaires lors de tentatives d'autolyse. Selon le bilan du centre Anti-Poisons d'Alger (période 1991 à 2009), cette plante occupe la 1^{ère} position des plantes responsables d'intoxication, soit 10% des intoxications par les plantes (Larabi et *al.*, 2012).

5- *Atractylis humilis* (PNkw5) (Astéracées)

UL : Elle est connue sous le nom de Chendgoura. En médecine populaire, la racine de cette plante est utilisée en décoction dans le traitement des diarrhées. Les cendres des feuilles traitent les mycoses des cheveux. En plus, La racine est utilisée pour le nettoyage des ustensiles de produits laitiers. Cette plante occupe des surfaces importantes dans région d'Aïn Fezza.

6- *Chamaerops humilis* (PNkw6), Palmier nain (Palmacées)

UL : Elle est connue sous le nom de Doum. La racine et les fruits sont consommés par les citoyens. Comme plante médicinale, la racine sèche et en décoction est utilisée contre les ballonnements gastriques, les atteintes gastriques et intestinales. Les feuilles sont utilisées contre les dermatoses.

AU : en arabe elle est appelée Dum. Les racines, en décoction, sont utilisées comme antidiabétique et comme remède des atteintes gastriques et intestinales. En poudre, associées au henné, elle est utilisée contre la chute des cheveux (Lahsissene et *al.*, 2009). Le fruit très astringent, est conseillé contre la diarrhée et les gingivites (Bellakhdar, 1997).

7- *Echinops spinosus* (PNkw7), l'Echinops (Astéracées)

UL : Elle est connue sous le nom Tassekra. La racine en décoction est utilisée en Obstétrique.

AU : En arabe elle est appelée Tassekra. La racine, en décoction, est utilisée également contre les douleurs stomacales, les mauvaises digestions, les refroidissements, les maux urinaires, les règles douloureuses, et administrée aux femmes avant l'accouchement, pour accélérer la délivrance et après l'accouchement, pour expulser le placenta (Lahsissene et *al.*, 2009).

Elle a une action abortive, diurétique et dépurative sanguine (Bellakhdar, 1978).

T : C'est une plante toxique qui provoque des troubles neuro-végétatifs et des effets excitants et convulsifs (Hmamouchi, 1999).

8- *Eryngium maritimum* (PNkw8), le Panicaut maritime (Astéracées)

UL : Elle est connue sous le nom de Guorguaâ. La racine est utilisée sous forme de poudre avec les racines d'autres plantes. Le mélange est ajouté aux différentes soupes à titre préventive de différentes maladies et

comme emménagogue. Elle est utilisée aussi contre les règles douloureuses et administrée aux femmes après l'accouchement pour expulser le placenta. La consommation importante de cette plante l'a entraînée en voie de disparition dans la région d'Aïn Fezza.

AU : En 17^{ième} siècle, en Angleterre, les citoyens ont glacés la racine du Panicaut maritime, qu'ils consommaient comme sucrerie, mais aussi pour prévenir le scorbut. Dans son *Herbier irlandais* (1735), K'Eogh note que cette plante «provoque la miction et les menstruations, favorise les flatulences et élimine les obstructions du foie, des reins et de la vésicule biliaire» (Andrew, 2001).

Au 18^{ième} siècle, cette plante médicinale très populaire était considérée comme étant aphrodisiaque et efficace dans le traitement de certains troubles neurologiques comme la paralysie et les convulsions. En Europe, le Panicaut maritime est actuellement utilisé en phytothérapie comme diurétique. Ils le prescrivent en cas de cystite et d'urétrite ainsi que pour soulager les calculs rénaux. Il ne dissout probablement pas ces derniers mais en retarde la formation. Le panicaut maritime traite également l'augmentation et l'inflammation de la prostate et guérirait les troubles respiratoires (Andrew, 2001).

9- *Ferula communis* (PNkw9), Férule commun ou Faux fenouil (Apiacées)

UL : Elle est connue sous le nom de Klakh. La racine est utilisée en décoction contre la typhoïde. Une décoction de la tige avec le henné est conseillée en usage externe contre la chute des cheveux.

AU : En arabe elle est appelée L'kalkha. C'est dans le rhizome de férule que les marocains tirent la gomme ammoniacale, laquelle, sous sa forme brute, porte le nom de Fasukh. La résine, en décoction, est antidiabétique. En inhalation, elle est utilisée comme sédative (Kahouadji, 1995). Elle est utilisée dans le couscous contre le rhumatisme. Le fasukh est utilisé aussi comme anthelminthique, en frictions locales, contre la teigne, contre les maladies de la peau et contre la stérilité féminine (Bellakhdar, 1997). Le Fasukh est utilisé aussi en tradition magique et spirituelle (Lamnauer, 2005).

10- *Ferula lutea* (PNkw10) (Apiacées)

UL : Elle est connue sous le nom de Kolikha. Les tiges et les feuilles sont utilisées en tradition rituelle contre l'avortement successif de la femme et la mélancolie. La tige et les feuilles sont utilisées en décoction avec le henné pour soigner la chute des cheveux.

11- *Mercurialis annua* (PNkw11), Mercuriale annuelle (Euphorbiacées)

UL : elle est connue sous le nom de Naânah nhal, la plante complète est utilisée en tradition spirituelle contre la stérilité de la femme.

AU : Elle est appelé Harriga melsa. La décoction de cette plante est employée contre les douleurs des reins (Lahsissene et al., 2009).

T : A forte dose, elle provoque parfois l'hématurie et la cylindrurie (Charnot, 1945).

12- *Rhamnus alaternus* (PNkw12), le Nerprun ou Alaterne (Rhamnacées)

UL : elle est connue sous le nom Meliles. Les rameaux de la plante en décoction sont utilisés contre la jaunisse.

AU : En arabe, elle est appelée Melliles et en amazigh « Ajroudj ». Cette plante est citée par Ibn Bittar comme Melliles. Elle renforce le foie et la rate. Elle est aussi conseillée comme antalgique contre les douleurs de l'estomac des enfants (Benkhniq et *al.*, 2011).

Une décoction des fruits a un effet purgatif. L'écorce de la racine ou du tronc en décoction sont utilisés spécifiquement contre la jaunisse (Beloued, 2009).

13- *Satureja graeca* (PNkw13) (Lamiacées)

UL : Elle est connue sous le nom de Zaâtria. C'est une plante très aromatique, surtout les feuilles.

14- *Teucrium fruticans* (PNkw14), germandrée arbrisseau (Lamiacées)

UL : Elle n'est pas utilisée par la population de cette région. On était attiré par l'odeur de ces feuilles.

AU : En arabe, elle est appelée Bayydda. Les racines en décoction agissent contre la jaunisse et la fièvre (Kahouadji, 1995).

15- *Thymus ciliatus* (PNkw15), le thym (Lamiacées)

UL : Elle est connue sous le nom de Zriwechen. La partie aérienne de cette plante est utilisée pour la préparation de la soupe d'escargot.

AU : En arabe, elle est appelée Djertil (Hendel et *al.*, 2012). Cette plante a une odeur forte, aromatique très agréable, une saveur amère et chaude. Elle est très utilisée en phytothérapie. Elle est très employée en cuisine pour son arôme agréable. Elle est aussi exploitée par la parfumerie et l'industrie pharmaceutique (Damerdji, 2012). La partie aérienne est utilisée en décoction ou en infusion comme une plante antibactérienne, vermifuge, carminative et tonique (Hendel et *al.*, 2012).

Chapitre 2 : *Atractylis humilis*

1-Réactions de caractérisation

Les réactions de caractérisation (Tableau 5) nous ont permis de détecter la présence des flavonoïdes, des saponosides, des cardénolides, des tannins catéchiques et des tannins galliques aussi bien dans les racines que dans les feuilles d'*Atractylis humilis*.

Par contre, on a révélé l'absence des alcaloïdes, des coumarines, des flavones aglycones, des triterpènes et stérols, des quinones libres et des polyuronides.

Tableau 5. Résultats du screening phytochimique des racines et des feuilles d'*Atractylis humilis*

Familles phytochimique	Racines	Feuilles
Alcaloïdes	-	-
Cardénolides	+	+
Coumarines	-	-
Flavonoïdes	+	++
Flavone aglycone	-	-
Quinones libres	-	-
Polyuronides	-	-
Saponosides	++	+
Tannins catéchiques	+	++
Tannins galliques	+	+
Triterpène et stérol	-	-

(-) signifie absence ; (+) signifie présence, (++) signifie présence en abondance.

2-Extraction des saponosides

Le rendement d'extraction des saponosides des racines d'*Atractylis humilis* est remarquable, avec un pourcentage de l'ordre de 2,5%.

3-Activité antibactérienne

Le tableau 6 englobe les résultats de l'activité antibactérienne des saponosides des racines d'*Atractylis humilis*. Les valeurs obtenues par ce test nous montre que cet extrait est actif contre les bactéries suivantes : *Bacillus cereus* ATCC 10876 (10 mm à 2 mg/ml et 8 mm à 1,5 mg/ml) et *Escherichia coli* (10 mm à 2 mg/ml et 8 mm à 1,5 mg/ml).

Tableau 6. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des saponosides des racines d'*Atractylis humilis* relatives aux différentes souches bactériennes selon la méthode des disques

<i>Bactéries-cibles</i>	<i>Diamètre des zones d'inhibition (mm) en fonction des différentes concentrations (mg/ml)</i>					
	2	1,5	1	0,5	0,25	0,1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	10	8	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	10	8	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-

(-) : non active, le diamètre du disque est inclus.

4-Séparation chromatographique sur couche mince analytique

Le solvant de développement BAW avec les proportions (4:1:5) sur cellulose a été choisi pour la séparation et l'isolement de l'extrait des saponines des racines d'*Atractylis humilis*.

Les différents composés présents dans le chromatogramme ont été délimités sous lampe UV à 356 nm, et cela, selon leurs fluorescences. Les valeurs des Rf ainsi que la fluorescence des composés figurent dans le chromatogramme (Tableau 7 et Figure 7).

D'après le tableau 7, nous constatons que le onzième composé séparé par CCM est probablement la diosgénine en tenant compte des différences entre les conditions expérimentales.

Tableau 7. Résultats de séparation chromatographique sur couche mince des saponosides des racines d'*Atractylis humilis*

Spot	Rf	Couleur	Référence	Eluant	Adsorbant	Composé
1	0,06	Jaune clair	-	-	-	-
2	0,16	Jaune	-	-	-	-
3	0,23	Jaune	-	-	-	-
4	0,29	Jaune	-	-	-	-
5	0,33	Marron	-	-	-	-
6	0,36	Violet	-	-	-	-
7	0,4	Blanc	-	-	-	-
8	0,46	Violet	-	-	-	-
9	0,5	Blanc	-	-	-	-
10	0,56	Marron	-	-	-	-
11	0,6	Vert jaunâtre	Harborne, 1998	Acétone-hexane (4:1)	Silice	Diosgénine
12	0,76	Jaune clair	-	-	-	-
13	0,83	Blanc clair	-	-	-	-
14	0,9	Bleu	-	-	-	-

- Non identifié



Figure 7. Chromatogramme des saponosides des racines d'*Atractylis humilis*
Solvant : BAW (4:1:5) sur cellulose

5-Discussion

A notre connaissance, aucun travail n'a été réalisé sur l'étude phytochimique, l'activité antibactérienne et l'identification des composés.

Les réactions de caractérisation nous ont permis de détecter la présence des flavonoïdes, des saponosides, des cardénolides, des tannins catéchiques et des tannins galliques aussi bien dans les racines que dans les feuilles d'*Atractylis humilis*.

Le screening phytochimique des parties aériennes d'*Atractylis carduus* récoltée en Egypte a révélé la présence des alcaloïdes, des stéroïdes, des saponines, des anthraquinones et des flavonoïdes (Abdel Rahman et al., 2011).

Les racines d'*Atractylis gummifera* ont révélé la présence des diterpènes, des triterpènes et des flavonoïdes (Chaboud et al., 1988 ; Calmes et al., 1994).

Le rendement en saponines des racines d'*Atractylis humilis* (2,5%) est très important comparable aux plantes à saponines, telle que : *Saponaria officinalis* (2,5%) (Chkarnat, 2013).

En ce qui concerne l'activité antibactérienne des saponosides des racines d'*Atractylis humilis*, les résultats sont encourageants. Les saponosides ont exhibé une activité inhibitrice contre les bactéries *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*, à des concentrations de l'ordre de 1,5 mg/ml.

En effet, beaucoup de travaux ont rapporté les propriétés antimicrobiennes considérables des saponosides (Killeen et al., 1998).

Cependant, des saponines de type jujubogénine isolées de *Colubrina retusa* L. ont révélé une activité antibactérienne contre *Mycobacterium intracellulare* avec une CMI de 10 µg/ml (ElSohly et al., 1999).

L'activité antibactérienne des saponines extraites de *Ginseng Korean* vis-à-vis d'*Escherichia coli* est considérable à 0,1% par contre à 0,001%, les saponines favorisent la croissance de cet espèce bactérienne (Joo et al., 1978).

Par ailleurs, l'extrait des saponines de *Sorghum bicolor* a une activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus* (Soetan et al., 2006).

L'extrait méthanolique des parties aériennes d'*Atractylis carduus* a exhibé une activité inhibitrice positive contre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* et une activité inhibitrice négatif contre les bactéries suivantes : *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, en utilisant des concentrations de 6 mg/ml et 23 mg/ml par méthode de puits (100 µl d'extrait/puits). Par ailleurs, l'extrait hexanique des parties aériennes d'*Atractylis carduus* a exhibée une activité inhibitrice positive contre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria ivanovii*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* et *Klebsiella pneumonia* et une activité inhibitrice négatif contre les bactéries, à savoir : *Streptococcus enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria innocu*) en utilisant la concentration de 6 mg/ml par méthode de puits (100 µl d'extrait/puits) (Abdel Rahman et al., 2011).

Par ailleurs, L'extrait méthanolique des parties aériennes d'*Atractylis serratuloides* a donné une activité inhibitrice positive contre *Pseudomonas aeruginosa* et une activité inhibitrice négative contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* et *Bacillus subtilis*. Par contre, L'extrait d'acétate éthylique des parties aériennes d'*Atractylis serratuloides* a exhibé une activité inhibitrice positive contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* et une activité inhibitrice négative contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (Bouaziz et al., 2009).

Enfin, *in vivo*, bon nombre de saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique (Bruneton, 1999).

La séparation chromatographique sur couche mince des saponines des racines d'*Atractylis humilis* était difficile. On a essayé plusieurs adsorbants et systèmes de migration spécifique pour les saponines pour enfin arriver à séparer 14 composés en utilisant le système BAW sur cellulose.

Concernant l'identification des composés séparés, le constituant (11) est probablement la diosgénine. En effet, ce dernier présente les mêmes caractéristiques que le composé 11, à savoir : la tâche est de couleur vert jaunâtre et le Rf est de 0,6. Par contre, il est à noter qu'on utilisé un éluant différent : BAW (4:1:5) contre hexane-acétone (1:4) et un adsorbant différent : cellulose contre silice.

En effet, les saponines sont beaucoup plus polaires que les sapogénines en raison de leurs liaisons glycosidiques, et leur séparation par chromatographie sur couche mince sur cellulose est plus facile (Harborne, 1998).

Suite à la présence des saponines, habituellement, chez les plantes sous forme d'un mélange de forme structurellement apparenté avec une importante similarité polaire, leur séparation reste toujours un défi (Oleszek et Bialy, 2006).

Ainsi la méthode d'extraction des saponines joue un rôle important pour garder la structure des composés isolés par chromatographie. Dans notre étude, l'utilisation du froid et un temps de contact avec le solvant très réduit permet d'isoler des produits non dénaturés (Oleszek et Bialy, 2006).

Il est à noter que les premiers travaux sur les saponines ont utilisé la méthode d'extraction à chaud en utilisant un solvant alcoolique aqueux, suivie par l'évaporation du solvant et finalement un fractionnement par le butanol. Ainsi, l'extraction à chaud peut détacher certaines fonctions instables (les formes acylés) et produire des artéfacts au niveau des génines. Cependant, afin d'obtenir la composition réel de saponines, il faut utiliser la méthode d'extraction à froid en présence de l'éthanol aqueux (Oleszek et Bialy, 2006).

Par ailleurs, l'utilisation de la chromatographie sur couche mince pour l'étude qualitative des saponines était rapportée par certaines recherches. La séparation de 18 saponines de *Medicago sativa* par cette technique est un bon exemple (Glensk et al., 2001).

Chapitre 3 : *Eryngium maritimum*

1-Rendements

Le tableau 8 rapporte les résultats du rendement en extraits obtenu pour chaque extraction à partir des racines d'*Eryngium maritimum*.

On a remarqué que le rendement de l'extrait méthanolique ($5,6 \pm 0,1$ %) est similaire à celui de l'extrait acétonique ($5,6 \pm 0,4$ %). Par contre, le rendement d'extrait butanolique était plus important ($3 \pm 0,2$ %) à celui de l'acétate éthylique ($0,3 \pm 0,02$ %).

Tableau 8. Rendements des différents extraits des racines d'*Eryngium maritimum*

Extraits	Rendement (%)
Extrait méthanolique	$5,6 \pm 0,1$
Extrait acétonique	$5,6 \pm 0,4$
Extrait acétate éthylique	$0,3 \pm 0,02$
Extrait butanolique	$3 \pm 0,2$

2-Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes

Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en mg d'équivalent pyrocatechol par g d'extrait sec (mg EP/g ES) et en mg d'équivalent rutine par g d'extrait sec (mg ER/g ES), respectivement.

2-1-Courbe d'étalonnage des phénols totaux

On obtient une valeur X mg équivalent de pyrocatechol/g d'extrait sec et la densité optique Y (Figure 8).

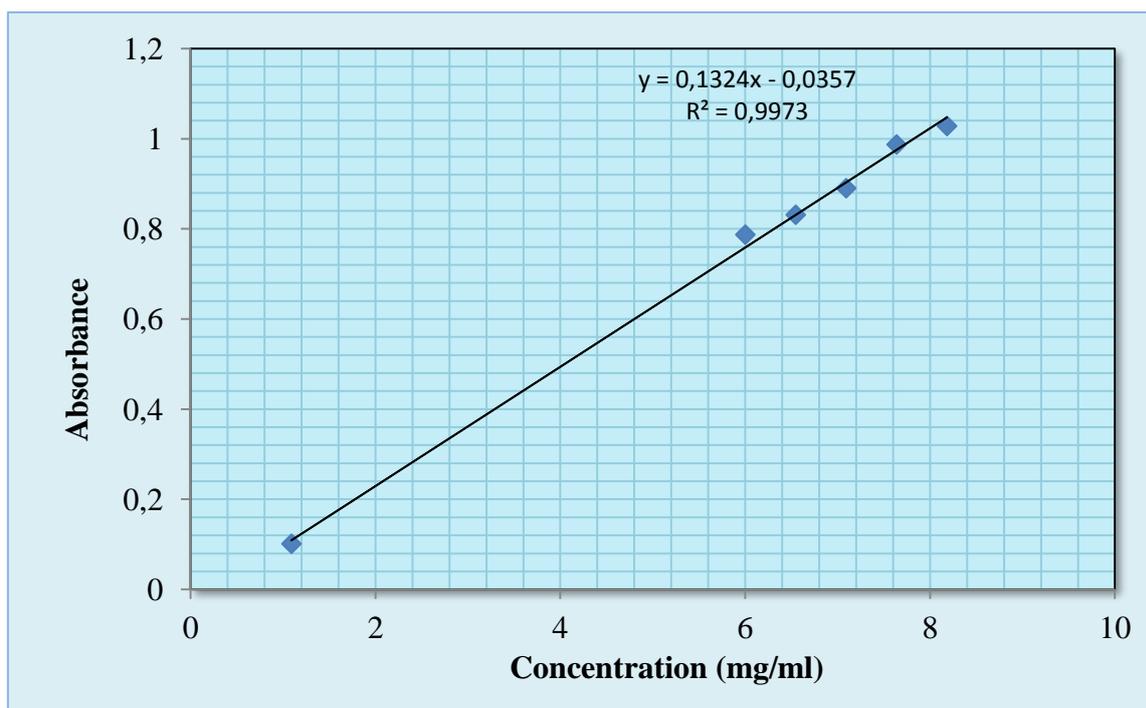


Figure 8. Courbe d'étalonnage du pyrocatechol pour le dosage des phénols totaux

2-2-Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

On obtient une valeur X mg équivalent de rutine/g d'extrait sec et la densité optique Y (Figure 9).

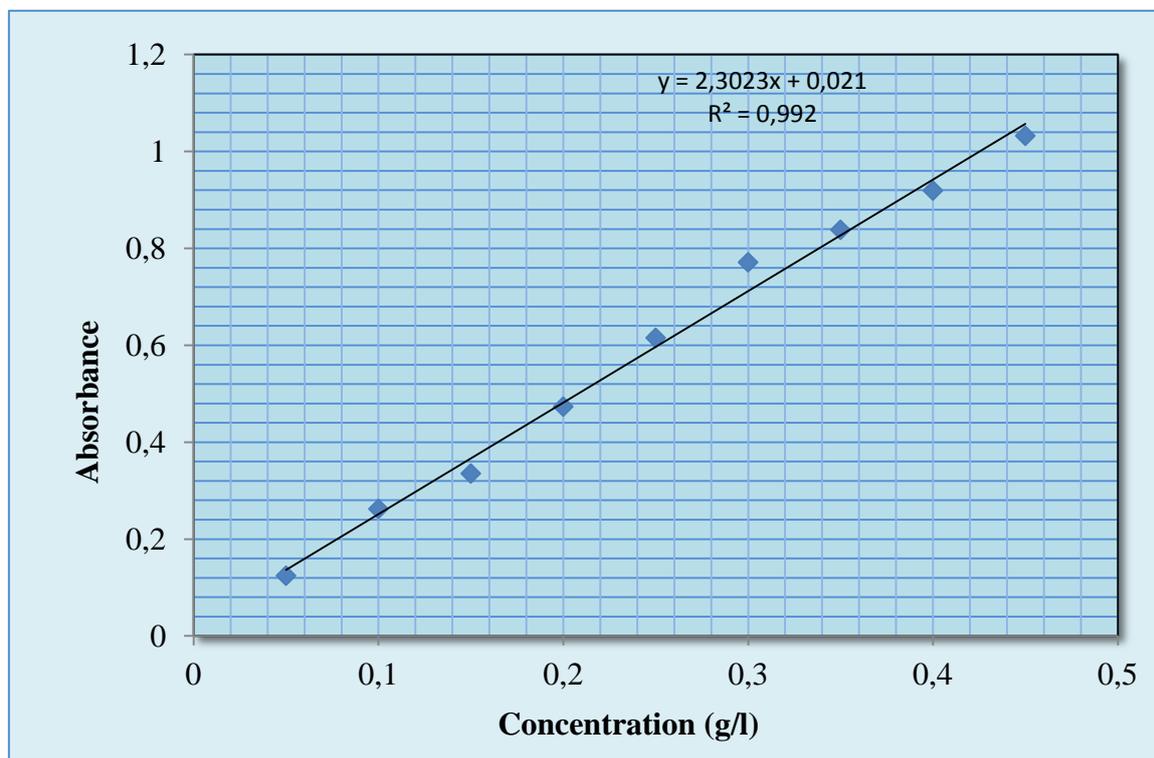


Figure 9. Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonoïdes

2-3- Résultats du dosage des extraits

Le tableau 9 résume les résultats obtenus concernant les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits bruts des racines d'*Eryngium maritimum*.

Nous remarquons que la teneur élevée en phénols totaux est obtenue dans l'extrait acétonique ($55,80 \pm 2,75$ mg EP/g ES) en comparaison avec l'extrait méthanolique ($46,72 \pm 4,69$ mg EP/g ES). Aussi, la teneur en flavonoïdes est élevée dans l'extrait acétonique ($1,505 \pm 0,013$ mg EP/g RS) en comparaison avec l'extrait méthanolique ($1,138 \pm 0,016$ mg EP/g ER).

Tableau 9. Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes des racines d'*Eryngium maritimum*

Extraits	Phénols totaux (mg PE/g ES)	Flavonoïdes (mg RE/g ES)
Extrait méthanolique	$46,72 \pm 4,69$	$1,138 \pm 0,016$
Extrait acétonique	$55,80 \pm 2,75$	$1,505 \pm 0,013$

3-Activité antioxydante

Pour comparer la capacité antioxydante des extraits d'*Eryngium maritimum*, nous avons déterminé expérimentalement le paramètre EC_{50} (Tableau 10).

3-1-Activité antiradicalaire par le test de DPPH

Les résultats du test de DPPH (Tableau 10) ont prouvé que l'extrait butanolique a une activité la plus importante avec une valeur EC_{50} de $0,0104 \pm 0,0004$ mg/ml suivi de l'extrait acétonique, l'extrait d'acétate éthylique et l'extrait méthanolique avec la valeur EC_{50} de $0,0818 \pm 0,0048$ mg/ml, $0,12 \pm 0,0062$ mg/ml et $0,2350 \pm 0,0056$ mg/ml, respectivement. Ces extraits ont montré une légère activité antiradicalaire inférieure à celle de l'acide ascorbique ($EC_{50}=0,008 \pm 0,0001$ mg/ml).

Tableau 10. Résultats de l'activité antiradicalaire DPPH et du pouvoir de réduction du fer des extraits des racines d'*Eryngium maritimum*

Extraits	EC_{50} (mg/ml) de DPPH	EC_{50} (mg/ml) du pouvoir de réduction de fer
Extrait méthanolique	$0,2350 \pm 0,0056$	$0,4719 \pm 0,0000$
Extrait acétonique	$0,0818 \pm 0,0048$	$0,3648 \pm 0,0099$
Extrait acétate éthylique	$0,12 \pm 0,0062$	$0,3972 \pm 0,0022$
Extrait butanolique	$0,0104 \pm 0,0004$	$0,1139 \pm 0,0112$
Acide ascorbique	$0,008 \pm 0,0001$	$0,0203 \pm 0,0018$

3-2-Pouvoir de réduction du fer

Suivant les valeurs du tableau 10 et la figure 10, le pouvoir de réduction de fer de l'extrait butanolique, exprimée comme EC_{50} , était plus élevé que les autres extraits ($0,1139 \pm 0,0112$ mg/ml), suivi par l'extrait acétonique, l'extrait d'acétate éthylique et l'extrait méthanolique avec la valeur EC_{50} ($0,3648 \pm 0,0099$ mg/ml, $0,3972 \pm 0,0022$ et $0,4719 \pm 0,0000$ mg/ml), respectivement. L'acide ascorbique révèle une activité réductrice plus élevée de l'ordre de $0,0203 \pm 0,0018$ mg/ml.

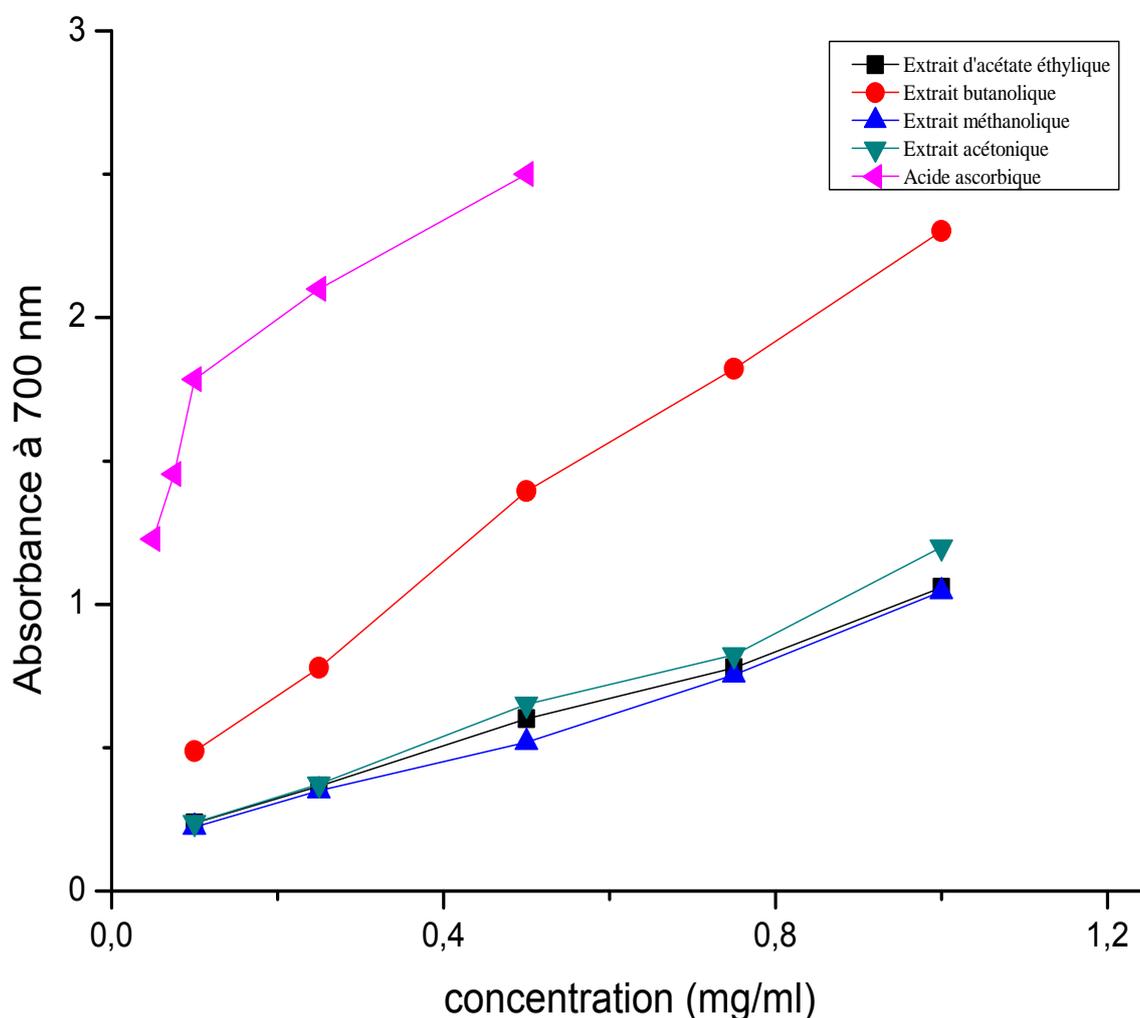


Figure 10. Pouvoir de réduction de fer des extraits des racines d'*Eryngium maritimum*

4-Activité antibactérienne

Le tableau 11 rapporte l'activité antibactérienne des extraits des racines d'*Eryngium maritimum* en utilisant la méthode de diffusion sur disque contre les bactéries pathogènes choisies.

L'activité la plus remarquable des extraits des racines d'*Eryngium maritimum* a été exhibée par l'extrait d'acétate éthylique contre *Bacillus cereus* ATCC 10876 (9,66 mm à 20 mg/ml)

L'extrait d'acétate éthylique était actif à une concentration de 10 mg/ml contre toutes les bactéries testées sauf *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 et *Pseudomonas aeruginosa*. Le même extrait, mais, avec des concentrations plus élevées (15 mg/ml et 20 mg/ml) était actif contre toutes les bactéries testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*.

L'extrait butanolique a montré une activité inhibitrice à des concentrations (10 mg/ml et 15 mg/ml) contre toutes les bactéries testées sauf *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* et *Salmonella typhimurium*. Le même extrait, mais, avec une concentration de 20 mg/ml était actif contre toutes les bactéries testées sauf *Enterococcus faecalis*.

Par ailleurs, l'extrait méthanolique a montré une activité inhibitrice à des concentrations (25 mg/ml et 30 mg/ml) contre toutes les bactéries testées sauf *Klebsiella pneumoniae*. Le même extrait, mais, avec la concentration de 50 mg/ml, était actif contre toutes les bactéries testées.

L'extrait acétonique a exhibé une activité inhibitrice à des concentrations (25 mg/ml et 30 mg/ml) contre toutes les bactéries testées sauf *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Aussi, il était actif contre toutes les bactéries sauf *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* avec la concentration de 50 mg/ml.

Tableau 11. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des extraits des racines d'*Eryngium maritimum* relatives aux différentes souches bactériennes selon la méthode des disques

Extraits (mg/ml)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)										
	<i>S.a</i>	<i>K.p</i>	<i>L.m</i>	<i>En.c</i>	<i>E.f</i>	<i>E.c</i>	<i>C.f</i>	<i>P.a</i>	<i>P.m</i>	<i>B.c</i>	<i>S.t</i>
	ME										
25	7,5	-	7	6	6	7	6	6	7	7	6
30	8	-	8	6,16	7	7,18	6,16	6,16	7,18	7,18	6,5
50	8,5	6	9	6,5	7,5	7,5	6,5	6,5	7,5	7,66	7
	AC										
25	-	-	7	6	6,5	6,5	7	-	6	9	6
30	-	-	9	6,16	6,83	6,83	7,18	-	7	9,33	6,5
50	6	-	11	6,5	7	7	7,66	-	8	9,5	7
	AEt										
10	6	7	-	7	8	7	7,33	-	7	9	7
15	7	7,66	6	7,66	8,33	7,18	7,66	-	7,33	9,33	8
20	9	8	7	8	8,83	7,66	8	-	7,66	9,66	9
	Bu										
10	6,5	7	8,5	8	-	6	6,5	8	-	7,5	-
15	6,83	7,18	8,83	8,5	-	6,16	6,83	8,33	-	7	-
20	7	7,5	9	9	-	6,5	7	8,5	6	8,5	6

Extraits : ME (Extrait méthanolique), AC (Extrait acétonique), AEt (Extrait acétate éthylique), Bu (Extrait butanolique). Bactéries : *S.a* (*Staphylococcus aureus*), *K.p* (*Klebsiella pneumoniae*), *L.m* (*Listeria monocytogenes* ATCC 15313), *En.c* (*Enterobacter cloacae*), *E.f* (*Enterococcus faecalis*), *E.c* (*Escherichia coli*), *C.f* (*Citrobacter freundii*), *P.a* (*Pseudomonas aeruginosa*), *P.m* (*Proteus mirabilis*), *B.c* (*Bacillus cereus* ATCC 10876) et *S.t* (*Salmonella typhimurium*).

(-) : non active, le diamètre du disque est inclus.

5-Activité antifongique

L'activité antifongique des différents extraits des racines d'*Eryngium maritimum* est présentée dans le tableau 12. Les résultats ont prouvé que l'extrait d'acétate éthylique a révélé une activité antifongique la plus forte contre tous les mycètes particulièrement, contre *Aspergillus flavus* (10 mm à 50 mg/ml). Les extraits méthanolique, acétonique et butanolique présente une activité inhibitrice la plus élevée contre *Cladosporium herbarum* et *Aspergillus fumigatus*, par contre aucune activité inhibitrice n'a été observée contre *Alternaria alternata* et *Aspergillus flavus*.

Tableau 12. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des extraits des racines d'*Eryngium maritimum* relatives aux différentes souches fongiques selon la méthode des disques

Extraits (mg /ml)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	<i>A.a</i>	<i>Cl.h</i>	<i>A.fl</i>	<i>A.fu</i>
	Me			
20	-	7,18	-	6,83
30	-	8	-	8
50	-	9,33	-	9
	Ac			
20	-	-	-	-
30	-	7,18	-	-
50	-	8	-	7
	AE			
20	6,83	7	-	7,5
30	7,5	8	8,66	8
50	8,83	9	10	9,66
	Bu			
20	-	-	-	-
30	-	7	-	8,66
50	-	8	-	10

Extraits : Me (Extrait Méthanolique), Ac (Extrait Acétonique), AE (Extrait Acétate Ethylique), Bu (Extrait Butanolique). *A.a* (*Alternaria alternata*), *Cl.h* (*Cladosporium herbarum*), *A.fl* (*Aspergillus flavus*) et *A.fu* (*Aspergillus fumigatus*).

(-) : non active, le diamètre du disque est inclus.

6-Discussion

Les rendements des extraits acétonique et méthanolique des racines d'*Eryngium maritimum* (5,6%) sont considérablement différents de ceux obtenus par de Kupeli et *al.* en 2006 (extraits éthanolique et aqueux : 16,1% et 38,3% respectivement). Cette différence est du probablement à la méthode d'extraction ainsi qu'aux solvants utilisés.

En ce qui concerne le taux des composés phénoliques, dans l'extrait méthanolique comme dans l'extrait acétonique ($46,72 \pm 4,69$ mg EP/g ES et $55,80 \pm 2,75$ mg EP/g ES), il était supérieur à ceux déterminés dans les feuilles par Meot-Duros et *al.* en 2008 ($16,44 \pm 0,30$ mg équivalent d'acide gallique/g extrait brut).

En raison des manières multiples desquelles un antioxydant peut protéger les molécules biologiques contre des dommages des oxydants, nous avons utilisé deux réactions pour évaluer l'activité antioxydante, afin de déterminer le véritable potentiel antioxydant des racines d'*Eryngium maritimum* (Aruoma, 2003).

L'activité antioxydante des extraits n'était pas rapportée par les travaux antérieurs. Une seule étude a été réalisée sur l'activité antioxydante des feuilles d'*Eryngium maritimum*, mais par le test TAC /ABTS + (Meot-Duros et *al.*, 2008).

Notre étude a démontré que l'activité la plus élevée est celle de l'extrait butanolique. La propriété antioxydante importante de cet extrait est associée aux flavonoïdes. Les polyphénols ont été longtemps considérés bénéfiques pour la santé, dont beaucoup de chercheurs ont pensé que leurs bons effets sont peut être dus à leurs aptitudes antioxydantes et également à leurs capacités antiradicalaires (Zhang et Björn, 2009).

En effet, l'efficacité antioxydante des flavonoïdes directement liée à leur degré d'hydroxylation est diminuée en présence d'une partie de sucre. Les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux d'hydroxyle, de peroxyde, et de l'anion superoxyde (Bors et *al.*, 1990 ; Chen et *al.*, 1990).

Dans notre étude, les résultats de l'activité antibactérienne ont prouvé que *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* ATCC 10876 ont été inhibées par tous les extraits. Ainsi, seulement les extraits méthanolique et butanolique ont une activité contre *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats de l'activité antifongique ont prouvé que l'extrait d'acétate éthylique a révélé une activité la plus importante contre tous les mycètes, particulièrement vis-à-vis d'*Aspergillus flavus* (10 mm à 50 mg/ml). Ces résultats sont encourageants dans le domaine de recherche de nouveaux antifongiques.

L'activité antifongique de l'extrait éthanolique des feuilles et des racines d'*Eryngium maritimum* était étudiée par Thiem et *al.* (2010), vis-à-vis des champignons suivants : *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Aspergillus niger*. L'activité la plus élevée était obtenu avec les racines contre *Trichophyton mentagrophytes* avec des CMI de l'ordre de 40 µg/ml.

L'activité antibactérienne des feuilles d'*Eryngium maritimum* selon Meot-Duros et *al.* en 2008, était plus importante contre deux des trois espèces de *Pseudomonas* testés, à savoir : *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*. En effet, les fractions polaires et apolaires sont les plus actives avec des CMI :

de 1 et 2 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. En outre, la fraction apolaire a inhibée la croissance du *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Contrairement, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* étaient les bactéries les plus résistantes à la fraction polaire.

Chapitre 4 : *Salvadora persica*

1-Rendements

Le tableau 13 rapporte les résultats du rendement en extrait à partir des tiges et des feuilles de *Salvadora persica*.

Nous remarquons que les rendements des différents extraits des feuilles (extrait méthanolique : $10,92 \pm 0,33$ % ; extrait acétonique : $10 \pm 0,2$ % ; extrait d'acétate éthylique : $0,36 \pm 0,16$ % ; extrait butanolique : $0,56 \pm 0,11$ % ; extrait des alcaloïdes : $1 \pm 0,1$ %) étaient supérieurs à ceux des extraits des tiges (extrait méthanolique : $7,08 \pm 0,12$ % ; extrait acétonique : $6,68 \pm 0,1$ % ; extrait d'acétate éthylique : $0,2 \pm 0,03$ % ; extrait butanolique : $0,32 \pm 0,11$ % ; extrait des alcaloïdes : $0,72 \pm 0,24$ %).

Concernant la différence entre le rendement des extraits du même organe, il n'y a pas une différence significatif entre l'extrait méthanolique et acétonique. Par ailleurs, on remarque que le rendement en alcaloïdes était plus important dans les feuilles ($1 \pm 0,1$ %) par rapport aux tiges ($0,72 \pm 0,24$ %).

Tableau 13. Rendements des extraits des tiges et des feuilles de *Salvadora persica*

	Tiges (%)	Feuilles (%)
Extrait méthanolique	$7,08 \pm 0,12$	$10,92 \pm 0,33$
Extrait acétonique	$6,68 \pm 0,1$	$10 \pm 0,2$
Extrait d'acétate éthylique	$0,2 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,16$
Extrait butanolique	$0,32 \pm 0,11$	$0,56 \pm 0,11$
Extrait des alcaloïdes	$0,72 \pm 0,24$	$1 \pm 0,1$

2- Dosage des phénols totaux, des tannins et des flavonoïdes

Les teneurs en phénols totaux, en tannins et en flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en mg d'équivalent pyrocatechol par g d'extrait sec (mg EP/g ES), mg d'équivalent pyrocatechol par g d'extrait sec (mg EP/g ES), mg d'équivalent rutine par g d'extrait sec (mg ER/g ES).

Le tableau 14 résume les résultats obtenus concernant les teneurs en phénols totaux, en tannins et en flavonoïdes des extraits bruts des feuilles et des tiges de *Salvadora persica*.

Nous remarquons que la teneur élevée en phénols totaux est obtenue avec l'extrait brut des feuilles ($67,32 \pm 0,17$ mg EP/g ES) en comparaison avec celui des tiges ($58,63 \pm 00$ mg EP/g ES).

Concernant les tannins et les flavonoïdes, les teneurs obtenues dans les feuilles sont comparables de l'ordre de ($39,31 \pm 3,81$ mg EP/g ES) et ($0,47 \pm 0,00$ mg ER/g ES) à ceux des tiges ($36,83 \pm 2,76$ mg EP/g ES) et ($0,31 \pm 0,01$ mg ER/g ES) respectivement.

Tableau 14. Dosage des phénols totaux, des tannins et des flavonoïdes des extraits des tiges et des feuilles de *Salvadora persica*

	Tiges	Feuilles
Phénols totaux (mg EP/g ES)	58,63 ± 0,00	67,32 ± 0,17
Flavonoïdes (mg ER/g ES)	0,31 ± 0,01	0,47 ± 0,00
Tannins (mg EP/g ES)	36,83 ± 2,76	39,31 ± 3,81

3-Activité antioxydante

Pour comparer la capacité antioxydante des extraits de *Salvadora persica*, nous avons déterminé expérimentalement le paramètre EC₅₀.

3-1-Activité antiradicalaire par le test de DPPH

Les résultats du test de DPPH (Tableau 15) ont prouvé que l'extrait d'acétate éthylique des feuilles a une activité la plus importante avec une valeur EC₅₀ (11,8 ± 0,07 µg/ml) suivi par l'extrait butanolique des tiges, l'extrait butanolique des feuilles, l'extrait d'alcaloïdes des feuilles, l'extrait d'acétate éthylique des tiges et l'extrait d'alcaloïdes des tiges avec les valeurs EC₅₀ (14 ± 0,1 µg/ml, 257 ± 21 µg/ml, 6233 ± 58 µg/ml, 7817±103 µg/ml et 14891 ± 63 µg/ml) respectivement. Ces extraits de plante ont montré une activité antiradicalaire minimale par comparaison à l'acide ascorbique (EC₅₀ = 10 ± 0,1 µg/ml).

3-2-Pouvoir de réduction du fer

Suivant les valeurs du tableau 15, le pouvoir de réduction de fer de l'extrait d'acétate éthylique des feuilles, exprimée en EC₅₀, était plus élevé des autres extraits (480 ± 6 µg/ml), suivi de l'extrait butanolique des tiges, l'extrait butanolique des feuilles, l'extrait d'alcaloïdes des feuilles, l'extrait d'acétate éthylique des tiges et l'extrait d'alcaloïdes des tiges avec les valeurs EC₅₀ (3290 ± 13 µg/ml, 3660 ± 29 µg/ml, 6680 ± 28 µg/ml, 20124 ± 670 µg/ml et 29520 ± 798 µg/ml), respectivement. L'acide ascorbique avait une activité réductrice plus élevée EC₅₀ (42 ± 8 µg/ml).

Tableau 15. Résultats de l'activité antiradicalaire et du pouvoir de réduction de fer des extraits de *Salvadora persica*

Extraits	EC ₅₀ (µg/ml) de DPPH	EC ₅₀ (µg/ml) du pouvoir de réduction de Fer
Extrait d'acétate éthylique (Tiges)	7817 ± 63	20124 ± 670
Extrait d'acétate éthylique (Feuilles)	11,8 ± 0,07	480 ± 6
Extrait butanolique (Tiges)	14 ± 0,1	3290 ± 13
Extrait butanolique (Feuilles)	257 ± 21	3660 ± 29
Extrait d'alcaloïdes (Tiges)	14891 ± 103	29520 ± 798
Extrait d'alcaloïdes (Feuilles)	6233 ± 58	6680 ± 28
Acide ascorbique	10 ± 0,1	42 ± 8

4-Activité antibactérienne

Le tableau 16 rapporte les résultats obtenus concernant l'activité antibactérienne des extraits des feuilles et des tiges de *Salvadora persica* testée par la méthode de diffusion sur disque contre les bactéries pathogènes choisies.

L'activité la plus remarquable des extraits de *Salvadora persica* a été manifestée par l'extrait d'alcaloïde des tiges contre *Bacillus cereus* (17 mm à 20 mg/ml).

L'extrait d'alcaloïde des tiges était actif à une concentration de 5 mg/ml contre les bactéries suivantes : *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (10 mm), *Enterococcus faecalis* (10 mm) et *Bacillus cereus* ATCC 11778 (10 mm) et non actif contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Le même extrait, mais, avec des concentrations plus élevées (10 mg/ml et 20 mg/ml) était actif contre toutes les bactéries testées.

L'extrait butanolique des tiges a montré une activité inhibitrice à une concentration de 5 mg/ml vis-à-vis des souches microbiennes suivantes : *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (9 mm), *Enterococcus faecalis* (6 mm) *Bacillus cereus* ATCC 11778 (6 mm) *Escherichia coli* (6 mm) et *Staphylococcus aureus* (7 mm), et il n'a montré aucune activité inhibitrice contre *Pseudomonas aeruginosa*. Le même extrait, mais, avec la concentration de 10 mg/ml, était actif contre toutes les bactéries sauf *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est révélée sensible à la concentration de 20 mg/ml.

L'extrait d'acétate éthylique des tiges a montré une activité inhibitrice avec toutes les concentrations contre *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 et *Bacillus cereus* ATCC 11778. Par contre, il était actif contre *Escherichia coli* aux concentrations 10 mg/ml et 20 mg/ml. Les bactéries suivantes : *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ont montré une résistance à toutes les concentrations utilisées.

Par ailleurs, l'extrait d'alcaloïde des feuilles était actif à une concentration de 5 mg/ml contre les bactéries : *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (7 mm), *Enterococcus faecalis* (11 mm) et *Staphylococcus aureus* (6 mm). Le même extrait, mais, avec la concentration de 10 mg/ml, a prouvé une activité inhibitrice contre les bactéries : *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (10 mm), *Enterococcus faecalis* (12 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (8 mm) et *Staphylococcus aureus* (7 mm). Cependant, toutes les bactéries testées se sont révélées sensibles à la concentration la plus élevée, soit 20 mg/ml.

L'extrait butanolique des feuilles a montré une activité inhibitrice à une concentration de 5 mg/ml contre *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (10 mm), *Escherichia coli* (6 mm) et *Staphylococcus aureus* (7 mm). Le même extrait, mais, à la concentration de 10 mg/ml était actif contre les mêmes bactéries mais avec des diamètres d'inhibition différents. En utilisant la concentration de 20 mg/ml, l'extrait a montré une activité inhibitrice contre toutes les bactéries.

L'extrait d'acétate éthylique des feuilles a montré une activité inhibitrice avec la concentration de 5 mg/ml contre *Bacillus cereus* ATCC 11778 (9 mm). Ainsi, il était actif vis-à-vis de : *Escherichia coli* (10 mm), *Enterococcus faecalis* (7 mm) et *Bacillus cereus* ATCC 11778 (12 mm) à la concentration de 10

mg/ml. Le même extrait, mais, avec la concentration de 20 mg/ml était actif contre toutes les bactéries sauf *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 16. Activité antibactérienne des extraits de *Salvadora persica* à différentes concentrations

Extraits (mg/ml)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)					
	<i>L.m</i>	<i>E.f</i>	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>S.a</i>	<i>B.c</i>
	Tiges					
	AE					
5	7	-	-	-	-	10
10	9	-	10	-	-	12
20	11	-	11	-	-	15
	Bu					
5	9	6	6	-	7	6
10	10	7	8	-	9	8
20	11	10	10	9	11	10
	Al					
5	10	10	-	-	-	10
10	12	12	8	7	7	14
20	13	13	9	10	12	17
	Feuilles					
	AE					
5	-	-	-	-	-	9
10	-	7	10	-	-	12
20	10	11	11	-	10	14
	Bu					
5	10	-	6	-	7	-
10	11	-	8	-	9	-
20	13	10	10	8	10	9
	Al					
5	7	11	-	-	6	-
10	10	12	-	8	7	-
20	12	14	8	11	11	7

Extrait : AE (Acétate éthyl), Bu (n-Butanol), Al (Alcaloïdes). Bactéries : *L.m* (*Listeria monocytogenes* ATCC 19111), *E.f* (*Enterococcus faecalis*), *E.c* (*Escherichia coli*), *P.a* (*Pseudomonas aeruginosa*), *S.a* (*Staphylococcus aureus*), *B.c* (*Bacillus cereus* ATCC 11778).

5-Discussion

Dans cette étude, le rendement des extraits, les teneurs en phénols totaux, en tannins et en flavonoïdes, l'activité antioxydante et antimicrobienne des tiges et des feuilles de *Salvadora persica* ont été déterminés.

Nous avons obtenu presque les mêmes résultats concernant le rendement de l'extrait méthanolique que celui obtenu par Souri et *al.* en 2008, soient : 7,08% et 7,4%, respectivement.

Dans la présente étude, la méthode d'extraction par un broyeur-homogénéiseur (ULTRA TURRAX) permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait. De même, le déroulement de cette extraction à température plus basse ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Les résultats de rendement des extraits ont montré que *Salvadora persica* avait une teneur en alcaloïdes (extrait des tiges : $0,72 \pm 0,24$ % ; extrait des feuilles : $1 \pm 0,1$ %) plus importante que celle en flavonoïdes.

Il est à noter qu'un alcaloïde indolique a été isolé des feuilles de *Salvadora persica* (Malik et *al.*, 1987).

La détermination de la teneur des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins des tiges et des feuilles a indiqué que le taux des polyphénols totaux dans les tiges ($58,63 \pm 00$ mg EP/g ES) était supérieur à celui rapporté par Alzoreky et Nakahara (2001) ($1,6 \pm 0,6$ mg d'acide gallique équivalent/g d'extrait brut).

Aussi, la rutine et la quercétine ont été mises en évidence dans les tiges de cette plante (Abdel-Wahab et *al.*, 1990).

En ce qui concerne les tannins, la plupart des auteurs ont rapporté leur présence à une valeur non significative dans *Salvadora persica*, cependant, notre étude a prouvé le contraire.

En raison des manières multiples desquelles un antioxydant peut protéger les molécules biologiques contre des dommages des oxydants, nous avons utilisé deux techniques pour évaluer l'activité antioxydante, afin de déterminer le véritable potentiel antioxydant des tiges et des feuilles (Aruoma, 2003).

L'activité antioxydante de chaque extrait n'était pas rapportée par d'autres chercheurs. Une seule étude a rapporté l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des tiges en utilisant le test ferrylmyoglobine /ABTS + (Alzoreky et Nakahara, 2001).

Notre étude a démontré une activité plus élevée de l'extrait d'acétate éthylique des feuilles pour les deux méthodes utilisées : DPPH ($EC_{50} : 11,8 \pm 0,07$ µg/ml) et FRAP ($EC_{50} : 480 \pm 6$ µg/ml). La propriété antioxydante importante de cet extrait est associée à leurs phénols y compris les flavonoïdes. Les polyphénols ont été longtemps considérés bénéfiques pour la santé, ceci est dû à leurs aptitudes antioxydantes et également à leurs capacités antiradicalaires (Zhang et Björn, 2009). L'activité antiradicalaire des flavonoïdes dépend à un degré élevé de leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques (Al-Bagieh et Weinberg, 1988).

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que les extraits d'alcaloïdes étaient les plus efficaces vis-à-vis des bactéries testées, particulièrement l'extrait des tiges contre *Bacillus cereus* : 17 mm à

20 mg/ml. D'ailleurs, les alcaloïdes se sont généralement avérés avoir des propriétés antimicrobiennes (Arct et Pytkowska, 2008).

Certains auteurs ont montré que l'extrait des tiges exhibe une activité antimicrobienne. En effet, l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux des tiges étaient testés contre six bactéries isolées des infections bucco-dentaires, à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus acidophilus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats ont montré que l'extrait aqueux était plus efficace que l'extrait méthanolique. En effet, il était actif contre toutes les bactéries testées. Cependant, les souches microbiennes : *Lactobacillus acidophilus* et *Pseudomonas aeruginosa* se sont révélées résistantes à l'extrait méthanolique. L'activité antibactérienne la plus importante était exhibée par l'extrait méthanolique contre *Streptococcus faecalis* (zone d'inhibition : 22,3 mm ; CMI : 0,781 mg/ml) (Al-Bayati et Sulaiman, 2008).

Les tiges sont employées couramment comme brosses de dents, elles sont également utilisées pour détoxifier et renforcer les gencives affaiblies ; et on les considère comme un outil efficace et peu coûteux pour l'hygiène buccale (Al-Bagieh et *al.*, 1994).

CONCLUSION

La recherche de nouveaux principes actifs végétaux ou de nouvelles plantes est un phénomène constant au fil des siècles, car l'homme, dans sa quête de survie, s'est toujours tourné vers ce réservoir végétal naturel pour y puiser de multiples éléments nécessaires à sa survie.

Nos investigations auprès des thérapeutes traditionnels par une enquête ethnobotanique, nous ont permis de choisir trois plantes (*Atractylis humilis*, *Eryngium maritimum* et *Salvadora persica*).

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la phytochimie et les activités biologiques sur *Atractylis humilis*. Pour cela, nous avons procédé à un screening phytochimique de cette espèce végétale et d'après les résultats, nous avons opté pour l'extraction des saponines des racines dont le rendement était de l'ordre de 2,5%. L'extrait des saponines s'est avéré efficace contre les bactéries suivantes : *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* (10 mm à 2 mg/ml et 8 mm à 1,5 mg/ml). La CCM de l'extrait des saponines des racines, nous a permis de séparer 14 composés en utilisant le système BAW sur un support en cellulose. L'analyse chromatographique a permis de caractériser un constituant qui est probablement la diosgénine.

Concernant *Eryngium maritimum*, le rendement de l'extrait méthanolique des racines était très proche de celui de l'extrait acétonique. Par contre, le rendement de l'extrait butanolique était plus important ($3 \pm 0,2$ %) à celui de l'acétate éthylique ($0,3 \pm 0,02$ %). Par ailleurs, les résultats du dosage des composés phénoliques ont prouvé une teneur importante en phénols totaux et en flavonoïdes (extrait acétonique : $55,80 \pm 2,75$ mg EP/g ES et $1,505 \pm 0,013$ mg EP/g RS ; extrait méthanolique : $46,72 \pm 4,69$ mg EP/g ES et $1,138 \pm 0,016$ mg EP/g ER), respectivement.

Par ailleurs, l'activité antioxydante était très intéressante. En effet, selon les deux méthodes (FRAP et DPPH), l'extrait butanolique semble être la fraction la plus active avec une EC_{50} de l'ordre de $0,1139 \pm 0,0112$ mg/ml et $0,0104 \pm 0,0004$ mg/ml, respectivement. Ces valeurs sont très proches à ceux de l'acide ascorbique ($0,0203 \pm 0,0018$ mg/ml et $0,008 \pm 0,0001$ mg/ml, respectivement).

En outre, l'activité antibactérienne la plus remarquable a été exhibée par l'extrait d'acétate éthylique contre *Bacillus cereus* (9,66 mm à 20 mg/ml). Cet extrait était actif contre toutes les bactéries testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*. L'extrait butanolique a montré une activité inhibitrice contre toutes les bactéries testées sauf *Enterococcus faecalis*. L'extrait acétonique était actif contre toutes les bactéries sauf *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre, toutes les souches bactériennes se sont révélées sensibles à l'extrait méthanolique.

Les résultats de l'activité antifongique ont prouvé que l'extrait d'acétate éthylique a agité de façon active contre tous les mycètes particulièrement, contre *Aspergillus flavus* (10 mm à 50 mg/ml). Les extraits méthanolique, acétonique et butanolique ont eu une activité inhibitrice la plus élevée contre *Cladosporium herbarum* et *Aspergillus fumigatus*, mais aucune activité inhibitrice vis-à-vis de *Alternaria alternata* et *Aspergillus flavus* n'a été observée.

En ce qui concerne *Salvadora persica*, les rendements des différents extraits des feuilles étaient supérieurs à ceux des tiges. Les résultats des rendements en extraits ont montré que cette espèce végétale avait une teneur en alcaloïdes (tiges : $0,72 \pm 0,24$ % ; feuilles : $1 \pm 0,1$ %) légèrement plus élevée que celle en flavonoïdes (tiges : extrait butanolique ' $0,32 \pm 0,11$ %' et extrait d'acétate éthylique ' $0,2 \pm 0,03$ %' ; feuilles :

extrait butanolique '0,56 ± 0,11%' et extrait d'acétate éthylique '0,36 ± 0,16%'). Aussi, les résultats ont prouvé une teneur considérable en phénols totaux (feuilles : 67,32 ± 0,17 mg EP/g ES ; tiges : 58,63 ± 0,00 mg EP/g ES), en tannins (feuilles : 39,31 ± 3,81 mg EP/g ES ; tiges : 36,83 ± 2,76 mg EP/g ES) et en flavonoïdes (feuilles : 0,47 ± 0,00 mg ER/g ES ; 0,47 ± 0,00 mg ER/g ES). Les résultats de l'activité antioxydante ont démontré que EC₅₀ la plus élevée est obtenue avec l'extrait d'acétate éthylique des feuilles (480 ± 6 µg/ml et 11,8 ± 0,07 µg/ml) selon les deux méthodes (FRAP et DPPH), respectivement. Les résultats de l'activité antibactérienne ont prouvé que l'extrait des alcaloïdes des tiges a de bons effets inhibiteurs vis-à-vis de toutes les bactéries testées par rapport aux autres extraits. L'activité la plus forte a été marquée contre *Bacillus cereus* (17 mm à 20 mg/ml).

L'ensemble des résultats obtenus constitue une justification scientifique de l'usage traditionnel des plantes étudiées et confirme encore une fois la pertinence des remèdes traditionnels dans le traitement de nombreux maux. Mais ces résultats ne constituent qu'une ébauche dans le domaine de recherche des antioxydants et des antimicrobiens naturels, il serait intéressant de compléter ce travail par :

- ✚ L'étude des activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire) *in vitro* et *in vivo* des extraits des espèces végétales étudiées.
- ✚ La séparation et l'identification des molécules responsables de ces activités en utilisant les méthodes chromatographiques (CLHP) et spectroscopiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdel Rahman, S.M. ; Abd-Ellatif, S.A. ; Deraz, S.F. ; Khalil, A.A. (2011). Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment. *African Journal of Biotechnology*, 10(52): 10733-10743.
- Abdel-Wahab, S.M. ; Selim, M.A. ; El-Fiki, N.M. (1990). Investigation of the flavonoid content of *Salvadora persica*. *Bull. Fac. Pharm. (Cairo Univ.)*, 28 :67-70.
- Aberkane, M.C. (2006). Etude phytochimique de la plante *Pulicaria laciniata*. Thèse de doctorat d'Etat en Chimie. Faculté des Sciences, Université El Hadj Lakhdar, Batna.
- Abid, L. (2006). La pratique médicale en Algérie avant 1830 (1^{re} partie). El Watan, Alger, Algérie.
- Acha, P.N. ; Szyfres, B. (1982). Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Office International des Epizooties, Paris, France.
- Ahmed, S.S. ; El-Gengaihi, S.E.E. ; Ibrahim, M.E.S. ; Schnug, E. (2008). Preliminary phytochemical and propagation trial with *Salvadora persica* L. *Agriculture and Forestry Research*, 1/2 (58):135-138.
- Ahmed Fahmi Aissa, T. (2013). Estudio de la actividad sobre el sistema nervioso central de especies vegetales procedentes de la flora Egipcia. Memoria para optar al grado de doctor, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- Ahmim, M. (2008). Histoire des plantes médicinales. <http://biodalgerie.populus.org/card/>
- Ainamo, J. ; Etemadzadeh, H. (1987). Prevention of plaque growth with chewing gum containing chlorhexidine acetate. In: Amoian, B ; Moghadamnia, AA ; Barzi, S ; Sheykholeslami, S. ; Rangiani, A. (2010). *Salvadora persica* extract chewing gum and gingival health: improvement of gingival and probe-bleeding index. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 16(3):121-123.
- Alali, F. ; Al-Lafi, T. (2003). GC-MS analysis and bioactivity testing of the volatile oil from the leaves of the toothbrush tree *Salvadora persica* L. *Nat. Prod. Res.*, 17: 189-194.
- Al-Bagieh, N.H. ; Idowu, A. ; Salako, N.A. (1994). Effects of aqueous extract of miswak on the in vitro growth of *Candida albicans*. *Microbios*, 80:107-113.
- Al-Bagieh, N.H. ; Weinberg, E.D. (1988). Benzylisothiocyanate : A possible agent for controlling dental caries. *Microbios. Lett.*, 39:143-151.
- Al-Bayati, F.A. ; Sulaiman, K.D. (2008). In Vitro Antimicrobial Activity of *Salvadora persica* L. Extracts Against Some Isolated Oral Pathogens in Iraq. *Turk J. Biol.*, 32:57-62.
- Ali-Shtayeh, M.S. ; Yaghmour, M.R. ; Faidi, Y.R. ; Salem, K. ; Al-Nuri, M.A. (1998). Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60:265–271.

- Alkurd, A. ; Hamed, T.R. ; Al-Sayyed, H. (2008). Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 4:265 - 274.
- Al-Lafi, T. ; Ababneh, H. (1995). The effect of the extract of the Miswak (chewing sticks) used in Jordan and the Middle East on oral bacteria. Int. Dent J., 45:218-22.
- Alzoreky, N. ; Nakahara, K. (2001). Antioxidant Activity of Some Edible Yemeni Plants Evaluated by Ferrylmyoglobin/ABTS⁺ Assay. Food Sci. Technol. Res., 7 (2):141-144.
- Amin, A.H. ; Subbaiah, T.V. ; Abbasi, K.M. (1969). Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. Can. J. Microbiol., 15: 1067-1076.
- Andrew, C. (2001). Encyclopedia of medicinal plants. 2nd edition, Dorling Kindersiey limited, Londre, p 336.
- ANSES. (2011a). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments (*E. coli* entérohémorragiques (EHEC)). Agence Nationale de Sécurité Sanitaire : alimentation, environnement, travail, Paris, France.
- ANSES. (2011b). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments (*Bacillus cereus*). Agence Nationale de Sécurité Sanitaire : alimentation, environnement, travail, Paris, France.
- ANSES. (2011c). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments (*Listeria monocytogenes*). Agence Nationale de Sécurité Sanitaire : alimentation, environnement, travail, Paris, France.
- Archambaud, M. ; Clave, D. (2007). Fiche technique, Bactériologie 053/073. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique : Laboratoire de Bactériologie Hygiène, CHU Toulouse Rangueil, France.
- Arct, J. ; Pytkowska, K. (2008). Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. Clinics in Dermatology, 26:347-35.
- Arora, A. ; Kaushik, D. (2007). Free Radical Scavenging Activity of *Salvadora persica* L. Asian Journal of Chemistry, 19(6): 4638-4644.
- Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant food. Mutation Research, 523-524:9-20.
- Attrassi, K. ; Benkirane, R. ; Attarassi, B. ; Douira, A. (2008). Développement de la pourriture des pommes en conservation en présence de sels de calcium. Cahiers Agricultures, 17(5):465-472.

B

- Babayi, H. ; Kolo, I. ; Okogum, J.I. (2004). The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. Biokemistri, 16(2):102-5.

- Bader, G. ; Seibold, M. ; Tintelnot, K. ; Hiller K. (2000). Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 2: Relationships between the structures of glycosides of polygalacic acid and their activities against pathogenic *Candida* species. *Pharmazie*, 55:72-74.
- Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse (cotutelle) pour l'obtention du grade de docteur d'université, mention : chimie organique), collaboration inter-universitaire entre Université de Bamaco et Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, Bamaco, Mali.
- Basile, A. ; Giordano, S. ; Lopez Saez, J.A. ; Cobianchi, B.C. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoïds isolated from mosses. *Phytochem.*, 2 (8):1419-82.
- Batawita, K. ; Kokon, K. ; Akpagona, K. ; Koumaglo, K. ; Bouchet, P. (2002). Fungicide activity of a threatened species from togo flora: *Conyza aegyptiaca* (L.) Ait. var. *lineariloba* (DC.) O. Hoffm. (Asteraceae). *Acta Bot. Gal.*, 149(1):41-8.
- Bathori, H. ; Kalasz, G. ; Janicsak, Z. ; Pongracz, J. ; Vamos, J. (2003). Thin-layer chromatography of phytoecdysteroids. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 26(16): 2629-2649.
- Bekhechi, C. ; Bekkara Atik, F. ; Consiglio, D. ; Bighelli, A. ; Tomi, F. (2012). Chemical Variability of the Essential Oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chemistry and Biodiversity*, (9): 2743-2753.
- Bekkara Atik, F. (1999). Etude des signaux chimiques impliqués dans la symbiose entre *Vicia faba* et *Rhizobium leguminosarum*. Thèse de Doctorat d'état Es-Science, Biologie Végétale, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie.
- Bekkara Atik, F. ; Benhammou, N. ; Panovska, K.T. (2008). Biological activities of the essential oil and ethanolic extract of *Inula viscosa* from the Tlemcen region of Algeria. *Advances in Food Science*, 30: 132-139.
- Bellakhdar, J. (1978). Médecine traditionnelle et toxicologie ouest -saharienne, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Edition technique Nord-africaine, Rabat, Maroc, p 357.
- Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Edit. Ibis Press, Saint -Etienne, France, p 764.
- Beloued, A. (2009). Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires, 5^{ième} édition, Alger, Algérie, p 284.
- Benchâbane, A. ; Abbad, A. (1997). Les plantes médicinales commercialisées à Marrakech. Ed. Info., Marrakech, Maroc, p 74.
- Bendimerad, N. ; Taleb Bendiab, S.A. ; Breme, K. ; Fernandez, X. (2007). Essential oil composition of aerial parts of *Sinapis arvensis* L. from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 19:206-208.
- Benkhigne, O. ; Zidane, L. ; Fadli, M. ; Elyacoubi, H. ; Rochdi, A. ; Douira, A. (2011). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.*, 53: 191-216.

- Benzeggouta, N. (2015). Evaluation des effets biologiques des extraits aqueux de plantes médicinales seules et combinées. Thèse de doctorat en science, option : Pharmaco-Chimie. Faculté des sciences exactes, département de chimie, Université Mentouri. Constantine.
- Benzie, I.F.F. (1996). An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin. Biochem.*, 29:111-116.
- Benzie, I.F.F. ; Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxydant Power": The FRAP Assay. *Anal. Biochem.*, 239:70- 76.
- Berche, P. ; Gaillard, J.L. ; Simonet, M. (1989). Bactériologie: bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences Flammarion, p 660.
- Berghe, V.A. ; Vlietinck, A.J. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Mbosso, E.J.T. ; Ngouelaa, S. ; Nguediac, J.C.A. ; Bengc, V.P. ; Rohmer, M. ; Tsamo, E. (2010). In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, 128:476-481.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181:1199-1200.
- Bors, W. ; Heller, W. ; Michel, C. ; Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants : determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.*, 186:343-355.
- Bouaziz, M. ; Dhouib, A. ; Loukil, S. ; Boukhris, M. ; Sayadi, S. (2009). Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 8(24):7017-7027.
- Bouazza, M. ; Mahboubi, A. ; Loisel, R. ; Benabadji, N. (2001). Bilan de la flore de la région de Tlemcen (Oranie – Algérie). *Forêt Méditerranéenne*, 22(2):130-136.
- Boukhalfa, D. (2003). Conservation and sustainable use of globally significant biodiversity in the Tassili and Ahaggar National Parks. Government of Algeria, United Nations Development Programme, Alger, Algérie.
- Boulekbache, L. (2005). Profil CG-SM des polyphénols d'une plante medicinale: *Eucalyptus globulus*. Thèse de Magister, Université de Bejaïa, Algérie.
- Bouزيد, N. (2002). Fungal disease development and means of control Main fungal diseases of food legumes in Tunisia. Collection M, Sciences de l'ingénieur, 22-30.
- Brand-Williams, W. ; Cuvelier, H.E. ; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.*, 82:25-30.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales, 3^{ème} Edition, Tec et Doc, Paris, France, p 1120.
- Bruneton, J. (2001). Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 2^{ème} Edition, Tec et Doc, Paris, France, p 527.
- Brzozowska, J. ; Hanower, P. (1976). Recherches sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. *Annales de l'université d'Abijan, série C (Science)*, tome XII, Abijan, Côte d'Ivoire, pp 65-80.

C

- Cakir, A. ; Mavi, A. ; Yıldırım, A. ; Duru, M.E. ; Harmandar, M. ; Kazaz, C. (2003). Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology*, 87:73-83.
- Calmes, M. ; Crespin, F. ; Maillard, C. ; Ollivier, E. ; Balansard, G. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of atractyloside and carboxya-tractyloside from *Atractylis gummifera* L. In: Chabani, S. ; Haba, H. ; Lavaud, C. ; Benkhaled, M ; Harakat, D. (2013). Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*. *Phytochemistry Letters*, 6:9-13.
- Calvino, C. ; Martinez, S.G. ; Downie S.R. (2008). The evolutionary history of Eryngium (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46:1129-1150.
- Caravaca Magarinos, F. ; Cubero Gomez, J.J. ; Arrobas Vaca, M. ; Pizarro Montero, J.L. ; Pimentel Leo, J.J. ; Fernandez Alonso, J. ; Sanchez Casado, E. (1985). Afectacion renal y hepatica en la intoxicacion por *Atractylis gummifera*. *Nefrologia*, 5:205-210.
- Cavin, A. (1999). Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa* (Menispermaceae) *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae). Thèse de Doctorat, Faculté des sciences, Université de Lausanne, Suisse.
- Chabani, S. ; Haba, H. ; Lavaud, C. ; Benkhaled, M. ; Harakat, D. (2013). Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*. *Phytochemistry Letters*, 6:9-13.
- Chabasse, D. ; Bouchara, J.P. ; De Gentile, L. ; Brun, S. ; Cimon, B. ; Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n°25 de Biologie médicale, Bioforma, France.
- Chaboud, A. ; Dellamonica, G. ; Raynaud, J. (1988). Neocorymboside, a di-C-glycosyl-flavone from *Atractylis gummifera*. In: Chabani, S. ; Haba, H. ; Lavaud, C. ; Benkhaled, M. ; Harakat, D. (2013). Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*. *Phytochemistry Letters*, 6:9-13.
- Charnot, A. (1945). La toxicologie au Maroc. In: Lahsissene, H. ; Kahouadji, A. ; Tijane, M. ; Hseini, S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia*, Revue de Botanique Publié avec l'aide financière du Ministère de la Communauté française (Direction générale de l'Enseignement non obligatoire et de la Recherche scientifique) n°186, Liège, Belgique.
- Chatterjee, A. (2004). Inhibition of *Helicobacter pylori* *in vitro* by various berry extracts with enhanced susceptibility of calarithromycine. *Mol. Cell. Biochem.*, 265(2):19-26.
- Chen, Y.T. ; Zheng, R.L. ; Jia, Z.J. ; Ju, Y. (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Bio. Med.*, 9:19-21.

- Chkarnat, C. (2013). Plantes médicinales et vénéneuses. Cours BL0034 et BL0024, Université de Fribourg, Suisse.
- Chomnawang, M.T. ; Surassmo, S. ; Wongsariya, K. ; Bunyaphatsara, N. (2009). Antibacterial activity of Thai medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, 80:102-104.
- Chuang, H. (1981). Salvadoraceae. Fang Wen-pei, ed., *Fl. Reipubl. Popularis Sin.*, 46:14-16.
- Cushnie, T.P. ; Hamilthoh, V.E.S. ; Lamb, A.J. (2003). Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoïds and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.*, 158(4):281-9.

D

- Dadi, P.K. ; Ahmad, M. ; Ahmad, Z. (2009). Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.*, 45(1):72-9.
- Damerdji, A. (2012). La faune malacologique sur différentes plantes médicinales dans la région de Tlemcen (Algérie nord-occidentale). *Afrique Science* 08(1):79-87.
- Dao, H.P. (2005). Caractérisation de certains gènes polycétones synthases chez *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 producteur d'ochratoxine a et d'acide pénicillique. Thèse Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, Spécialité : Microbiologie, France.
- Darmani, H. ; Al-Hiyasat, A.S. ; Elbetieha, A.M. ; Alkofahi, A. (2003). The effect of an extract of *Salvadora persica* (Meswak, chewing stick) on fertility of male and female mice. *Phytomedicine*, 10:62-65.
- Defraigne, J.O. ; Pincemail, J. (2007). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev. Med. Liège*, 62:4-1.
- De Gaulejac, S.C. ; Provost, N. ; Vivas, N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:425-431.
- Delamare, G. (1992). Dictionnaire des termes de médecine. Editions Maloine, Paris, p 474.
- Devaure, N. (2011). **Parmentier de canard aux navets et aux panais**. *Agence Fleurie*, Bordeaux, France.
- Dewick, P.M. (2002). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2nd ed. Wiley, New York, p 520.
- Didrak, M. (1999). Antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa bark, Gallnut powders, *Salvia* sp. and *Phlomis* sp.). *J. Biol.*, 23:241-8.
- Djahra, A.B. (2014). Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *marrubium vulgare L.* thèse de doctorat en science, option : Biologie végétale. Département de biologie, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar. Annaba.
- Dupont, F. ; Guignard, J.L. (2007). Botanique systématique moléculaire. Elsevier-Masson, [Abrèges de Pharmacie](#), 14^{ème} édition, p 248.

Djeridane, A. ; Yousfi, M. ; Nadjemi, B. ; Boutassouna, D. ; Stocker, P. ; Vidal, N. (2006). Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97:654-660.

E

Eder, B. ; Walmir, S.G. ; Lidilhone, H. ; Caroline, T. ; Fernanda, R.G. (2008). Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of *Combretum laxum*. *Molecules*, 13:2717-2728.

Ekoumou, C. (2003). Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, Bamako, Mali.

El kalamouni, C. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse Délivré par l'Institut National Polytechnique de Toulouse, spécialité : Sciences des Agroressources, France.

El-Mostehy, M.R. ; Al-Jassem, A.A. ; Al-Yassin, I.A. (1983). Miswak as an oral health device. Preliminary chemical and clinical evaluation, *Hamdard*, 26:41-50.

EL Rhaffari, L. (2008). Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisanes. Faculté des Sciences Techniques d'Errachidia, Maroc.

El-Sadhan, R. ; Almaz, K. (1999). Miswak (chewing stick): a cultural and scientific heritage. *The Saudi Dental Journal*, 11(2):80-87.

ElSohly, H.N. ; Danner, S. ; Li, X.C. ; Nimrod, A.C. ; Clark, A.M. (1999). New antimycobacterial saponin from *Colubrina retusa*. In: Sparg, SG ; Light, ME ; Van Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94:219-243.

Epifano, F. ; Genovese, S. ; Menghini, L. ; Curini, M. (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68:939-953.

Erdelmeier, C.A.J. ; Sticher, O. (1986). A cyclohexenone and a cyclohexadienone glycoside from *Eryngium campestre*. *Phytochemistry*, 25:741-743.

Ezmirly, S.T. ; El-Nasr, M.S. (1981). Isolation of gluco-tropaeolin from *Salvadora persica*. *J. Chem. Soc. Pak.*, 3:9-12.

F

Farooqi, M.I.H. ; Srivastava, J.G. (1968). The toothbrush tree (*Salvadora persica*). *Quart. J. Crude Drug Res.*, 8:1297-99.

Favier, A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108-115.

Fleuriet, A. ; Jay-Allemand, C. ; Macheix, J.J. (2005). Composés phénoliques des végétaux, un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, Suisse, pp 121-216.

Flora of Pakistan. (2013). www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id

FNPSDR. (2012). Forum sur la Médecine Arabe dans l'Algérie médiévale. Fondation Nationale pour la Promotion de la Santé et le Développement de la Recherche. Centre Culturel d'Hussein Dey, Alger, Algérie.

Font Quer, P. (1979). Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado. Editorial Labor S. A. Madrid, Espagne, pp 478-481.

Frankel, E.N. ; Waterhaouse, A.L. ; Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. The Lancet, 341:1103-1104.

G

Georgiou, M. ; Siandon, L. ; Hatziz, T. ; Papadatos, J. ; Kouselini, S.A. (1988). Hepatotoxicity due to *Atractylis gummifera* L. Clinical Toxicology, 26:487-493.

Gerschman, R. ; Gilbert, D. ; Nye, S.W. ; Dwyer, P. ; Fenn, W.O. (1954). Oxygen poisoning and Xirradiation: A mechanism in common. Science, 119:623-626.

Gibbons, S. (2008). Phytochemicals for bacterial resistance: strengths, weaknesses and opportunities. Planta Med., 74:594-602.

Glensk, M. ; Bialy, Z. ; Jurzysta, M. ; Cisowski, W. (2001). Two-Dimensional TLC with a Sorbent gradient for the Analysis of Alfalfa Root Saponins. Chromatographia, 54: 669-672.

Goetz, G. ; Fkyerat, A. ; Métais, N. ; Kunz, M. ; Tabacchi, R. ; Pezet, R. ; Pont, V. (1999). Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. Phytochemistry, 52:759-67.

Gruenwald, J. ; Brendler, T. ; Jaenicke, C. (2000). PDR for Herbal Medicines. 2nd ed. Medical Economics Company, New Jersey, pp 729-733.

Guignard, J.L. (1996). Abrégé de biochimie végétale. Ed. Masson, Paris, France, p 160.

Guinoiseau, E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat, Université de Corse, France, Spécialité: Biochimie – Biologie moléculaire.

H

Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am. J. Med., 91(3):14-22.

- Halimi, A. (1997). Les plantes médicinales. Le ministère de l'agriculture et la pêche de l'Algérie (agence nationale de la conservation de la nature « ANA » et union internationale de la conservation de la nature « IUCN »), Alger, Algérie.
- Hammiche, V. ; Maiza, K. (2006). Traditional medicine in central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*, 105:358-367.
- Hamza, T. (1993). Introduction à la biologie moderne. Berti Editions, Alger, Algérie.
- Harborne, J.B. (1973). *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall Ltd., London, pp 49-188.
- Harborne, J.B. (1998). *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman and Hall, 3^{ième} édition, Londre, Angletterre, p 302.
- Harfi, H.A. ; Lundberg, M. (1997). Meswak. A novel allergen. *Allergy*, 52:474-479.
- Harman, D. (1956). Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Geront*, 11:298-300.
- Hatzidimitriou, E.f. ; Nenadis, N. ; Tsimidou, M.Z. (2007). Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*, 105:1504-1511.
- Heard, O. (1994). Contribution à l'étude du *Desmodium Adscendens*: chimie et pharmacologie. Thèse en pharmacie, Université de Tours, France.
- Heim, E.K. ; Tagliaferro, A.R. ; Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584.
- Hendel, N. ; Larous, L. ; Sari, M. ; Boudjelal, A. ; Sarri, D. (2012). Place of labiates in folk medicine of the area of M'sila (Algeria). *GJRMI*, 1(8):315-322.
- Hendrich, A.B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica*, 27: 27-40.
- Heng, L. ; Vincken, J.P. ; van Koningsveld, G.A. ; Legger, L. ; Gruppen, H. ; van Boekel, M.A.J.S. ; Roozen, J.P. ; Voragen, A.G.J. (2006). Bitterness of saponins and their content in dry peas. *J. Sci. Food Agric.*, 86:1225-1231.
- Heywood, V.H. (1971). *The Biology and Chemistry of the Umbelliferae*. Academic Press, London.
- Hiller, K. ; Von Mach, B. ; Franke, P. (1976). Saponins of *Eryngium maritimum* L. 25. Contents of various Saniculoideae. *Pharmazie*, 31(1):53.
- Hmammouchi, M. (1999). Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. Utilisations, biologie, écologie, chimie, pharmacologie, toxicologie-Imprimerie de Fédala, Mohammedia (Maroc), p 389.
- Hostettman, K. ; Marston, A. (1995). Saponins. Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge University Press, Cambridge, p 564.
- Hua, S. ; Wei, S.F. ; Wang, W.Z. ; Chum, H. (2006). Structure-activity relationships of oleanane and ursane type triterpenoids. *Botanical Studies*, 47:339-368.
- Hua, L. ; Xiaoyu, W. ; Peihong, L. ; Yong, L. ; Hua, W. (2008). Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(6):67-73.

- Huang, D. ; Ou, B. ; Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1841-1856.
- Hymete, A. ; Iversen, T.H. ; Rohloff, J. ; Erko, B. (2005). Screening of *Echinops ellenbeckii* and *Echinops longisetus* for biological activities and chemical constituents *Phytomedicine*, 12:675-679.

I

- Inuma, M. ; Ito, T. ; Miyake, R. ; Tosa, H. ; Tanaka, T. ; Chelladurai, V. (1998). A xanthone from *Garcinia cambodgiae*. *Phytochemistry*, 47:1169-1170.
- Iwueke, A.V. ; Nwodo, O.F.C. (2008). Antihyperglycemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. *Biokemistri*, 20:63-70.

J

- Jang, M. ; Cai, I. ; Udeani, G.O. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275:218-20.
- Jarlie, V. ; Carbonne, A. ; Astagneau, P. ; Coignard ; B. (2004). Cas groupés d'infections à *Klebsiella pneumoniae* résistante à toutes les bêta-lactamines y compris à l'imipénème en région parisienne. Note d'information technique InVS/RAISIN aux responsables des C.CLIN et coordinateurs des réseaux BMR, Bordeaux, France.
- Jasso, R.D. ; Hernandez, C.D. ; Angulo, S.J.L. ; Rodriguez, G.R. ; Villarreal, Q.J.A. ; Lira, S.R.H. (2007). Antifungal activity in Vitro of *Flourensia* Spp. extracts on *Alternaria* Sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products*, 25:111-116.
- Jayvir, A. ; Mino, P. ; Gauri, B. ; Ripal, K. (2002). A glossary of selected indigenous medicinal plants of India. SRISTI Innovations, Second Edition, Bombay, Inde, p 49.
- Jiri, P. (2003). Biologically active pentacyclic triterpene and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*, 1:7-12.
- Jones, J.D.G. ; Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444:323-329.
- Joo, C.N. ; Cho, Y.D. ; Kwon, H.Y. (1978). Huuguk Saenghwa Hakhoechi. In: Shashi, B.M. ; Sudip, K.S. ; Gurudas, P. (1988). Triterpenoid Saponins. *Phytochemistry*, 27(10):3037-3067.

K

- Kahouadji, M.S. (1995). Contribution à une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc oriental. Thèse de troisième cycle. Université Mohammed I, faculté des sciences, Oujda, Maroc.

- Karmakar I, Dolai N, Saha P, Sarkar N, Bala A , Kanti P. (2011). Scavenging activity of *Curcuma caesia* rhizome against reactive oxygen and nitrogen species. *Orient Pharmacology Experimental medicine* 11:221–228.
- Karumi, Y. ; Onyeyili, P.A. ; Ougbuaja, V.O. (2004). Identification of Actives Principles of *M. balsamina* (Balsam apple) Leaf Extract. *Journal of Medical Sciences*, 4:179-182.
- Kaur, C. ; Kapoor, H.C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. In :Waterhouse, A.L. 2002. Unit I1.1: Polyphenolics: Determination of Total Phenolics, p. 1–4. In: R.E. Wrolstad (ed.). *Current protocols in food analytical chemistry*. John Wiley & Sons, New York.
- Kazumasa, S. ; Mie, O ; Akira, I. ; Shinjiro, N. ; Norimoto, U. ; Mikito, A. (2001). Structure-Activity Relationships of Triterpenoid Derivatives Extracted From *Gymnema inodorum* Leaves on Glucose Absorption. *Jpn. J. Pharmacol*, 86:223-229.
- Khiati, M. (1998). *Guide des maladies infectieuses et parasitaires*. OPU, Alger, Algérie.
- Killeen, G.F. ; Madigan, C.A. ; Connolly, C.R. ; Walsh, G.A. ; Clark, C. ; Hynes, M.J. ; Timmins, B.F. ; James, P. ; Headon, D.R. ; Power, R.F. (1998). Antimicrobial saponins of *Yucca schidigera* and the implications of their *in vitro* properties for their *in vivo* impact. In: Sparg, S.G. ; Light, M.E. ; Van Staden J. (2004). *Biological activities and distribution of plant saponins*. *Journal of Ethnopharmacology*, 94:219-243.
- Kitagawa, I. (2002). Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine. *Pure Appl. Chem.*, 74:1189-1198.
- Koné, D. (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes - extraction, identification d'alcaloïdes caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat en cotutelle avec l'Université Paul Verlaine De Metz (France), soutenue à la Faculté des Sciences et Techniques de Bamako (Mali), Spécialité : chimie organique.
- Krogh, P. (1987). Ochratoxin A in food. *Mycotoxin in Food*. Academic Press., San Diego, 97-121.
- Ksouri, R. ; Falleh, H. ; Megdiche, W. ; Trabelsi, N. ; Mhamdi, B. ; Chaib, K. ; Bakrouf, A. ; Magné, C. ; Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47:2083-2091.
- Kubeczka, K.H. ; Ayoulo, N. ; Grande, M. ; Torres, P. (1998). Composition of the essential oils from different parts of *Eryngium maritimum* L. (Apiaceae). Poster at the 29th International Symposium on Essential Oils. Frankfurt, Germany.
- Kumaran, A. ; Karunakaran, J.R. (2007). Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 100: 356-361.
- Kupeli, E. ; Kartal, M. ; Aslan, S. ; Yesilada, E. (2006). Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 107:32-37.
- Kuster, R.M. ; Arnold, N. ; Wessjohann, L. (2009). Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 37(1):63-5.

L

- Lagnika, L. (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes Béninoises. Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg en cotutelle avec l'Université d'Abomey-Calavi Benin, Spécialité : Sciences Pharmaceutiques, Domaine : Pharmacognosie.
- Lahsissene, H. ; Kahouadji, A. ; Tijane, M. ; Hseini, S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia*, Revue de Botanique Publié avec l'aide financière du Ministère de la Communauté française (Direction générale de l'Enseignement non obligatoire et de la Recherche scientifique) n°186, Liège, Belgique.
- Lamnauer, D. (2005). A guide to medicinal plants in North Africa. Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources (IUCN), p 256.
- Larabi, I.A. ; Azzouz, M. ; Abtroun, R. ; Reggabi, M. ; Alamir, B. (2012). Determinations of levels of atractyloside in the roots of *Atractylis gummifera* L. collected from six different areas of Algeria. *Ann. Toxicol. Anal.*, 24(2):81-86.
- Laroche, P. (2005). Le Mangoustan, un fruit santé aux effets surprenants. Les Éditions Jalinis Montréal, Québec, p 47.
- Larrey, D. ; Pageaux, G.P. (1995). Hepatotoxicity of herbal remedies and mushrooms. *Seminars in Liver Disease*, 15:183-188.
- Leclerc, H. ; Gaillard, J.L. ; Simonet, M. (1995a). Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris, p 585.
- Leclerc, H. ; Meyer, A. ; Deiana, J. (1995b). Cours de microbiologie générale, Nouveau programme. Biosciences et Techniques, Doin Editeurs, p 365.
- Lee, K.Y. ; Weintraub, S.T. ; Yu, B.P. (2000). Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(2):261-265.
- Lefranc, E. (1866). Etude botanique, chimique et toxicologique sur l'*Atractylis gummifera*. Librairie Germer-Baillière, Paris, France, p 252.
- Lehucher-Michel, M.P. ; Lesgards, J.F. ; Delubac, O. ; Stocker, P. ; Durand, P. ; Prost, M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*, 30:1076-1081.
- Leitao, D.P. ; Polizello, A.C. ; Ito, I.Y. ; Spadaro, A.C. (2005). Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J. Med. Food.*, 8(1): 6-40.
- Leporatti, M.L. ; Ivancheva, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 87:123-142.
- Lewis, W.H. ; Elvin-Lewis, M.P.F. (1977). Oral Hygiene, Medical Botany. John Wiley and Sons, New York, pp 226-270.
- Lewis, K. ; Ausubel, F.M. (2006). Prospects for plant derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.*, 24:1504-1507.

- Liao, C.H. ; Lai, C.C. ; Hsu, M.S. ; Chu, F.Y. ; Wu, M.Y. ; Huang, Y.T. ; Hsueh, P.R. (2010). Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 35(5):457-60.
- Lippert, W. ; Podlech, D. (2010). Les plantes de Méditerranée. Nathan, Gros Plan, p 254.
- Lisciani, R. ; Fattorusso, E. ; Surrano, V. ; Cozzolino, S. ; Giannattasio, M. ; Sorrentino, L. (1984). Anti-inflammatory activity of *Eryngium maritimum* L. rhizome extracts in intact rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 12:263-270.
- Liu, T.Z. ; Chin, N. ; Kiser, M.D. ; Bigler, W.N. (1982). Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbate oxidase. *Clin. Chem.*, 28:2225-2228.
- Lupoli, R. (1994). Les punaises des ombellifères de France. *Biologie des espèces, Insectes Paris, France*, 93(2):8-10.

M

- Ma' Ayergi, H.A. ; Ismail, S.I. ; Batanouny, K.H. ; Rizk, A.M. (1984). Ecological and phytochemical studies on the Miswak, *Salvadora persica* L. *Qatar Univ. Sci. Bull.*, 4:37-44.
- Madigan, M.T. ; Martinko, J.M. ; Parker, J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International Editions, p 986.
- Makkar, H.P.S. ; Blummel, M. ; Borowy, N.K. ; Becker, K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.*, 61:161-165.
- Makkar, H.P.S. ; Siddhuraju, P. ; Becker, K. (2007). *Plant Secondary Metabolites*. Methods in Molecular Biology, Humana Press Inc., Totowa, NJ (USA), p 393.
- Males, Z. ; Medic-Saric, M. (2001). Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. & Kit. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(3):353-359.
- Malik, S. ; Ahmad, S.S. ; Haidar, S.I. ; Muzaffar, A. (1987). Salvadoricine, A new alkaloid from the leaves of *Salvadora persica*. *Tetrahedron Lett.*, 28:163-164.
- Mamyrbékova-Békro, J.A. ; Konan, K.M. ; Békro, Y.A. ; Djié, Bi M.G. ; Zomi, Bi T.J. ; Mambo, V. ; Boua Boua, B. (2008). Phytocompounds of the Extracts of Four Medicinal Plants of Côte d'Ivoire and Assessment of their Potential Antioxidant by Thin Layer Chromatography. *European Journal of Scientific Research*, 24:219-228.

- Nanjo, F. ; Goto, K. ; Seto, R. ; Suzuki, M. ; Sakai, M. ; Hara, Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic. Biol. Md.*, 21(6):895-902.
- Norman, R.F. ; Audrey, S.B. ; Geoffrey, A. ; Cordell Frank, A.C. ; Harry, H.S. (1975). Potential value of plants as sources of new antifertility agent. *Ind. J. Pharm. Sci.*, 64:542-46.

O

- Obame Engonga, L.C. (2009). Etude Phytochimique, Activités antimicrobiennes et antioxydantes de quelques plantes aromatiques et médicinales Africaines. Thèse de doctorat unique en Sciences Biologiques Appliquées, Spécialité : Biochimie-Microbiologie (Substances a Activités Antimicrobienne Antioxydante). Unité de Formation et de Recherche Sciences de la vie et de la terre. Université d'Ouagadougou. Burkina Faso.
- OFEFP. (2004). Classification des organismes Champignons. L'Office fédérale de l'environnement, des forêts et du paysage OFEFP, Berne.
- OIE. (2008). Manuel terrestre de l'OIE. Chapitre 1. 1. 6 ., Méthodes de laboratoire utilisées pour les essais d'antibiorésistance. www.oie.int.
- Okigbo, R.N. ; Mbajinka, C.S. ; Njoku, C.O. (2005). Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopiya aethopica* and *Occinum gratissimum* L. some pathogenous of man. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.*, 1(4):392-7.
- Olabiya, T.I. ; Oyedunmade, E.E.A. ; Ibikunle, G.J. ; Ojo, O.A. ; Adesina, G.O. ; Adelasoye, K.A. ; Ogunniran, T.A. (2008). Chemical composition and Bio-Nematicidal Potential of Some Weed Extract on *Meloidogyne incognita* under Laboratory Conditions. *Plant Sciences Research* 1(2):30-35.
- Oleszek, W.A. (2002). Chromatographic determination of plant saponins. *J. Chromatogr. A.*, 967:147-162.
- Oleszek, W. ; Bialy, Z. (2006). Chromatographic determination of plant saponins- An update (2002-2005). *Journal of Chromatography A*, 1112:78-91.
- Oloyede, O.I. (2005). Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(6):379-381.
- Ortuno, A. ; Baidez, A. ; Gomez, P. ; Arcas, M.C. ; Porras, I. ; Garcia-Lidon, A. ; Del Rio, J.A. (2006). *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem.*, 98(2):351-358.
- Osato, M. (2009). Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17(1):39-44.
- Osbourn, A.E. ; Lanzotti, V. (2009). Plant-derived, Natural Products : Synthesis, Function, and Application. Springer, p 612.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of the browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44:307-315.
- Ozenda, P. (1991). Flore et végétation du Sahara, 3ème édition. CNRS, Paris, France, p 662.

P

- Pascual-Villalobos, M.J. ; Robledo, A. (1998). Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. *Industrial Crops and Products*, 8:183-194.
- Pearson, D.A. ; Tan, C.H. ; German, J.B. ; Davis, P.A. ; Gershwin, M.E. (1999). Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. In: Waterhouse, A.L. 2002. Unit I1.1: Polyphenolics: Determination of Total Phenolics, p. 1–4. In: R.E. Wrolstad (ed.). *Current protocols in food analytical chemistry*. John Wiley & Sons, New York.
- Perret, C. (2001). Analyse de tannins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers. Thèse de doctorat ès Sciences, Faculté des Sciences, Université de Neuchâtel, Suisse.
- Petignat, C. ; Blanc, D. ; Bally, F. (2006). Microbiologie pathogénèse de l'infection. Cours élaboré pour formation en stérilisation, Lausanne, Suisse.
- Peyrou, M. (2001). Antibiorésistance des souches bactériennes d'origine équine : étude bibliographique et exemple de l'hôpital vétérinaire de St-Hyacinthe. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63:1035-1042.
- Pincemail, J. ; Defraigne, J.O. ; Franssen, C. (1990). Evidence of *in vivo* free radical generation by spin trapping with alpha-phenyl N-tert-butyl nitron during ischemia/reperfusion in rabbit kidneys. *Free Radic. Res. Commun*, 9:181-186.
- Pincemail, J. ; Bonjean, K. ; Cayeux, K. ; Defraigne, J.O. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16:233-239.
- Popovici, C. ; Saykova, I. ; Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4:25-39.
- Potterat, O. (1997). Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Curr. Organic. Chem.*, 1:415-440.
- Pourmazâheri, A. (2012). De certaines variétés de plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle Iranienne. *La revue de Téhéran (mensuel culturel iranien en langue française)*, N°77, Téhéran, Iran.
- Punyasiri, P.A. ; Abeysinghe, S.B. ; Kumar, V. (2005). Performed and induced chemical resistance of tea leaf against *Exobasidium vexans* infections. *J. Chem. Agri.*, 31(6): 1315-1324.

Q

- Quézel, P. ; Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, tome 2, Paris 7', France, p 1170.

R

Rabbani, G.H. ; Butler, T. ; Knight, J. ; Sanyal, S.C. ; Alam, K. (1987). Randomized controlled trial of berberine sulfate therapy for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. The Journal of Infectious Diseases, 155(5):979-84.

[Ravindra, G.](#) ; [Ranganayaki, R.S.](#) ; [Raghothama, S.](#) ; [Srinivasan, M.C.](#) ; [Gilardi, R.D.](#) ; [Karle, I.L.](#) ; [Balaram, P.](#) (2004). Two novel hexadepsipeptides with several modified amino acid residues isolated from the fungus *Isaria*. Chem. Biodivers., 1(3):489-504.

Ray, A.B. ; Lai, C. ; Dutta, S.C. (1975). Salvadorene: a new urea derivative from *Salvadora persica* L. Chemistry and Industry, 12:517-518.

Ribéreau-Gayon, J. ; Peynaud, E. (1986). Les composés phénoliques des végétaux. Traité d'œnologie, Paris : Édition Dunod, p 254.

Rizk, A.M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterapia, 52(2):35-42.

S

Sadler, N.P. ; Jacobs, H. (1995). Application of the folin-ciocalteau reagent to the determination of salbutamol in pharmaceutical preparations. In: Waterhouse, A.L. 2002. Unit II.1: Polyphenolics: Determination of Total Phenolics, p. 1–4. In: R.E. Wrolstad (ed.). Current protocols in food analytical chemistry. John Wiley & Sons, New York.

Salah, N. ; Miller, N.J. ; Paganga, G. ; Tijburg, L. ; Bolwell, G.P. ; Rice-Evans, C.A. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Archives of Biochemistry and Biophysics, 322:339-346.

Sanchez-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(2):270-276.

Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Science and Technology International, 8(3):121-137.

Sarr, F.B. ; Sarr, M. ; Diops, D. ; Kane, M.O. ; Ba, A. ; Sarr, B. ; Guèye, L. ; Diallo, A.S. ; Samb, A. ; Andriantsitohaina, R. ; Cissé, F. (2010). *In vitro* modulation of tracheal smooth muscle reactivity by extracts of some Senegalese medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research, 4(1):013-018.

Scherer, R. ; Godoy, H.T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food Chemistry, 112:654-658.

Shan, S. ; Tanaka, H. ; Shoyama, Y. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and an eastern blotting technique for glucuronides of glycyrrhetic acid. Anal. Chem., 73:5784.

Singleton, V.L. ; Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. In: Waterhouse, A.L. 2002. Unit II.1: Polyphenolics: Determination of Total Phenolics, p. 1–4. In: R.E. Wrolstad (ed.). Current protocols in food analytical chemistry. John Wiley & Sons, New York.

- Singleton, V.L. ; Timberlake, C.F. ; Lea, A.G.H. (1978). The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *Journal of Sciences and Food Agriculture*, 29:403-10.
- Sivakumaran, S. ; Molan, A.L. ; Meagher, L.P. ; Kolb, B. (2004). Variation in antimicrobial action of pranthocyanmidine from *Dorycrium rectum* against rumen bacteria. *Phys. Chem.*, 5(3):106-111.
- Smaoui, S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, institut national polytechnique de Toulouse, spécialité : Génie de Procédés et Environnement, France.
- Smith, A.J. ; Moran, J. ; Dangler, L.V. ; Leight, R.S. ; Addy, M. (1996). The efficacy of an antigingivitis chewing gum. In: Amoian, B. ; Moghadamnia, A.A. ; Barzi, S. ; Sheykholeslami, S. ; Rangiani, A. (2010). *Salvadora persica* extract chewing gum and gingival health: improvement of gingival and probe-bleeding index. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 16(3):121-123.
- Soetan, K.O. ; Oyekunle, M.A. ; Aiyelaagbe, O.O. ; Fafunso, M.A. (2006). Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum Bicolor* L. Moench. *African. Journal of Biotechnology*, 5(23):2405-2407.
- Sofowara, A. (2010). Plante médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Nouvelle édition Karthala, Académie Suisse des sciences naturelles, Berne, Suisse.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*, 327:649-662.
- Souri, A. ; Amin, G. ; Farsam, H. ; Jalalizadeh, H. ; Barezi, S. (2008). Screening of thirteen Medicinal Plant Extracts for Antioxidant Activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(2):149-154.
- Spichiger, R.E. ; Savolainen, V.V. ; Figeat, M. ; Jeanmonod, D. (2004). Botanique Systématique des plantes à fleurs. 3ème édition, Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romandes. *Collect. Biologie*, p 413.
- Stalikas, C.D. (2007). Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30:3268-3295.
- Stanier, R.Y. ; Doudoroff, M. ; Adelberg, E.D.A. (1966). Microbiologie Générale. Masson et Cie Editeurs. Collection Précis de Sciences Biologiques sous la direction de P.P. Grassé, Paris, France, p 638.
- Stanisl, E. ; Vignais, P.M. (1964). Sur les principes toxiques d'*Atractylis gummifera* L. *Comptes rendus de l'Academie des Sciences*, Paris, France, 259:4872-4875.
- Statistique mondial (2014). Superficie des pays en Km². statistiques-mondiales.com.

T

- Tabart, J. ; Kevers, C. ; Pincemail, J. ; Defraigne, J. ; Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113:1226-1233.
- Tackholm, V. (1974). Students' Flora of Egypt. In: Khalil A.T. (2006). Benzylamides from *Salvadora persica*. *Arch. Pharm. Res.*, 29(11):952-956.

- Tava, A. ; Mella, M. ; Bialy, Z. ; Jurzysta, M. (2003). Stability of saponins in alcoholic solutions: ester formation as artifacts. *J. Agric. Food Chem.*, 51:1797-1800.
- Tegos, G. ; Stermitz, F.R. ; Lomovskaya, O. ; Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 (10):3133-3141.
- Tereschuck, M.L. ; Riera, M.V.Q. ; Castro, G.R. ; Abdala, L.R. (1997). Antimicrobial activity of Flavonoid from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology*, 56:227-232.
- Thiem, B. ; Go ślińska, O. ; Kikowska, M. ; Budzianowski, J. (2010). Antimicrobial activity of three *Eryngium* L. species (*Apiaceae*). *Herba Polonica*, 56(4):52-59.
- Thoss, V. ; Baird, M.S. ; Lock, M.A. ; Courty, P.V. (2002). Quantifying the phenolic content of freshwaters using simple assays with different underlying reaction mechanisms. In: Waterhouse, A.L. 2002. Unit II.1: Polyphenolics: Determination of Total Phenolics, p. 1–4. In: R.E. Wrolstad (ed.). *Current protocols in food analytical chemistry*. John Wiley & Sons, New York.
- Tolo, A.D. (2002). Etude des activités biologiques et de la toxicité des écorces de racine de *Securidaca longepedunculata* Fres (Polygalaceae). Thèse en Pharmacie, université de Bamako, Mali.
- Tra Bi, F.H. ; Irié, G.M. ; N'Gaman, K.C.C. ; Mohou, C.H.B. (2008). Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire. *Sciences et Nature* 5(1):39-48.
- Trease, G.E. ; Evans, W.C. (1996). A textbook of pharmacognosy. In: Karumi, Y. ; Onyeyili, P.A. ; Ougbuaja, V.O. (2004). Identification of Actives Principles of *M. balsamina* (Balsam apple) Leaf Extract. *Journal of Medical Sciences*, 4:179-182.

U

- Ulanowska, K. ; Traczyk, A. ; Konopa, G. ; Wegrzym, G. (2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.*, 184(5):271-8.

V

- Valko, M. ; Leibfritz, D. ; Moncol, J. ; Cronin, M.T.D. ; Mazur, M. ; Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell.*, 39:44-84.
- Verma, R. ; Kumar, A. ; Pathan, K. ; Bhandari, A. (2011). A Review on Phytochemical and Pharmacological Studies of *Salvadora* Genus. *Journal of Natura Conscientia*, 2:466-471.
- Viguié, C. (2000). Médecine thérapeutique. *Thérapeutique*, 3(3):199-208.
- Vinson, J.A. ; Su, X.H. ; Zubik, L. ; Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. In: Waterhouse, A.L. 2002. Unit II.1: Polyphenolics: Determination of Total Phenolics, p. 1–4.

In: R.E. Wrolstad (ed.). Current protocols in food analytical chemistry. John Wiley & Sons, New York.

Voet, D. ; Voet, J.G. (2005). Biochimie. De Boeck Supérieur, 2^{ième} édition, Bruxelles, Belgique, p 1600.

W

Waterhouse, A.L. 2002. Unit II.1: Polyphenolics: Determination of Total Phenolics, p. 1–4. In: R.E. Wrolstad (ed.). Current protocols in food analytical chemistry. John Wiley & Sons, New York.

Watt, J.M. ; Breyer-Brandwijk, M.G. (1962). The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. In: Khalil, A.T. (2006). Benzylamides from *Salvadora persica*. Arch. Pharm. Res., 29(11):952-956.

Wiseman, S. ; Waterhouse, A. ; Korver, O. (2001). The health effects of tea and tea components: Opportunities for standardizing research methods. In: Waterhouse, A.L. 2002. Unit II.1: Polyphenolics: Determination of Total Phenolics, p. 1–4. In: R.E. Wrolstad (ed.). Current protocols in food analytical chemistry. John Wiley & Sons, New York.

Y

Yi-Zhong, C. ; Mei, S. ; Jie, X. ; Qiong, L. ; Harold, C. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Sciences, 78(25):2872-2888.

Z

Zenk, M.H. ; Juenger, M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. Phytochemistry, 68:2757-2772.

Zhang, W.J. ; Björn, L.O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. Fitoterapia, 80:207-218.

Zodape, S.T. ; Indusekhar, V.K. (1997). *Salvadora persica*- a boon to wasteland development. In: Reddy, M.P. ; Shah, M.T. ; Patolia, J.S. (2008). *Salvadora persica*, a potential species for industrial oil production in semiarid saline and alkali soils. Industrial crops and products, 28:273-278.

ANNEXES

❖ Réactif de Mayer

La préparation de ce réactif s'effectue comme suit :

- Dissoudre 1,358 g de HgCl_2 dans 60 ml d'eau ;
- Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau ;
- Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

❖ Réactif de Wagner

Ce réactif a été préparé comme suit :

- Dissoudre 2 g de KI et 1,27 g de I_2 dans 75 ml d'eau ;
- Ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

❖ Bouillon nutritif

- Extrait de levure 2 g
- Extrait de viande 2 g
- Peptone 5 g
- NaCl 5 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 7,4

❖ Chapman

- Peptone 10 g
- Extrait de viande 1 g
- NaCl 75 g
- Mannitol 10 g
- Rouge de Phénol 0,025 g
- Eau distillée 1000 ml
- Agar 15 g
- pH 7,4

❖ Eau physiologie

- NaCl 9 g
- Eau distillée 1000 ml

❖ Gélose nutritive

- Extrait de levure 2 g
- Extrait de viande 2 g
- Peptone 5 g
- NaCl 5 g

- Agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 7,4

❖ **Mac Conkey**

- Peptone 20 g
- Lactose 10 g
- Sels biliaires 1,5 g
- Cristal violet 0,001 g
- Rouge neutre 0,05 g
- NaCl 5 g
- Agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 7,1

❖ **Mueller Hinton**

- Macération de viande 300 ml
- Peptone de caséine 17, 5 g
- Amidon 1,5 g
- Agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 7,4

❖ **PDA (Potatoes Dextrose Agar)**

- Pomme de terre 200 g
 - Eau distillée 700 ml
- Chauffage et filtration : le filtrat +
- Sucrose 20 g
 - Agar 15 g
 - Eau distillée 1000 ml

❖ **Courbe de pyrocatechol**

Concentration (mg/ml)	Absorbance
1,09	0,101
6	0,787
6,5454	0,831
7,0909	0,89

7,6363	0,987
8,1818	1,028

❖ Courbe de routine

Concentration (mg/ml)	Absorbance
0,05	0,124
0,1	0,262
0,15	0,335
0,2	0,473
0,25	0,615
0,3	0,771
0,35	0,838
0,4	0,919
0,45	1,032

Annexe 1. Résultats de l'activité antiradicalaire (DPPH) de l'extrait d'acétate éthylique d'*Eryngium maritimum*

Concentration (mg/ml)	Pourcentage d'inhibition % (moyenne)
0,1	38,32
0,2	92,39
0,3	95,63
0,4	95,7
0,5	95,93
0,6	96,53
0,7	97,59
0,8	98,04
0,9	98,79
1	99,09

Annexe 2. Résultats de l'activité antiradicalaire (DPPH) de l'extrait butanolique d'*Eryngium maritimum*

Concentration (mg/ml)	Pourcentage d'inhibition % (moyenne)
0,006	20,59
0,013	53,94
0,02	54,25
0,026	59,39
0,033	67,45
0,04	78,94
0,046	83,03
0,053	83,36
0,06	92,21
0,066	96,23

Annexe 3. Résultats de l'activité antiradicalaire (DPPH) de l'extrait acétonique d'*Eryngium maritimum*

Concentration (mg/ml)	Pourcentage d'inhibition % (moyenne)
0,02	15,72
0,04	29,25
0,06	45,7
0,08	47,45
0,1	60,69
0,12	63,02
0,14	73,79
0,16	79,91
0,18	84,78
0,2	93,66

Annexe 4. Résultats de l'activité antiradicalaire (DPPH) de l'extrait méthanolique d'*Eryngium maritimum*

Concentration (mg/ml)	Pourcentage d'inhibition % (moyenne)
0,05	5,4
0,075	8,47
0,1	23,52
0,125	24,1
0,15	25,78
0,175	27,45

0,2	42,29
0,225	45,58
0,25	55,8

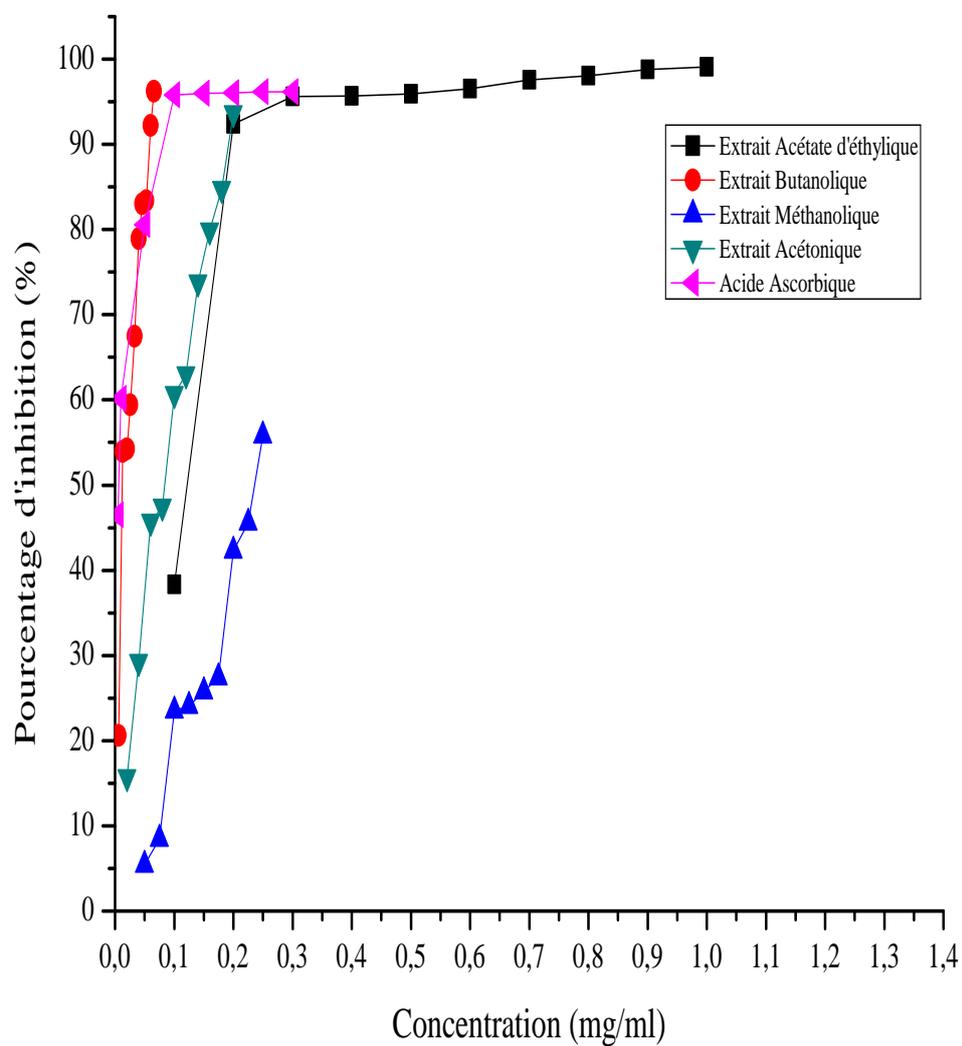
Annexe 5. Résultats de l'activité antiradicalaire (DPPH) de l'acide ascorbique

Concentration (mg/ml)	Pourcentage d'inhibition % (Imoyenne)
0,005	46,5
0,01	60,12
0,05	80,54
0,1	95,81
0,15	95,99
0,2	96,05
0,25	96,14
0,3	96,17

Annexe 6. Résultats du pouvoir de réduction du fer des extraits des racines d'*Eryngium maritimum*

Concentration (mg/ml)	Absorbance				
	Extrait acétate éthylique	Extrait butanolique	Extrait méthanolique	Extrait acétonique	Acide ascorbique
0,05	-	-	-	-	1,227
0,075	-	-	-	-	1,454
0,1	0,236	0,487	0,2235	0,2385	1,7855
0,25	0,3655	0,778	0,35	0,372	2,1

0,5	0,6	1,3955	0,519	0,651	2,5
0,75	0,7785	1,8205	0,754	0,823	-
1	1,058	2,302	1,044	1,1995	-



Annexe7. Activité antiradicalaire (DPPH) des extraits des racines d'*Eryngium maritimum*