



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie
Laboratoire des Produits Naturels « LAPRONA »

THESE

Présentée par : M^{lle} Fawzia BEDDOU

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie Cellulaire et Biochimie

Option : Produits naturels, aspects nutritionnels et activités biologiques

Thème

Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes
Rumex vesicarius L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur.

Soutenue le : 14 / 04 / 2015

Devant le jury :

Présidente :	M ^{me} BENDIMERAD Nassima (Pr)	Université A.B.B Tlemcen
Directrice de thèse :	M ^{me} ATIK-BEKKARA Fawzia (Pr)	Université A.B.B Tlemcen
Co-Directrice de thèse :	M ^{me} BEKHECHI Chahrazed (MCA)	Université A.B.B Tlemcen
Examineurs :	M. BELLAHCEN Miloud (Pr)	Centre universitaire - Aïn Témouchent
	M. DJEBLI Noureddine (Pr)	Université de Mostaganem
	M. KSOURI Riadh (MCA)	Université de Tunis

Année universitaire : 2014 - 2015

« A la lumière de la connaissance, l'heureux résultat semble presque aller de soi ; tout étudiant (...) peut l'appréhender sans trop de difficulté. Mais les longues années de tâtonnements, de recherches dans le noir, avec leur lancinante tension, l'alternance des périodes de confiance et de découragement, puis finalement la sortie vers la lumière, seuls ceux qui ont prouvé cela peuvent le comprendre. »

A. Einstein (1934).

« Moi, je sais, sans être sorcière, à quoi sont bonnes les moindres herbes que tu écrases sous tes pieds ; et quand je sais leur usage, je les regarde et ne méprise ni leur odeur ni leur figure. (...) l'on méprise trop souvent ce qui ne paraît ni beau ni bon, et que, par là, on se prive de ce qui est secourable et salutaire. »

La petite Fadette. George Sand (2014).

REMERCIEMENTS

C'est avec une grande joie qu'ai débuté cette thèse, et un léger pincement au cœur que j'en arrive aujourd'hui à écrire ces remerciements car ils sont la conclusion finale de toutes ces années de travail. Ainsi, une page importante de ma vie se tourne.

Cette thèse doit beaucoup aux nombreuses personnes qui m'ont encouragée et soutenue durant ces quelques années qui sont passées si rapidement. Je voudrais leur adresser ces quelques mots afin de les remercier...

Je tiens tout d'abord à remercier **M. CHABANE SARI Daoudi**, Professeur à l'Université de Tlemcen et Directeur du Laboratoire de Produits Naturels, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour ses conseils toujours très avisés. Merci pour toutes les discussions autour de mon sujet de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à ma directrice de thèse, **M^{me} ATIK BEKKARA Fawzia**, Professeur au département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Je lui suis reconnaissante pour la confiance et le soutien permanent qu'elle m'a témoigné dans ce travail ainsi que pour la grande autonomie qu'elle m'a accordé. J'espère être à la hauteur de sa confiance et de ses espérances ! A ma co-directrice, **M^{me} BEKHECHI Chahrazed**, Maître de conférences au département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, j'adresse mes plus vifs remerciements pour son aide, sa gentillesse au quotidien, tous ses encouragements et son soutien dans les moments difficiles. Je tiens également à exprimer à mes deux directrices mes sincères remerciements pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent travail. Je vous prierais de trouver ici l'expression de ma très haute considération.

Je suis particulièrement reconnaissante à **M^{me} BENDIMERAD Nassima**, Professeur au département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle m'a fait d'avoir acceptée la présidence du jury de ma thèse. Qu'elle soit assurée de ma respectueuse considération.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et d'examiner ces travaux de recherche : **M. DJEBLI Noureddine**, Professeur à l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem et **M. BELLAHCEN Miloud**, Professeur au Centre universitaire d'Aïn Témouchent. Je leurs suis particulièrement reconnaissante de m'avoir accompagné dans cette dernière étape de travail.

De même, je remercie **M. KSDURI Riadh**, Maître de conférences et chercheur au Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (Tunisie), d'avoir accepté de participer à ce jury, au plus, pour l'ensemble des analyses qui ont été effectuées au sein de son laboratoire. Je remercie également **M^{lle} FELLAH Hanene** pour sa disponibilité et son aide dans la réalisation de quelques tests d'activité antioxydante et **M^{me} BOURGOU Soumaya** pour les analyses CLHP. Je tiens aussi à remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire des Plantes Extrêmophiles (LPE) du Centre de Biotechnologie de Borj-cédria (CBBC) pour leur constante bonne humeur.

Je tiens également à remercier **M. MAHBOUBI Ahmed**, Maître assistant au département d'Écologie et Environnement, Université de Tlemcen, pour m'avoir aidée dans l'identification des plantes et **M. SELLES Chaouki**, Maître de conférences à l'Université de Tlemcen, pour son aide, ses conseils et sa sympathie qui

furent pour moi une source constante de motivation. Je tiens aussi à remercier les gens qui m'ont accompagné durant les sorties de cueillette des plantes. Merci pour m'avoir orientée et guidée sur terrain.

Je tiens aussi à remercier tous les enseignants, ingénieurs, techniciens et administrateurs du département de Biologie, qui m'ont aidé, guidé et encouragé ; et tous les membres du laboratoire de Produits Naturels de l'Université de Tlemcen, que je ne saurai assez remercier pour tout ce qu'ils ont fait. Merci pour tous les bons moments passés ensemble au laboratoire.

Que vous dire mes chers parents ? Vous étiez toujours là pour m'écouter, me soutenir, me réconforter et m'encourager dans les moments de doute.... Tous les mots ne suffiraient pas... Sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien, votre amour et pour avoir cru en moi ! Merci à mes proches notamment mes sœurs, mon frère et mon beau frère pour leur soutien et leur présence à mes côtés.

Je voudrais également remercier mes collègues doctorants et mes amis qui m'ont permis de m'évader et pour le réconfort qu'ils ont pu m'apporter...

Enfin, je finirai ces remerciements par une citation de Marcel PROUST :

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries. »

Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation des deux plantes médicinales sahariennes (*Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) et *Rumex vesicarius* L. (Polygonaceae)) en les caractérisant par un screening phytochimique, une évaluation des activités antimicrobienne et antioxydante et une identification de certains composés phénoliques par chromatographie.

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des différentes parties traitées a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques. Ceci a été confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des flavonols et des tanins condensés. Nous avons démontré que le méthanol aqueux est le meilleur extracteur des flavonoïdes, tandis que l'acétone possède la capacité d'extraire plus de tanins. Considérant les organes, les fleurs d'*A. radiata* accusent les teneurs les plus élevées en ces composés. Ainsi, afin d'obtenir un extrait enrichi en métabolites d'intérêt – les flavonoïdes, nous avons opté pour une extraction liquide-liquide en utilisant différents solvants de polarité croissante. La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'aluminium révèle que les fractions butanolique et acétate d'éthyle sont les plus riches avec des teneurs respectives de (55.910 ± 1.022 mg EC/g MS) et (47.394 ± 1.497 mg EC/g MS) pour les fleurs d'*A. radiata* et de (5.597 ± 0.038 mg EC/g MS) et (4.648 ± 0.068 mg EC/g MS) pour la partie aérienne de *R. vesicarius*. Par ailleurs, la détermination de la teneur en pigments liposolubles révèle la richesse de *Rumex vesicarius* en β -carotène (116.893 ± 1.602 μ g/g MS), en lycopène (156.403 ± 1.592 μ g/g MS) et en chlorophylle a (271.447 ± 3.457 μ g/g MS). Par contre, en comparant les différents organes d'*A. radiata*, nous remarquons que les fleurs contiennent une teneur élevée en β -carotène (38.831 ± 0.927 μ g/g MS) et en lycopène (48.911 ± 0.567 μ g/g MS), tandis que les feuilles sont riches en chlorophylle a (131.844 ± 1.267 μ g/g MS). Ces composés mineurs confèrent aux deux plantes des qualités nutritionnelles et thérapeutiques importantes.

L'évaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante des différents extraits et fractions a été réalisée par six méthodes, à savoir : la réduction du phosphomolybdate (ou capacité antioxydante totale (CAT)), le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), le piégeage du radical-cation ABTS^{•+} (l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), le blanchiment du β -carotène et le pouvoir chélateur des ions ferreux. Ainsi, ils présentent des activités antiradicalaires et antioxydantes intéressantes, dépendantes du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes. La meilleure activité, par rapport à l'antioxydant de synthèse (α -tocophérol), est obtenue avec les fractions acétate d'éthyle des deux espèces et cela en réduisant les ions du fer ferrique en fer ferreux avec des valeurs de CE₅₀ égales à 0.161 ± 0.005 mg/ml pour les fleurs d'*A. radiata* et 0.233 ± 0.001 mg/ml pour la partie aérienne de *R. vesicarius*. Une relation linéaire a été établie ; les fractions les plus riches en flavonoïdes étant les plus actives. Inversement, une très forte inhibition de l'oxydation lipidique a été obtenue par la fraction hexanique des fleurs d'*A. radiata* (CI₅₀ < 0.094 mg/ml), pourtant très peu concentrée en polyphénols. Ceci est du probablement à la présence d'autres substances qui peuvent agir indépendamment ou en synergie.

Les différents extraits et fractions ont été également soumis à un criblage pour leur possible activité antimicrobienne. Les fractions chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique des feuilles d'*A. radiata* ont révélé une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*, avec des CMI situées entre 0.156 - 0.625 mg/ml. Par contre, les extraits obtenus à partir de la partie aérienne de *Rumex vesicarius* se sont révélés inactifs vis-à-vis de toutes les souches microbiennes testées. De même, une tendance a été montrée indiquant que les extraits les plus riches en flavonoïdes présentent des activités antibactériennes les plus élevées.

L'identification chromatographique menée sur les deux espèces a permis de caractériser les principaux composés phénoliques. Quatre grandes familles de composés ont été mises en évidence : il s'agit de deux acides phénols (l'acide procatéchique (3.21%) et l'acide caféique (3.83%)), deux flavonoïdes (la naringénine-7-O-glucoside (1.46%) et la morine (27.09%)) et une coumarine (1.64%) dans la FAE des fleurs d'*A. radiata* et de l'acide tannique (0.65%), le résorcinol (2.93%), cinq acides phénols (l'acide gentisique (6.54%), l'acide vanillique (1.40%), l'acide chlorogénique (9.13%), l'acide syringique (2.02%) et l'acide 3-(4-méthoxyphényl) propanoïque (2.20%)), une coumarine (1.06%) et trois composés flavoniques (la naringénine (1.05%), la naringénine-7-O-glucoside (2.91%) et la lutéoline (0.27%)) dans la FAE de la partie aérienne de *R. vesicarius*. Ces principes actifs majeurs possèdent diverses activités biologiques et jouent un rôle reconnu dans le maintien d'un bon état de santé.

Mots clés : *Anvillea radiata*, *Rumex vesicarius*, Composés phénoliques, Activité antioxydante, Pouvoir antimicrobien, CCM, CLHP.

Abstract

The work presented in this thesis contributes in the valorization of both Saharan medicinal plants: *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) and *Rumex vesicarius* L. (Polygonaceae) by characterizing them with phytochemical screening, evaluating their antimicrobial and antioxidant activities and identifying some of their phenolic compounds by chromatography.

The preliminary evaluation of the phytochemical composition of the different treated parts highlighted the presence of some chemical groups. This was confirmed by a quantitative analysis based on the measurement of total phenolics, flavonoids, flavonols and condensed tannins content. We have shown that aqueous methanol is the best extractor of flavonoids, while acetone has the ability to extract more of tannins. Considering organs, flowers of *A. radiata* have the highest levels of these compounds. Thus, in order to obtain an extract enriched with metabolites of interest - flavonoids, we opted for a liquid-liquid extraction using different solvents with increasing polarity. The quantitative determination of total flavonoids by the aluminum trichloride method revealed that butanol and ethyl acetate fractions were the richest with respective holders of (55.910 ± 1.022 mg CE/g DW) and (47.394 ± 1.497 mg CE/g DW) for *A. radiata* flowers and (5.597 ± 0.038 mg CE/g DW) and (4.648 ± 0.068 mg CE/g DW) for the aerial part of *R. vesicarius*. Furthermore, the determination of the liposoluble pigments content revealed the richness of *Rumex vesicarius* in β -carotene (116.893 ± 1.602 μ g/g DW), in lycopene (156.403 ± 1.592 μ g/g DW) and in chlorophyll a (271.447 ± 3.457 μ g/g DW). However, by comparing the various organs of *A. radiata*, we noticed that the flowers have a high content of β -carotene (38.831 ± 0.927 μ g/g DW) and lycopene (48.911 ± 0.567 μ g/g DW), while the leaves are rich on chlorophyll a (131.844 ± 1.267 μ g/g DW). These minor compounds give to these plants important nutritional and therapeutic qualities.

The *in vitro* evaluation of the different extracts and fractions antioxidant activity was performed by six methods, namely: total antioxidant capacity by phosphomolybdenum assay, iron reducing power, DPPH radical-scavenging activity, ABTS radical-scavenging activity, β -carotene bleaching test and chelating effect on ferrous ions. Thus, they have interesting radical scavenging and antioxidant activities, dependent on the content of total phenolics and flavonoids. The greatest activity relative to the synthetic antioxidant (α -tocopherol) is obtained with ethyl acetate fractions by reducing power through the transformation of ferrous to ferric ions with EC₅₀ values of 0.161 ± 0.005 mg/ml for *A. radiata* flowers and 0.233 ± 0.001 mg/ml for the aerial part of *R. vesicarius*. A linear relationship has been established; the richest fractions in flavonoids being the most active. Conversely, a very high inhibition of lipid oxidation was obtained in the hexane fraction of *A. radiata* flowers (IC₅₀ < 0.094 mg/ml), yet very low concentrated on polyphenols. This is probably due to the presence of other substances which may act independently or synergistically.

The various extracts and fractions were also subjected to a screening for their potential antimicrobial activity. The chloroform, the ethyl acetate and the butanol fractions of *A. radiata* sheets showed a high antibacterial activity towards *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, with a MIC between 0.156 and 0.625 mg/ml. However, the extracts obtained from the aerial part of *Rumex vesicarius* were inactive towards all tested microbial strains. Similarly, a tendency was shown indicating that the richest extracts on flavonoids exhibit the higher antibacterial activities.

The chromatographic identification conducted on the two species allowed us to characterize the main phenolic compounds. Four major families of compounds have been identified: two phenolic acids (procatechique acid (3.21%) and caffeic acid (3.83%)), two flavonoids (naringenin-7-O-glucoside (1.46%) and morin (27.09%)) and coumarin (1.64%) in the EAF of *A. radiata* flowers and tannic acid (0.65%), resorcinol (2.93%), five phenolic acids (gentisic acid (6.54%), vanillic acid (1.40%), chlorogenic acid (9.13%), syringic acid (2.02%) and 3- (4-methoxyphenyl) propanoic acid (2.20%)), coumarin (1.06%) and three flavonoid compounds (naringenin (1.05%), naringenin-7-O-glucoside (2.91%) and luteolin (0.27%)) in the EAF of the aerial part of *R. vesicarius*. These major active ingredients possess various biological activities and play an important and acknowledged role in maintaining good health.

Keywords: *Anvillea radiata*, *Rumex vesicarius*, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial power, TLC, HPLC.

ملخص

يهدف العمل المقدم في هذه الأطروحة الى الاسهام في اعطاء الأهمية لاثنتين من النباتات الطبية الصحراوية: *Rumex vesicarius* L. (Polygonaceae) و *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) وهذا من خلال الفحص الفيتو كيميائي، تقييم الأنشطة المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة وكذا تحديد بعض المركبات الفينولية بواسطة التحليل الكروماتوغرافي.

ساعد التقييم الأولي للتركيب الفيتوكيميائي لمختلف الأجزاء المعالجة على استنباط وجود بعض المجموعات الكيميائية. وهذا ما أكده التحليل الكمي للفينولات الإجمالية، الفلافونويدات، الفلافونولات والتانان. لقد أثبتنا، من خلال هذه الدراسة، أن الميثانول المائي هو أفضل مستخرج للفلافونويدات، في حين الأسيتون لديه قدرة استخلاص أكبر للتانان. باعتبار أن أزهار *A. radiata* تحتوي على أكبر قيمة لهذه المركبات. وبالتالي، من أجل الحصول على مستخلص غني بهذه المركبات، الفلافونويدات، اخترنا طريقة الاستخلاص سائل-سائل وهذا باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة. التحديد الكمي للفلافونويدات الإجمالية باستخدام ثلاثي كلوريد الألومنيوم كشف لنا أن المستخلصات الجزئية للبتانول و أسيتات الايثيل هما الأكثر غناء وهذا ب (1.022 ± 55.910 مغ/مغ معادل الكاتشين من المادة الجافة) و ب (1.497 ± 47.394 مغ/مغ معادل الكاتشين من المادة الجافة) على التوالي وهذا لأزهار *A. radiata* و ب (0.038 ± 5.597 مغ/مغ معادل الكاتشين من المادة الجافة) و (0.068 ± 4.648 مغ/مغ معادل الكاتشين من المادة الجافة) وهذا للجزء الهوائي لـ *R. vesicarius*.

بالإضافة إلى ذلك، فإنه قد تم تحديد محتوى الأصبغة الذوابة في الزيت و قد أظهر ذلك ثراء *R. vesicarius* ب β -كاروتان (1.602 ± 116.893 مغ/غ)، على الليكوبان (1.592 ± 156.403 مغ/غ) و على الكلوروفيل a (3.457 ± 271.447 مغ/غ). وعلى عكس ذلك، مقارنة بمختلف أعضاء *A. radiata*، لاحظنا إحتواء الأزهار على كميات مرتفعة من الـ β -كاروتان (0.927 ± 38.831 مغ/غ) و على الليكوبان (0.567 ± 48.91 مغ/غ)، في حين أن الأوراق كانت أكثر ثراء بالكلوروفيل a (1.267 ± 131.844 مغ/غ). هذه المركبات تعطي لكلا النباتين قيمة غذائية و علاجية مهمة.

لقد تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة سنة طرق، وهي: تقدير القدرة المضادة للأكسدة الإجمالية، قوة إرجاع الحديد، تثبيط الجذر الحر DPPH•، تثبيط الجذر الحر ABTS^{•+}، تثبيط أكسدة الـ β -كاروتان و القدرة على إحتجاز شوارد الحديد. من خلال هذا، تم ملاحظة قدرة مضادة للأكسدة مثيرة للاهتمام مرتبطة بمحتوى البوليفينولات و الفلافونويدات. أفضل نشاط، مقارنة بمضادات الأكسدة الاصطناعية، تم تسجيله من خلال مستخلص اسيتات الايثيل لكلا النباتين وهذا بإرجاع شوارد الحديد Fe^{3+} الى Fe^{2+} بقيمة قدرت ب 0.005 ± 0.161 مغ/ملل لأزهار *A. radiata* و ب 0.001 ± 0.233 مغ/ملل للجزء الهوائي لـ *R. vesicarius*.

لقد تبين من خلال هذه الدراسة وجود علاقة خطية؛ حيث أن المستخلصات الأكثر إحتواء على الفلافونويدات هي الأكثر فعالية. وعلى العكس من ذلك، لاحظنا تثبيط قوي لأكسدة الدهون لمستخلص الهيكسان لأزهار *A. radiata* ($Cl_{50} > 0.094$ مغ/ملل) بالرغم من إحتوائه على تركيز ضعيف من البوليفينولات وقد يفسر هذا بوجود مكونات أخرى قادرة على التفاعل بشكل مستقل أو بالتآزر.

مختلف المستخلصات كانت أيضا محل دراسة النشاط المضاد للمكروبات. مستخلصات الكلوروفورم، اسيتات الايثيل و البوتانول لأوراق *A. radiata* كشفت لنا عن نشاط فعال مضاد للميكروبات وهذا ضد *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* بتركيز مثبط قدر ب 0.156 - 0.625 مغ/ملل. على عكس ذلك، فإن مستخلصات الأجزاء الهوائية لـ *Rumex vesicarius* لم تظهر أي نتيجة وذلك ضد كل الميكروبات المختبرة. كذلك، تم اثبات أن المستخلصات الغنية بالفلافونويدات لها الأكثر قوة مضادة للميكروبات.

مكننا التحليل الكروماتوغرافي للنبتين من تحديد المركبات الأساسية الفينولية. أربع عائلات كبرى تم معرفتها: اثنتين من أحماض الفينول (3.21% acide procatéchique و 3.83% acide caféique)، مركبان من الفلافونويدات ((27.09% la morine و 1.46% la naringénine-7-O-glucoside) و 1.64% coumarine) وهذا في مستخلص اسيتات ايثيل الأزهار *A. radiata* و 0.65% acide tannique، 2.93% réSORCINOL، وخمس من أحماض الفينول (6.54% acide gentisique، 1.40% acide vanillique، 9.13% acide chlorogénique، 2.02% acide syringique و حمض 3-(4-méthoxyphényl) propanoïque (2.20%)، مركب كومارين (1.06%) و ثلاث فلافونويدات ((0.27% lutéoline، 2.91% naringénine-7-O-glucoside و 1.05% naringénine)

في مستخلص أسيتات الايثيل للجزء الهوائي لـ *R. vesicarius*، هذه المكونات الرئيسية النشطة تمتلك أنشطة بيولوجية مختلفة، وتلعب دورا هاما في الحفاظ على صحة جيدة.

الكلمات المفتاحية :

Anvillea radiata, *Rumex vesicarius*, المركبات الفينولية، القدرة المضادة للأكسدة، النشاط المضاد للمكروبات، CLHP, CCM.

TABLE DES MATIERES

Remerciementsii
Résuméiv
Abstractv
ملخصvi
Table des matièresvii
Liste des figuresx
Liste des tableauxxii
Introduction générale	
Introduction générale2
1^{ère} partie : Synthèse bibliographique	
Chapitre 1. Les plantes dans la thérapeutique4
1.1. Les plantes médicinales5
1.2. Les substances naturelles viennent du métabolisme secondaire9
1.3. Monographie des plantes étudiées25
Chapitre 2. Stress oxydant et antioxydants34
2.1. Généralités35
2.2. Les conséquences du stress oxydant36
2.3. Mécanismes de défense contre le stress oxydant39
Chapitre 3. Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes41
3.1. Généralités42
3.2. Place des plantes médicinales dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques45
2^{ème} partie : Matériel et méthodes	
1. Matériel végétal, criblage phytochimique et extraction49
1.1. Critères de sélection des plantes49
1.2. Collecte du matériel végétal50
1.3. Criblage phytochimique53
1.4. Préparation des extraits53
1.4.1. Un point bibliographique sur l'importance des solvants dans l'extraction des composés phénoliques53
1.4.2. Préparation des extraits bruts par Extraction Solide - Liquide (ESL)55
1.4.3. Fractionnement de l'extrait hydrométhanolique par Extraction Liquide - Liquide (ELL)55
2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)56
2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques56
2.1.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux56
2.1.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux57
2.1.3. Détermination de la teneur en flavonols57
2.1.4. Détermination de la teneur en tanins condensés58
2.2. Détermination de la teneur en pigments liposolubles58

3. Evaluation <i>in vitro</i> des activités biologiques	59
3.1. Le potentiel antioxydant des plantes	59
3.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)	60
3.1.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)	60
3.1.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)	62
3.1.4. Piégeage du radical-cation ABTS ^{•+}	62
3.1.5. Inhibition du blanchiment du β-carotène	64
3.1.6. Chélation des ions ferreux	64
3.2. Le potentiel antimicrobien des plantes	66
3.2.1. Propriétés des germes étudiés	66
3.2.2. Mise en culture des souches	66
3.2.3. Etude de l'activité antimicrobienne	66
3.2.3.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)	68
3.2.3.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide	68
4. Analyses chromatographiques	69
4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	69
4.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	70
5. Analyse statistique	71
3^{ème} partie : Résultats et discussion	
1. Criblage phytochimique	73
2. Criblage biologique des différents extraits obtenus par extraction solide-liquide	74
2.1. Rendements en extraits bruts	75
2.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)	76
2.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques	76
2.2.1.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux	76
2.2.1.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux	78
2.2.1.3. Détermination de la teneur en flavonols	79
2.2.1.4. Détermination de la teneur en tanins condensés	79
2.2.2. Détermination de la teneur en pigments liposolubles	81
2.3. Etude des activités biologiques des extraits bruts	83
2.3.1. Evaluation du potentiel antioxydant des extraits	83
2.3.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)	83
2.3.1.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)	85
2.3.1.3. Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)	86
2.3.1.4. Piégeage du radical-cation ABTS ^{•+}	87
2.3.1.5. Inhibition du blanchiment de β-carotène	88
2.3.1.6. Chélation des ions ferreux	90
2.3.2. Relation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits bruts	91
2.3.3. Le potentiel antimicrobien des extraits bruts	92
3. Criblage biologique des différentes fractions obtenues par extraction liquide-liquide	94

3.1. Rendements en extraits	94
3.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)	95
3.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques	95
3.3. Etude des activités biologiques des différentes fractions obtenues par ELL	97
3.3.1. Evaluation du potentiel antioxydant	97
3.3.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)	97
3.3.1.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)	98
3.3.1.3. Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)	100
3.3.1.4. Piégeage du radical-cation ABTS ^{•+}	100
3.3.1.5. Inhibition du blanchiment de β-carotène	102
3.3.2. Relation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des différentes fractions	103
3.3.3. Le potentiel antimicrobien des différentes fractions	105
3.3.3.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)	105
3.3.3.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide	108
3.4. Détermination du profil phytochimique des fractions actives	109
3.4.1. Caractérisation phytochimique par Chromatographie sur couche mince (CCM)	109
3.4.1.1. Interprétation des CCM préliminaires de la fraction hexanique des fleurs d' <i>A. radiata</i>	110
3.4.1.2. Interprétation des CCM préliminaires des fractions chloroformiques	111
3.4.1.3. Interprétation des CCM préliminaires des fractions acétate d'éthyles	112
3.4.1.4. Interprétation des CCM préliminaires des fractions butanoliques	117
3.4.2. Caractérisation phytochimique par Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	117
3.4.2.1. Analyse du profil chromatographique de la fraction acétate d'éthyle des fleurs d' <i>A. radiata</i>	118
3.4.2.2. Analyse du profil chromatographique de la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne de <i>R. vesicarius</i>	119
4. Potentialités des plantes étudiées à la lumière des composés révélés	120
Conclusion générale et perspectives	
Conclusion générale et perspectives	124
Références bibliographiques	127
Annexes	144
Valorisation des travaux de la thèse	

Liste des figures

Figure 1. De la plante au médicament	8
Figure 2. Relations biogénétiques entre les principales classes de métabolites secondaires, sources de principes actifs	10
Figure 3. Squelette moléculaire de base des flavonoïdes avec la numération classique	12
Figure 4. Voies de biosynthèse des flavonoïdes	13
Figure 5. Structures chimiques de quelques phénols simples	14
Figure 6. Structures chimiques de quelques acides hydroxybenzoïque	14
Figure 7. Structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques	15
Figure 8. Structures chimiques de quelques coumarines	15
Figure 9. Structure et numération des atomes de carbone du phénylpropane (1) et des lignanes (2) (liaison β - β' ou 8,8')	16
Figure 10. Structures chimiques de quelques anthocyanidines	17
Figure 11. Structures chimiques de quelques acides phénols	17
Figure 12. Squelette moléculaire d'un flavan-3-ol	18
Figure 13. Quelques motifs quinoniques	18
Figure 14. Voie de l'acide mévalonique et synthèse des terpénoïdes	19
Figure 15. Exemples de monoterpènes	20
Figure 16. Quelques exemples de sesquiterpènes caractéristiques des huiles essentielles	20
Figure 17. Filiation (schématique) des principaux groupes de lactones sesquiterpéniques	21
Figure 18. Exemples de structures : (1) Taxane (diterpène) ; (2) Squalène (triterpène) ; (3) Cholesterol (stéroïdes) ; (4) Cardénolides	21
Figure 19. Exemples de quelques iridoïdes	22
Figure 20. Exemples de structures alcaloïdiques	23
Figure 21. Aspects morphologiques de l'espèce <i>Anvillea radiata</i> Coss. & Dur.	26
Figure 22. Structure chimique d'un 8α , 9α -époxyparthénolide isolé d' <i>Anvillea radiata</i>	27
Figure 23. Feuilles de renouée pourvues d'une ochréa	29
Figure 24. Aspects morphologiques de l'espèce <i>Rumex vesicarius</i> L.	30
Figure 25. Réactions de la peroxydation lipidique	37
Figure 26. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	38
Figure 27. Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène	39
Figure 28. Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques	40
Figure 29. L'acide 3-farnésyl-2-hydroxy benzoïque	46
Figure 30. Structures chimiques de la berbérine (a) et de l'inhibiteur des pompes MFS, la 5'-méthoxyhydnocarpine (b), isolés de <i>Berberis fremontii</i>	47
Figure 31. Situation géographique des stations de collecte	52
Figure 32. Schéma de fractionnement ELL adopté pour le partage en cinq fractions (FH, FC, FAE, FB et Faq) des extraits bruts hydro-méthanoliques	56
Figure 33. Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH•	61

Figure 34. Génération du radical-cation ABTS ^{•+} avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH)	63
Figure 35. Mécanisme de formation du complexe Fe ²⁺ -Ferrozine	65
Figure 36. Méthodologie adoptée pour l'étude phytochimique et biologique des extraits bruts	75
Figure 37. Rendements d'extraction moyens (%) obtenus par ESL	75
Figure 38. Courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	76
Figure 39. Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes	78
Figure 40. Courbe étalon de la quercétine pour le dosage des flavonols	79
Figure 41. Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des tanins condensés	80
Figure 42. Détermination du contenu en composés phénoliques des différents extraits obtenus par ESL	81
Figure 43. Teneur en pigments liposolubles contenus dans les différents organes testés (µg/g MS)	82
Figure 44. Courbe étalon de l'acide gallique pour la mesure de la capacité antioxydante	84
Figure 45. Capacité antioxydante totale, exprimée en mg EAG/g MS, des extraits bruts	84
Figure 46. Profils de l'activité antiradicalaire (test DPPH•) des extraits bruts	85
Figure 47. Pouvoir réducteur des ions ferriques, exprimé en CE ₅₀ (mg/ml), des extraits bruts	87
Figure 48. Profils de l'activité antiradicalaire (test ABTS ^{•+}) des extraits bruts	88
Figure 49. Profils de l'activité inhibitrice (test de blanchiment de β-carotène) des extraits bruts	89
Figure 50. Pouvoir chélateur des ions ferreux, exprimé en CI ₅₀ (mg/ml), des différents extraits et du standard de référence (EDTA)	91
Figure 51. Détermination du contenu en composés phénoliques des différentes fractions obtenues par ELL	97
Figure 52. Capacité antioxydante totale, exprimée en mg EAG/g MS, des différentes fractions obtenues par ELL	98
Figure 53. Profils de l'activité antiradicalaire (test au DPPH•) des différentes fractions obtenues par ELL et des standards utilisés	98
Figure 54. Pouvoir réducteur des ions ferriques, exprimé en CE ₅₀ (mg/ml), des différentes fractions obtenues par ELL et des antioxydants de synthèse	100
Figure 55. Profils de l'activité antiradicalaire (test ABTS ^{•+}) des différentes fractions obtenues par ELL et de l'antioxydant de synthèse (BHT)	101
Figure 56. Profils de l'activité inhibitrice (test de blanchiment de β-carotène) des différentes fractions obtenues par ELL et des standards utilisés	102
Figure 57. Zones d'inhibition des fractions actives relatives aux souches sensibles	107
Figure 58 : Chromatogramme obtenu à 280 nm de la fraction FAE des fleurs d' <i>Anvillea radiata</i>	119
Figure 59 : Chromatogramme obtenu à 280 nm de la fraction FAE de la partie aérienne de <i>R. vesicarius</i>	120

Liste des tableaux

Tableau 1. Quelques exemples de sources végétales riches en composés phénoliques connus pour leurs effets thérapeutiques	24
Tableau 2. Facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques	44
Tableau 3. Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations d'étude	51
Tableau 4. Réactifs spécifiques et réactions de caractérisation du criblage phytochimique	53
Tableau 5. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	59
Tableau 6 : Description et pouvoir pathogène des souches testées	67
Tableau 7. Programme (temps, débit et gradient de solvant) utilisé en CLHP analytique pour l'injection de nos extraits et des standards	71
Tableau 8. Résultats du criblage phytochimique réalisé sur <i>A. radiata</i> et <i>R. vesicarius</i>	73
Tableau 9. Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g), en flavonoïdes (mg EC/g), en flavonols (mg EQ/g), et en tanins condensés (mg EC/g) des différents extraits obtenus par ESL	77
Tableau 10. Résultats de la capacité antioxydante totale (exprimé en mg EAG/g MS) et valeurs des CI_{50} et des CE_{50} (exprimées en mg/ml) des différents extraits bruts	90
Tableau 11. Coefficients de corrélation linéaire (ρ) entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits bruts	92
Tableau 12. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différents extraits relatives aux différentes souches selon la méthode des disques	93
Tableau 13. Pourcentages massiques (%) et couleurs des fractions obtenues par extraction liquide-liquide des extraits hydrométhanoliques	95
Tableau 14. Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g), en flavonoïdes (mg EC/g), en flavonols (mg EQ/g), et en tanins condensés (mg EC/g) des différentes fractions	96
Tableau 15. Résultats de la capacité antioxydante (exprimés en mg EAG/g MS) et valeurs des CI_{50} et des CE_{50} (exprimées en mg/ml) des différentes fractions obtenues par ELL	99
Tableau 16. Coefficients de corrélation linéaire (ρ) entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante des différentes fractions obtenues par ELL	104
Tableau 17. Diamètres des zones d'inhibition des différentes fractions obtenues par ELL relatives aux différentes souches selon la méthode des disques	106
Tableau 18. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) des fractions les plus actives	108
Tableau 19. Composés identifiés dans la fraction hexanique des fleurs d' <i>A. radiata</i>	110
Tableau 20. Composés identifiés dans les fractions chloroformiques	113
Tableau 21. Composés identifiés dans les fractions acétate d'éthyle	114
Tableau 22. Composés identifiés dans les fractions butanoliques	115
Tableau 23. Longueurs d'onde utilisées dans l'étude des composés phénoliques	118

Introduction générale

Aujourd'hui comme jadis, la médecine moderne dépend beaucoup des plantes. Les laboratoires de chimie et de biologie à travers le monde ont emboîté le pas à la médecine traditionnelle pour la recherche des voies et moyens de venir à bout des pathologies diverses, ceci par la recherche de nouveaux principes actifs et la compréhension de leurs modes d'action.

Est-il nécessaire de rappeler que des « remèdes » aussi efficaces que *la quinine*, chef de file des antimalariques, *la morphine*, analgésique majeur, *l'ergot de seigle* aux vertus antimigraineuses ou *le curare* aux propriétés myorelaxantes sont d'origine végétale! **(Clément, 2005)** Trouver un traitement pour certaines maladies telle que les cancers, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires ou le VIH/SIDA constituent un challenge important pour les scientifiques.

Dans un pays regorgeant d'une richesse très importante en flore comme l'Algérie, la valorisation de la filière des plantes aromatiques et médicinales est devenue indispensable. Le Sahara, le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde, possède dans sa partie Nord, le Sahara septentrional, une végétation diffuse et clairsemée **(UNESCO, 1960 ; Ozenda, 1991)**. L'état de la flore spontanée dans cette zone ainsi que les relations entre l'homme et les espèces végétales, méritent une attention particulière.

Plusieurs plantes sahariennes, fréquemment utilisées dans la pharmacopée traditionnelle, se sont vues reconnaître un effet thérapeutique au cours des siècles. Certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études phytochimiques et ont abouti à l'isolement et à l'identification de principes actifs **(Moussaoui et al., 2010 ; Babaamer et al., 2012 ; Sekkoum et al., 2014)**. C'est dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturel que s'inscrit notre étude. La démarche poursuivie dans la réalisation de cette thèse consiste à faire une étude ethnobotanique, suivie par une extraction et une analyse qualitative et quantitative de différents composés chimiques susceptibles d'avoir une activité pharmacologique. Parmi ces composés, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ceux doués d'une activité antioxydante et/ou antimicrobienne.

Les espèces que nous avons étudiées sont : *Anvillea radiata* Coss. & Dur. de la famille des Asteraceae et *Rumex vesicarius* L. de la famille des Polygonaceae. Ces deux plantes sont surtout reconnues en thérapeutique traditionnelle pour leurs propriétés remarquables (la pathologie digestive « indigestion, constipation et maux d'estomac » est l'indication thérapeutique majeure). Cette information a été obtenue à travers des entrevues

ethnobotaniques avec des personnes nées et/ou ayant vécu longtemps dans les régions de Ghardaïa et d'Aïn Sefra.

Ce travail de recherche, réalisé au sein du Laboratoire de Produits Naturels (LAPRONA), est centré sur les composés phénoliques, source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. Le but est d'apporter des éléments pour la validation de certaines propriétés des plantes étudiées, l'identification de leurs principes actifs et la mise au point des méthodes de dosage et d'évaluation des activités biologiques. En particulier, notre équipe conduit des études portant sur les composés volatils (huiles essentielles) et les composés phénoliques (flavonoïdes) (**Bekkara *et al.*, 1998 ; Bendimerad *et al.*, 2005 ; Benhammou *et al.*, 2009 ; Bekhechi *et al.*, 2012 ; Haddouchi *et al.*, 2013 ; El-Haci *et al.*, 2014 ; Gherib *et al.*, 2014**).

Dans une première partie, nous présentons une mise au point bibliographique décrivant les notions essentielles à la compréhension de notre travail (classification et intérêt des composés phénoliques, description et travaux antérieurs des espèces étudiées, les oxydants et les antioxydants, la résistance bactérienne et les phytomolécules antimicrobiennes). La seconde décrit la partie expérimentale, avec une présentation des techniques d'extraction, des dosages spectrophotométriques, des tests d'activités antioxydante et antimicrobienne et des techniques d'analyse chromatographique, à savoir la chromatographie sur couche mince et la chromatographie en phase liquide à haute performance. La troisième partie consiste en une analyse des résultats obtenus et une discussion qui mettra l'emphase sur leur signification par rapport aux données de la littérature. Enfin, le manuscrit se terminera par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail.

1^{ère} partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 1.

Les plantes dans la thérapeutique

Sommaire

1.1. Les plantes médicinales	5
1.1.1. Aperçu historique sur l'utilisation des plantes médicinales	6
1.1.2. De la plante au médicament	7
1.2. Les substances naturelles viennent du métabolisme secondaire	9
1.2.1. Les métabolites secondaires : Une immense diversité de structures chimiques	11
1.2.1.1. Les composés phénoliques	11
a. Flavonoïdes	12
b. Phénols, Acides phénoliques	13
c. Coumarines	15
d. Lignanes, néolignanes et composés apparentés	16
e. Anthocyanosides	16
f. Tanins	17
g. Quinones	18
1.2.1.2. Les terpénoïdes et les stéroïdes	18
1.2.1.3. Les alcaloïdes	22
1.2.2. Les composés phénoliques et la santé de l'homme	23
1.3. Monographie des plantes étudiées	25
1.3.1. <i>Anvillea radiata</i> Coss. & Dur.	25
1.3.1.1. Données botaniques	25
1.3.1.2. Données phytochimiques et pharmacologiques	27
1.3.2. <i>Rumex vesicarius</i> L.	28
1.3.2.1. Données botaniques	28
1.3.2.2. Données phytochimiques et pharmacologiques	32

1.1. Les plantes médicinales

Pourquoi se soigner par les plantes ? Intuitivement nous sommes tous capables de répondre à cette question. Parce que se soigner par les plantes, c'est se soigner de manière naturelle, en respectant son corps et surtout son cerveau ; parce que cela est plus doux et plus profond à la fois.

La phytothérapie, du grec *Phyto* et *Therapeia*, est l'art de se soigner par les plantes ; mais pas n'importe quelles plantes, les plantes médicinales. Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles. Une telle définition devrait inclure, d'après **Sofowora (2010)**, les cas suivants :

- Plantes ou parties de plantes à usage médicinal dans des préparations galéniques (décoctions, infusions, etc.), comme l'écorce de bourdaine ;
- Plantes utilisées pour l'extraction des substances pures soit pour usage médicinal direct ou pour l'hémi-synthèse de composés médicinaux (par exemple hémi-synthèse d'hormones sexuelles à partir de la diosgénine obtenue de tubercules de *Dioscorea*) ;
- Aliments, épices et plantes de parfumerie à usage médicinal, comme le gingembre ;
- Plantes microscopiques (champignons, actinomycètes) employées pour l'isolement de produits pharmaceutiques, en particulier d'antibiotiques. On peut citer l'ergot du seigle (*Claviceps purpurea*) ou *Streptomyces griseus* ;
- Plantes à fibres (comme le coton, le lin, le jute) utilisées pour la préparation de pansements chirurgicaux.

La phytothérapie est profonde, douce et respectueuse du corps ; tout cela est vrai, mais pourquoi ?

L'action de la plante selon **Scimeca** en **2006**, est :

- Pharmacologique et rationnelle, car c'est par la présence de molécules très complexes (les principes actifs) que la plante agit ;
- Systémique et holistique, car une plante n'agit pas sur un seul organe ou une seule cellule mais sur un organisme entier ;
- Globale par cette notion de *totum* qui est le terme propre à la phytothérapie pour indiquer que dans une plante, tout agit. La plante entière a toujours une action plus douce, plus large et plus profonde que la substance dite active isolée (**Tétau, 2005**).

1.1.1. Aperçu historique sur l'utilisation des plantes médicinales

Les propriétés des plantes médicinales figurent dans de nombreux livres et permettent à tout un chacun de choisir en connaissance de cause la plante dont il a besoin. Le plus souvent, ces propriétés n'ont pas été découvertes par les recherches modernes, mais font partie d'un savoir ancien, accumulé pendant plusieurs millénaires.

Dès son apparition, il y a 3 millions d'années seulement, l'homme a utilisé les plantes à d'autres fins que de la nourriture. Que la plante soit comestible ou toxique, qu'elle serve à tuer le gibier et l'ennemi ou à soigner, l'homme a découvert par une suite d'échecs et de réussites, l'utilisation des plantes pour son mieux-être.

Le tout premier témoignage de l'utilisation des plantes médicinales figure sur un papyrus égyptien, daté d'environ 2 000 ans avant J.-C. Ainsi, en Inde et en Chine, la médecine faisait amplement appel aux herbes. Plus tard, la Grèce antique se distingue avec les 1^{ers} thérapeutes, comme HIPPOCRATE. Ce médecin dispensa son enseignement sur l'île de Cos, il fut le 1^{er} à mentionner des observations cliniques avec plus de 230 plantes. Puis les plantes furent classées par degré de toxicité, et THEOPHRASTE devint le botaniste le plus marquant de l'antiquité. Il nomma plus de 500 plantes et se livra à des expérimentations... Par la suite, DIOSCORIDE (herboriste grec) écrivit un recueil de plus de 500 plantes en 5 volumes. Cet ouvrage connu sous le nom de « *Materia Medica* », fut publié pour la première fois en 1478 par l'imprimeur de Venise Aldó Manuce. Il constitua la référence principale en Europe jusqu'au XVIII^e siècle, en rassemblant environ 600 plantes (genévrier, orme, pivoine, bardane, etc.). Une illustration est fournie avec le « *Juliania Anicia Codex* », qui présente des descriptions brèves de plantes, mais surtout des données concernant l'utilisation pratique de végétaux, le type d'indications et les médications. Au moyen âge, les écrits de GALIEN devinrent populaires. Beaucoup de ses 500 livres et manuscrits furent détruits par un incendie, mais quelque 80 œuvres furent sauvées des flammes. Aujourd'hui, GALIEN est considéré comme l'un des médecins les plus renommés de l'Antiquité après HIPPOCRATE. Il traitait les maladies essentiellement par les plantes médicinales, et ceux qui suivaient ses méthodes constituèrent une secte appelée les « Eclectiques » (Callery, 1998 ; Wichtl et Anton, 1999 ; Sofowora, 2010).

Partout dans le monde, les plantes médicinales furent utilisées : les MAYAS, AZTEQUES et INCAS utilisaient la salsepareille, le tabac et le poivre. Puis vint la période du commerce entre l'Europe, le Moyen-Orient, l'Inde et l'Asie... Le développement des explorations furent à l'origine de découvertes importantes.

En 1692, paraissait la première « Pharmacopée Royale Galénique et Chimique » rédigée par M. CHARAS, véritable recueil de préparations médicamenteuses. En 1778, le premier diplôme d'herboriste était décerné par la Faculté de Médecine de Paris. Le premier codex français parut en 1818 et les éditions se sont succédées jusqu'à la parution de la dernière édition de la pharmacopée européenne par **Wichtl et Anton** en **1999**.

Aujourd'hui, des progrès immenses ont été réalisés par des pharmaciens et des chimistes qui ont étudié des plantes de notre environnement et d'autres plantes exotiques. Les secrets des remèdes d'autrefois commencent à être découverts. Prenons l'exemple du pavot, la morphine fut isolée par SERTÜRNER en 1817, la codéine par ROBIQUET en 1832 (il isola aussi l'asparagine de l'asperge), et la papavérine par MERCK en 1848. Bien entendu, les structures chimiques complètes de ces composés furent élucidées bien plus tard.

L'usage des plantes médicinales totales tombe peu à peu en désuétude au profit du principe actif isolé. On pense ainsi obtenir une action plus nette, plus rapide, mieux ciblée. L'industrie chimique intervient en inventant par synthèse des dérivés toujours plus actifs mais aussi plus toxiques. Il faut attendre le XX^{ème} siècle pour que des médecins, désabusés par la toxicité de ces nouveaux remèdes, reviennent à l'usage des plantes entières, bien connues de la médecine populaire. Les travaux de l'école française de phytothérapie, avec, en tête le merveilleux Dr. Henri LECLERC, ont réactualisé l'emploi des plantes « naturelles » en médecine (**Scimeca et Tétau, 2005**). Cela exprime bien le désir des patients qui veulent être soignés efficacement par des méthodes non agressives, naturelles, épaulant les forces de la nature. La médecine par les plantes a un avenir admirable et de haut rang. Si elle ne peut tout soigner, elle peut soigner beaucoup (**Tétau, 2005**).

1.1.2. De la plante au médicament

Comment extraire ce que la plante peut nous apporter afin d'en faire un médicament ?

Les connaissances empiriques accumulées depuis des milliers d'années ont permis la sélection de plantes pour soigner diverses maladies. Certains de ces usages anciens sont aujourd'hui vérifiés par des études scientifiques et ont conduit à l'isolement de nouveaux principes actifs et/ou à la mise sur le marché de médicaments à base de plantes ou d'extraits standardisés. De la plante entière ou partie de plante utilisée au départ, on a ensuite utilisé des extraits totaux (obtenus par décoction, macération, infusion ou percolation avec différents solvants) liquides ou secs pour faciliter la prise et standardiser les traitements. Les recherches pharmacologiques et chimiques menées pour identifier les effets de ces extraits et en isoler les molécules actives ont mené à la préparation, souvent par les apothicaires de

l'époque, de mélanges de constituants actifs, puis à la purification et à la détermination de structure des composés les plus actifs qui ont alors été commercialisés sous forme purifiée (**Figure 1**) (**Quetin-Leclercq, 2002**). Ces molécules naturelles ont ensuite servi de modèles pour la synthèse ou l'hémi-synthèse de nouveaux médicaments plus spécifiques, plus actifs, présentant moins d'effets secondaires ou plus facilement brevetables.

Parmi les médicaments les plus utiles en médecine et qui ont été isolés récemment de plantes, on se doit de citer le paclitaxel (taxol), un antitumoral isolé de l'écorce de l'if du pacifique (*Taxus brevifolia*), ainsi que l'artémisinine, un antipaludique isolé d'une plante chinoise (*Artemisia annua*) (**Graham et Depovere, 2002**).

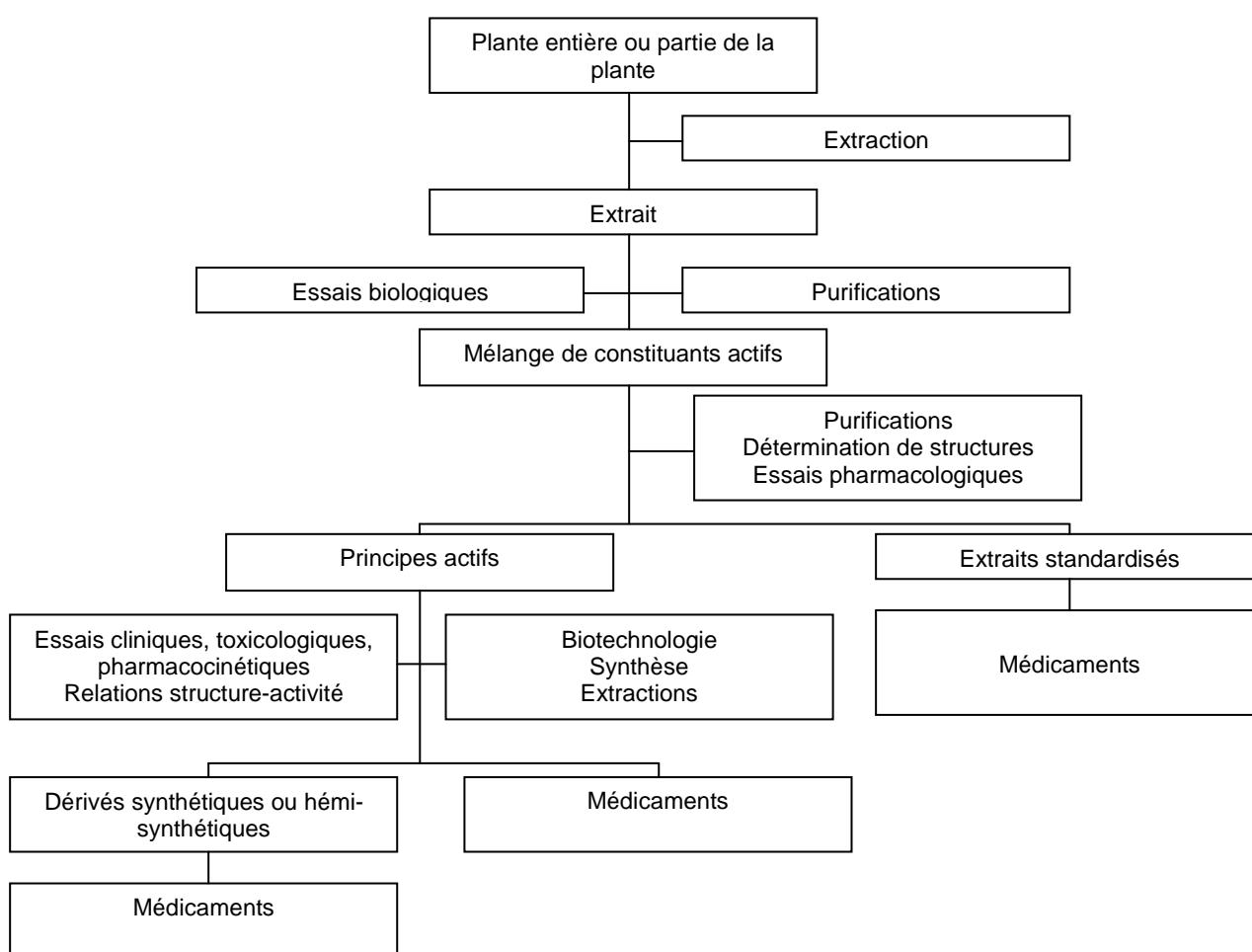


Figure 1. De la plante au médicament (**Quetin-Leclercq, 2002**)

De la molécule au médicament, les étapes sont nombreuses, les risques d'échec augmentent au fur et à mesure que l'on approche des derniers tests cliniques : à partir du principe actif qui constitue la découverte et qui pourra être breveté (durée de validité du brevet : 20 ans), des premiers tests d'affinité, de sélectivité et de toxicité, de la mise au point

d'une synthèse industrielle efficace et reproductible aux tests précliniques puis cliniques, il se passera 10 à 15 ans. L'investissement nécessaire varie de 500 millions à 1 milliard d'euros, avec une probabilité d'échec proche de 95 à 99% (**Albericio, 2010**). Ces difficultés techniques peuvent être surmontées par la mise en place de méthodes adaptées et de nouvelles stratégies de recherche (**Koehn et Carter, 2005**). Parmi ces stratégies, se trouvent en particulier les « criblages intelligents », par exemple en utilisant des cibles résistantes aux antibiotiques connus pour éviter un « bruit de fond » (**Baltz, 2008**), l'intervention de la robotique par couplage des techniques de séparation par CLHP, d'analyse par spectrométrie de masse ou RMN et de criblage haut-débit (**Shapiro et Gounarides, 1999 ; Isbell et al., 2002 ; Corcoran et Spraul, 2003; Kingston, 2011**), la métabolomique (**Verpoorte et al., 2007**) ou le développement d'outils biologiques comme la métagénomique, qui étudie les gènes et leur fonction dans des échantillons provenant directement de l'environnement, en particulier dans le cas de l'étude des micro-organismes du sol. Cette approche couplée à des techniques de criblage automatisé, permettrait de tester pour une activité biologique de nombreux micro-organismes non encore étudiés (**Handelsman et al., 1998; Mocali et Benedetti, 2010**). Ce type d'outils et de stratégies permettent ainsi à la chimie des substances naturelles de s'inscrire clairement dans le cadre des sciences de pointe, ouvertes vers l'avenir.

1.2. Les substances naturelles viennent du métabolisme secondaire

Les produits naturels constituent une banque de molécules caractérisées par des structures riches, complexes et fort variées que les chimistes auraient bien du mal à synthétiser dans leurs laboratoires (**Graham et Depovere, 2002**). Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides, des acides nucléiques et des hydrates de carbone qui sont généralement inoffensifs, sauf quelques rares protéines toxiques ou des hydrates de carbone immunomodulateurs, et qu'ils sont par conséquent peu intéressants pour ceux qui étudient l'activité médicinale des plantes. De plus, les plantes contiennent une grande variété de composés secondaires dont la fonction est loin de faire l'unanimité (**Small et Catling, 2000**). Leurs rôles sont encore mal connus, mais il est clair qu'ils interviennent de manière interactive dans les relations entre la plante et son environnement : molécules servant à la défense contre des prédateurs ou des agents pathogènes, à la prédation, à l'adaptation de la plante à son environnement (ex : les molécules piégeant les métaux lourds pour que la plante puisse pousser sur un terrain minier), à la communication, etc. Ils sont les éléments essentiels de la coévolution des êtres vivants ce qui explique leur très grande diversité et leur intérêt particulier pour la recherche de nouveaux médicaments. Ils peuvent être classés

en plusieurs grandes familles (**Figure 2**), dont les plus importantes en termes de nombre de structures connues sont les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes, ...), les composés azotés, avec en particulier les alcaloïdes, et les composés terpéniques.

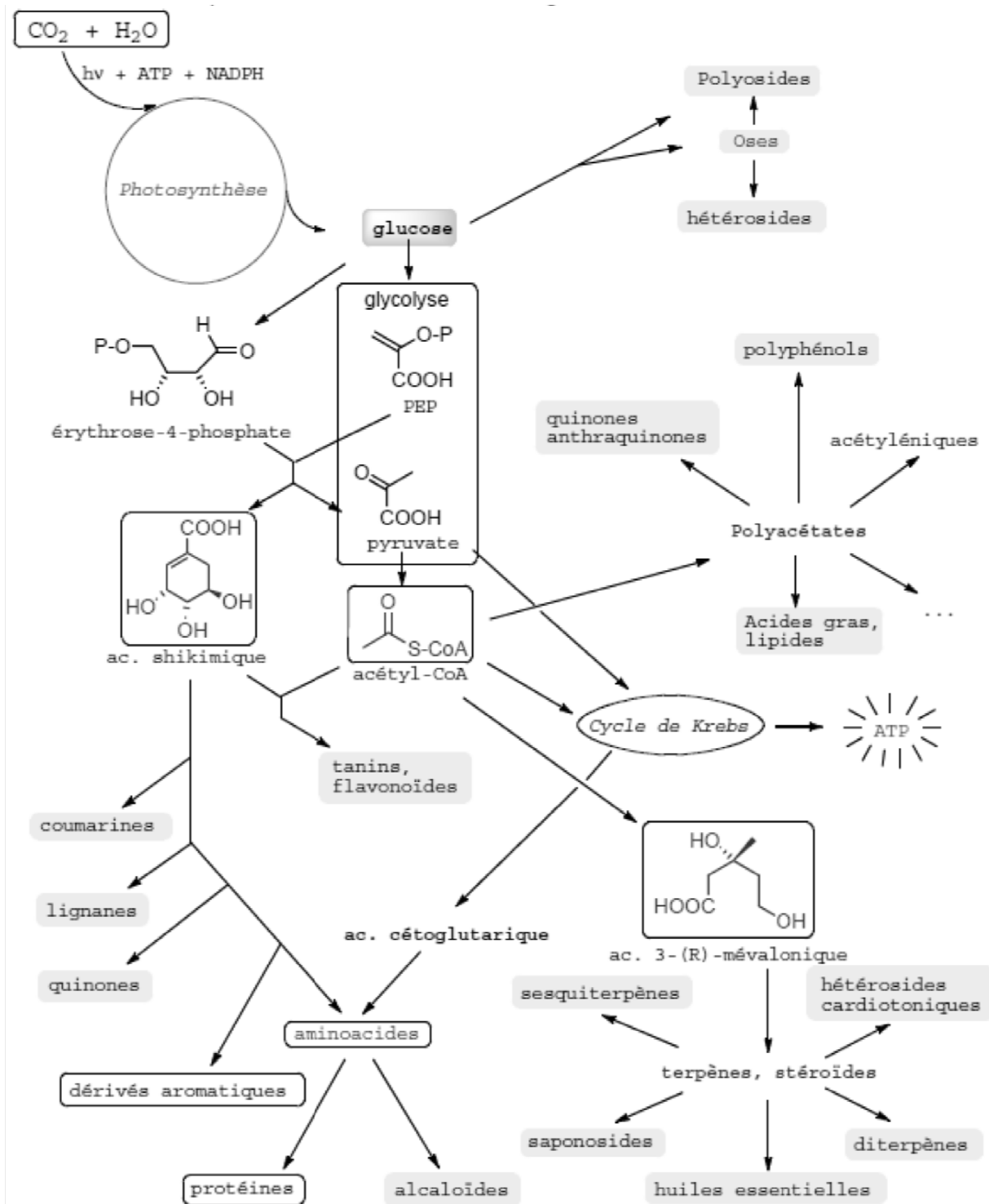


Figure 2. Relations biogénétiques entre les principales classes de métabolites secondaires, sources de principes actifs (Vercauteren, 2011)

1.2.1. Les métabolites secondaires : Une immense diversité de structures chimiques

1.2.1.1. Les composés phénoliques

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux. Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Macheix et al., 2005**). Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse (**Bruneton, 2009**) :

- La voie la plus courante est celle qui, via le shikimate (l'acide shikimique), conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénonés, lignanes et lignines, coumarines, etc. ;
- L'autre voie, par de l'acétate et conduit à des poly- β -cétoesters de longueur variable « les polyacétates » qui engendrent, par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, orcinols, depsides, depsidones, xanthones, quinones, etc.

La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte (flavonoïdes *lato sensu*, stilbènes, pyrones, xanthones, etc.). La participation d'un troisième synthon élémentaire « le mévalonate » est également possible bien que moins fréquente : dérivés mixtes du shikimate et du mévalonate comme certaines quinones ou comme les furano- et pyranocoumarines, composés mixtes acétate mévalonate comme les cannabinoïdes. Dans quelques cas, les trois précurseurs concourent à l'élaboration de la même structure : c'est, entre autres, celui des roténoïdes (**Bruneton, 2009**).

Il est classiquement admis que les dérivés des aminoacides qui conservent l'atome d'azote sont des alcaloïdes ou des substances apparentées (amines aromatiques, bétalaïnes). De la même façon, certains mono-, sesqui- et diterpènes peuvent être partiellement désaturés et posséder un hydroxyle phénolique : ils sont considérés comme des terpènes, l'aromatation n'étant qu'un phénomène secondaire (**Bruneton, 2009**).

a. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone ($C_6-C_3-C_6$), correspondant à la structure du diphenylpropane (**Santos-Buelga et Scalbert, 2000**). Deux cycles aromatiques (A et B) sont liés par une chaîne de 3 carbones formant un hétérocycle oxygéné (C) (**Figure 3**).

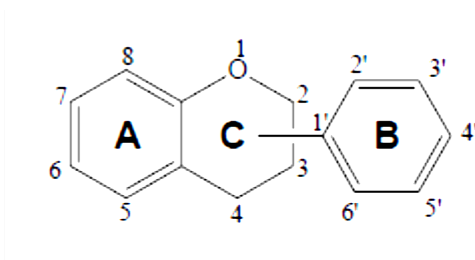
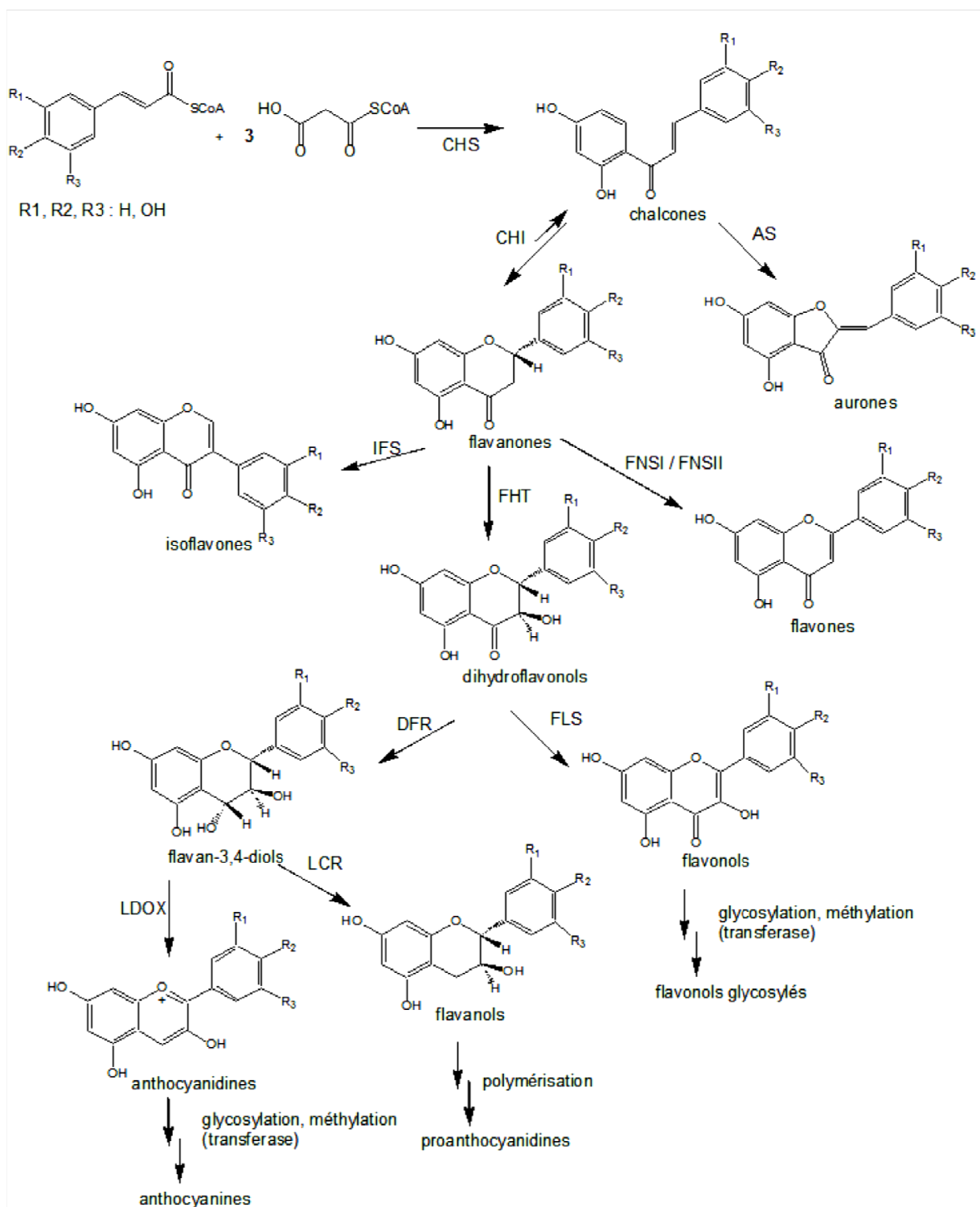


Figure 3. Squelette moléculaire de base des flavonoïdes avec la numération classique

L'ensemble des flavonoïdes comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique. C'est d'abord la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. On distingue alors les 4-oxoflavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones), les flavanols et les proanthocyanidines, les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (**Crozier et al., 2009**).

Tous les flavonoïdes sont formés via un intermédiaire commun : la 2',4,4',6'-tétrahydroxychalcone (**Figure 4**). Ce précurseur dérive de la condensation de trois molécules d'acétylcoenzyme A, qui correspondront au cycle A, et d'une molécule de 4-hydroxycinnamatecoenzyme A, permettant la formation des cycles B et C. Ce mécanisme est catalysé par la chalcone synthase. La cyclisation de cette chalcone stéréospécifique par la chalcone isomérase forme la (S)-4',5,7-trihydroxyflavanone conduisant au squelette de base des flavonoïdes. Plusieurs enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. Dans chaque classe de flavonoïde, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïde 3'-hydrolase, flavonoïde 3',5'-hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoïde glycosyl transférase), acylation (acyl-CoA transférase) ou polymérisation (**Chebil, 2006**).



AS : aurone synthase, CHI : chalcone isomerase, CHS : chalcone synthase, DFR : dihydroflavonol 4-reductase, FHT : flavanone 3-hydroxylase, FLS : flavonol synthase, FNSI/FNSII : flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : leucoanthocyanidin dioxygenase, LCR : leucoanthocyanidin reductase

Figure 4. Voies de biosynthèse des flavonoïdes (adaptées de **Forkmann et Martens, 2001** ; **Winkel-Shirley, 2002**)

b. Phénols, Acides phénoliques

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques. Certains auteurs sont cependant plus restrictifs : ils n'utilisent le terme d'acide-phénol que pour les dérivés en C₆-C₁ et incluent les dérivés cinnamiques dans le groupe, plus large, des phénylpropanoïdes (Bruneton, 2009).

Phénols simples. Les phénols simples (catéchol, guaïacol, phloroglucinol) sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae), le plus souvent à l'état de glucoside du diphénole (arbutoside) ou de son monométhyléther (Figure 5). Les alkylphénols et leurs depsides, issus du métabolisme d'un poly-β-cétoester, sont caractéristiques des lichens. On connaît également des alcénylphénols (urushiol) et des monoterpènes phénoliques (thymol).

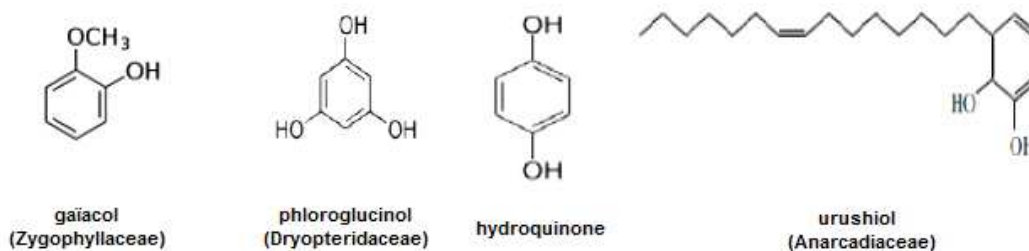


Figure 5. Structures chimiques de quelques phénols simples

Acides-phénols dérivés de l'acide benzoïque. Les acides-phénols en C₆-C₁, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside (Figure 6).

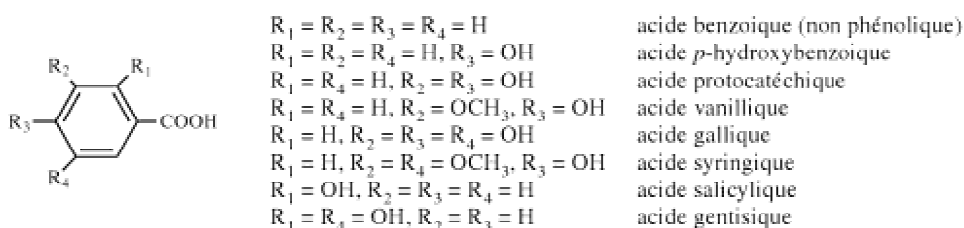


Figure 6. Structures chimiques de quelques acides hydroxybenzoïque (Macheix *et al.*, 2005)

Acides-phénols dérivés de l'acide cinnamique. La figure 7 illustre la structure des principaux acides hydroxycinnamiques (C₆-C₃) présents dans les plantes. Alors que les acides hydroxybenzoïques se présentent majoritairement sous forme libre, les acides hydroxycinnamiques peuvent exister sous une forme estérifiée par l'acide quinique (**Jalal et Collin, 1977; Borchers et al., 2000**). Ils peuvent également être amidifiés (dérivés de la spermidine, de la tyramine ou de la putrescine), ou combinés avec des sucres : esters de glucose (c'est le cas le plus fréquent) ou éthers du glucose (en particulier chez les Apiaceae et les Brassicaceae) (**Bruneton, 2009**).

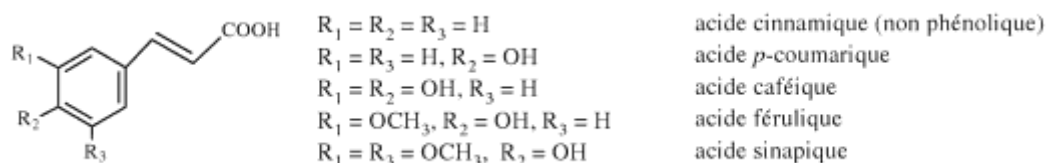


Figure 7. Structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques (**Macheix et al., 2005**)

c. Coumarines

Présentes dans de nombreux végétaux, les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques (**Bruneton, 2009**). Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexine (**Vivas de Gaulejac, 2001**). La figure 8 présente la structure de quelques coumarines (ex. : Aesculétine, Scopolétine, Umbelliférone, ...) et glycosides de coumarines (ex. : Aesculine, Scopoline, ...). Ces composés sont connus pour leurs propriétés anti-coagulantes (**Vivas de Gaulejac, 2001**).

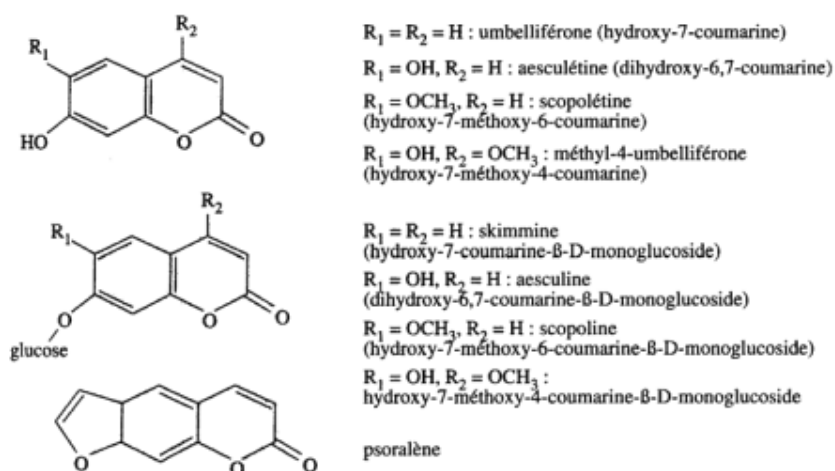


Figure 8. Structures chimiques de quelques coumarines (**Vivas de Gaulejac, 2002**)

d. Lignanes, néolignanes et composés apparentés

Les lignanes résultent de la condensation d'unités phénylpropaniques (**Figure 9**). Quatre groupes peuvent être considérés : les lignanes (liaison entre deux carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du phénylpropane), les néolignanes (un seul carbone β est en jeu), les "oligomères", (condensation de 2 à 5 unités phénylpropaniques) et enfin les norlignanes avec un squelette en C₁₇. Les néolignanes sont surtout présents chez les espèces primitives (Magnoliales, Pipérales) alors que les lignanes se trouvent souvent dans le bois des gymnospermes et dans les tissus soumis à lignification chez les angiospermes (**Krief, 2003**).

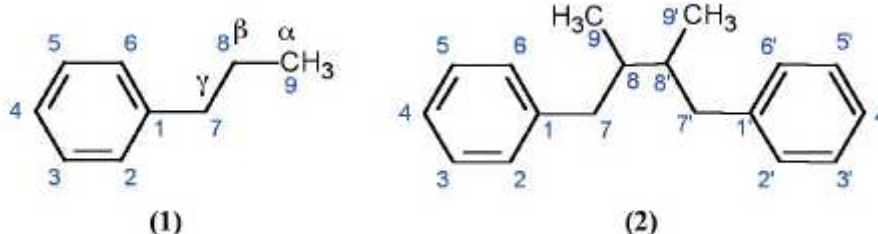


Figure 9. Structure et numération des atomes de carbone du phénylpropane **(1)** et des lignanes **(2)** (liaison β - β' ou 8,8') (**Moss, 2000**)

e. Anthocyanosides

Les anthocyanes ou pigments anthocyaniques sont des composés hydrosolubles, de teinte rouge, violette ou bleue, qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles. Les anthocyanes sont présents dans la nature uniquement sous forme d'hétérosides appelés anthocyanosides. Ces pigments sont très répandus dans le règne végétal et proche des flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et des propriétés pharmacologiques (**Catier et Roux, 2007**). Leur structure de base (**Figure 10**) est caractérisée par un noyau « flavon » généralement glucosylé en position C₃ (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Les anthocyanosides, dont les couleurs vives attirent insectes et oiseaux, jouent un rôle majeur dans la pollinisation et la dispersion des graines. Un fort pouvoir colorant et l'absence de toxicité font de ces hétérosides des colorants naturels susceptibles de remplacer, dans l'industrie alimentaire, les colorants synthétiques : leur innocuité et leur acceptabilité par le consommateur compensent leur instabilité (pH, température, lumière) et leur coût de production parfois élevé (**Bruneton, 2009**).

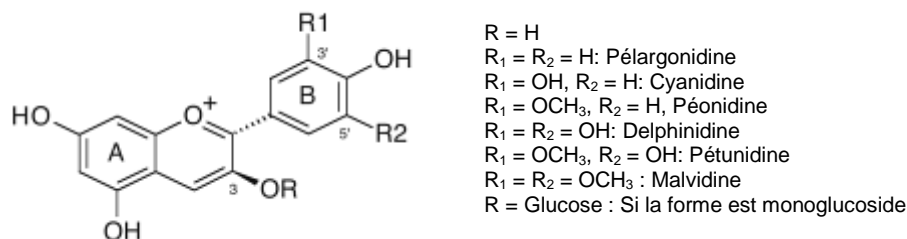


Figure 10. Structures chimiques de quelques anthocyanidines (Collin et Couzet, 2011)

f. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant.

Très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelquefois combinés aux protéines et aux alcaloïdes (Catier et Roux, 2007).

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénique :

Tanins hydrolysables : Ce sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide-phénol (Figure 11). Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des *tanins galliques*, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation (déhydrohexahydroxydiphénique = DHHDP ; acide chébulique) dans le cas des tanins classiquement (mais improprement) dénommés *tanins ellagiques* (Bruneton, 2009).

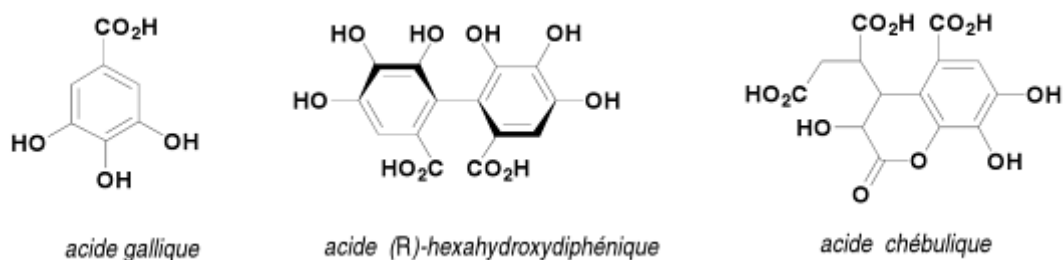


Figure 11. Structures chimiques de quelques acides phénols (Bruneton, 2009)

Tanins condensés (Proanthocyanidols) : Ce sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols (**Figure 12**) liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent 4→8 ou 4→6, résultante du couplage entre le C-4 électrophile d'un flavanyle issu d'un flavan-4-ol ou d'un flavan-3,4-diol et une position nucléophile (C-8, plus rarement C-6) d'une autre unité, généralement un flavan-3-ol (**Bruneton, 2009**).

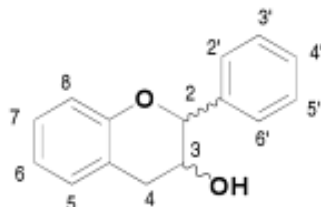


Figure 12. Squelette moléculaire d'un flavan-3-ol (**Bruneton, 2009**)

g. Quinones

Les quinones sont des composés oxygénés qui résultent de l'oxydation de dérivés aromatiques caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (**Figure 13**). La dione peut être conjuguée aux doubles liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé : naphthalène (naphtoquinones), anthracène (anthraquinones), naphtodianthrène (naphtodianthrone)... (**Krief, 2003 ; Bruneton, 2009**).

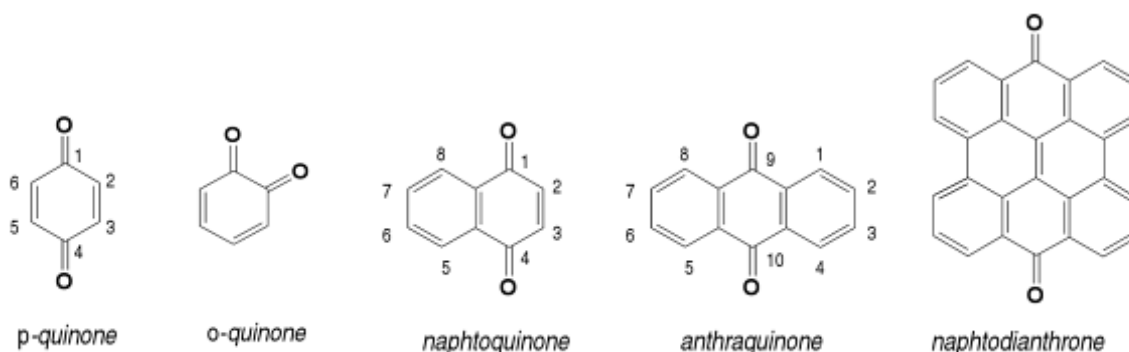
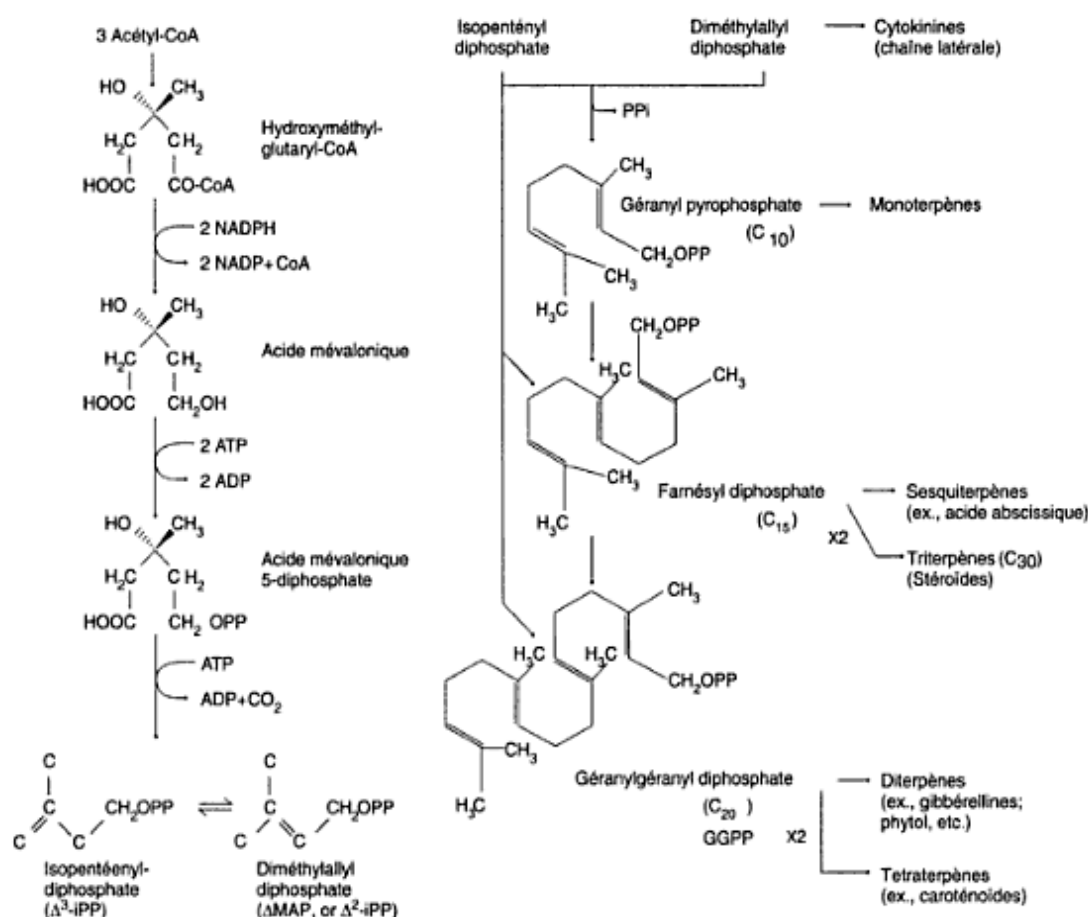


Figure 13. Quelques motifs quinoniques (**Bruneton, 2009**)

1.2.1.2. Les terpénoïdes et les stéroïdes

Elaborés à partir des mêmes précurseurs, les terpénoïdes et les stéroïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux (**Bruneton, 2009**). Les terpénoïdes sont des substances généralement lipophiles, formés par la réunion

d'unités pyrophosphate isopenténoïdes à cinq carbones provenant de la voie de l'acide mévalonique (**Judd et al., 2002 ; Hopkins, 2003**). Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui composent la chaîne ainsi que dans les divers modes d'assemblage (**Figure 14**). La formation de structures cycliques, l'addition de fonctions comprenant de l'oxygène et la conjugaison avec des sucres ou d'autres molécules peuvent rendre leurs structures complexes. La famille des terpènes comprend des hormones (gibbérellines et acide abscissique), des pigments caroténoïdes (carotène et xanthophylle), des stérols (ex. ergostérol, sitostérol, cholestérol), des dérivés de stérols (ex. des hétérosides digitaliques), le latex (qui est à la base du caoutchouc naturel) ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur goût (**Hopkins, 2003**).



A gauche : Synthèse de l'isopentényldiphosphate à partir de l'acétyl-CoA. A droite : Addition séquentielle d'unités d'isopentényldiphosphate produisant des terpènes dont le nombre d'atomes de carbone va en augmentant. Tous les terpènes sont des multiples d'unités à 5 atomes de carbone.

Figure 14. Voie de l'acide mévalonique et synthèse des terpénoïdes (**Hopkins, 2003**)

Les **monoterpénoïdes** (**Figure 15**) et les **sesquiterpénoïdes** volatils (**Figure 16**), substances à 10 et 15 carbones, sont les principaux composants des **huiles essentielles**

caractéristiques des Magnoliales, des Laurales, des Illiciales et des Pipérales, ainsi que de clades sans relations directes avec ces ordres, comme les Myrtaceae, les Lamiaceae, les Verbenaceae et les Asteraceae. Ces composés ne se trouvent pas seulement dans les tissus végétatifs (dans les cellules sphériques ou dans différents canaux ou lacunes situés dans les tissus parenchymateux), mais aussi dans les glandes florales odoriférantes (où ils sont libérés et fonctionnent souvent comme attractifs floraux).

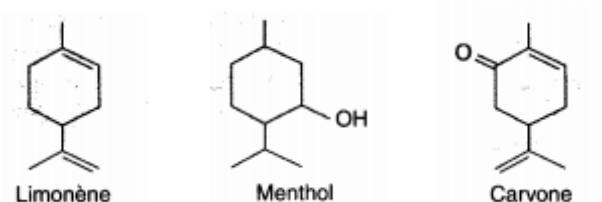


Figure 15. Exemples de monoterpènes (Turner *et al.*, 1999)

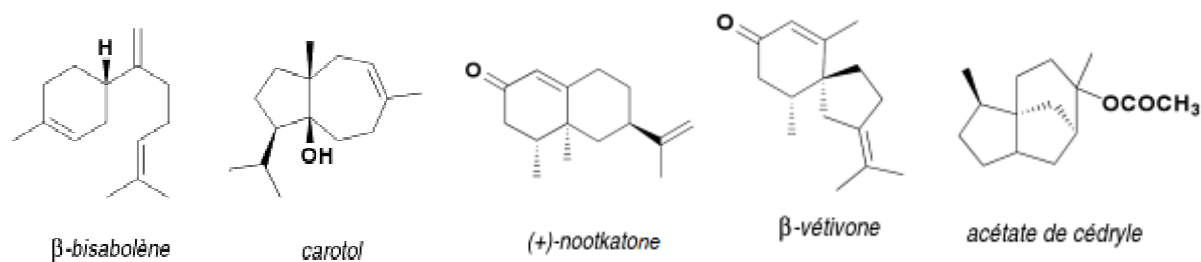


Figure 16. Quelques exemples de sesquiterpènes caractéristiques des huiles essentielles (Bruneton, 2009)

Un autre type de terpénoïdes, les **lactones sesquiterpéniques** (Figure 17), est surtout connu chez les Asteraceae (où ces lactones sont diversifiés et utiles pour la taxonomie), mais on le trouve aussi dans quelques autres familles, comme les Apiaceae, les Magnoliaceae et les Lauraceae.

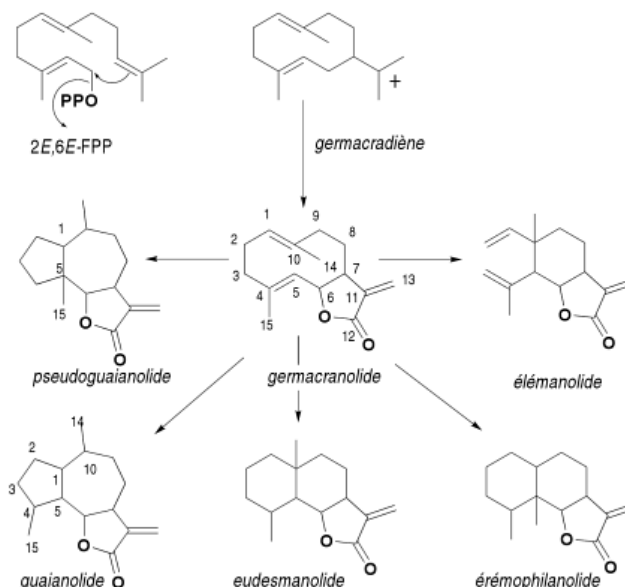


Figure 17. Filiation (schématique) des principaux groupes de lactones sesquiterpéniques (Bruneton, 2009)

Différents **diterpénoïdes** (20 carbones), **triterpènes** (30 carbones) et **stéroïdes** (triterpènes basés sur un cycle cyclopentane perhydrophénanthrène) sont très répandus et ils ont également une importance systématique (**Figure 18**). Le triterpénoïde, bétuline se retrouve dans l'écorce des bouleaux blancs (*Betula papyrifera* et espèces voisines) ; il est imperméable, très inflammable et pratiquement inconnu en dehors de ce groupe. Les **saponines triterpéniques** se rencontrent chez les Apiaceae et les Pittosporaceae et confortent l'hypothèse d'une relation phylogénétique étroite entre ces deux familles. Les **limonoïdes** et les **quassinoïdes**, dérivés de triterpénoïdes apparentés au point de vue de leur biosynthèse, se limitent aux Rutaceae, Meliaceae et Simaroubaceae. Chez les Sapindales ; les **quassinoïdes** constituent une synapomorphie propre aux Simaroubaceae. Les **cardénolides** sont des glycosides très toxiques d'un type de stéroïde à 23 carbones, présents chez les Ranunculaceae, les Euphorbiaceae, les Apocynaceae, les Liliaceae et les Plantaginaceae.

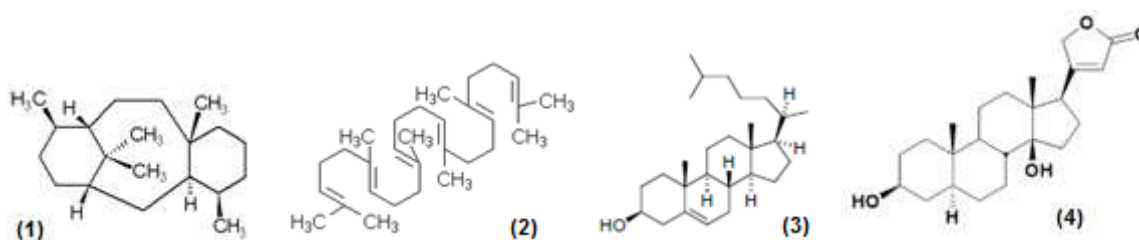


Figure 18. Exemples de structures : (1) Taxane (diterpène) ; (2) Squalène (triterpène) ; (3) Cholesterol (stéroïde) ; (4) Cardénolides (Bruneton, 2009)

Les **iridoïdes** (Figure 19) sont des dérivés monoterpénoïdes à 9 ou 10 carbones généralement présents sous forme de glycosides unis par un oxygène. On rencontre des iridoïdes dans beaucoup de familles du clade des astéridées, et les types d'iridoïdes ont été utilisés pour confirmer les relations au sein de ce groupe. Les **séco-iridoïdes**, par exemple, type chimiquement dérivé d'une molécule iridoïde dépourvue de cycle carbocyclique, existent chez les Gentianales, les Dipsacales et de nombreuses familles de Cornales et d'Astérales. Par contre, les **iridoïdes carbocycliques** à deux cycles, dont l'un est formé exclusivement de carbone, sont caractéristiques des Lamiales (à l'exception des Oleaceae). La présence d'iridoïdes chez les Ericales et les Cornales prouve que ces taxons appartiennent effectivement au clade des asteridées, bien qu'ils aient été fréquemment exclus de ce groupe (Judd *et al.*, 2002).

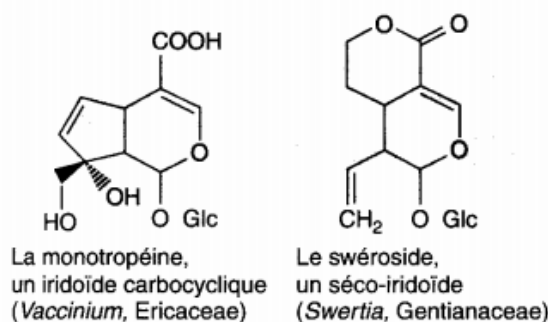


Figure 19. Exemples de quelques iridoïdes (Judd *et al.*, 2002)

1.2.1.3. Les alcaloïdes

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. MEISNER au début du XIX^{ème} siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, comme des *alcalis* (de l'arabe *al kaly*, la soude et du grec *eidōs*, l'aspect) (Bruneton, 2009). Il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels.

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 » (Zenk et Juenger, 2007). Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (Roberts et Wink 1998 ; Stöckigt *et al.*, 2002).

On distingue généralement :

- Les alcaloïdes vrais, qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle ;
- Les proto-alcaloïdes, qui dérivent d'acides aminés, dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique ;
- Les pseudo-alcaloïdes, qui présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés.

Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie, atropine) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens (quinine, chloroquinine) ou agents anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine). La figure ci-dessous présente quelques structures alcaloïdiques à usage thérapeutique.

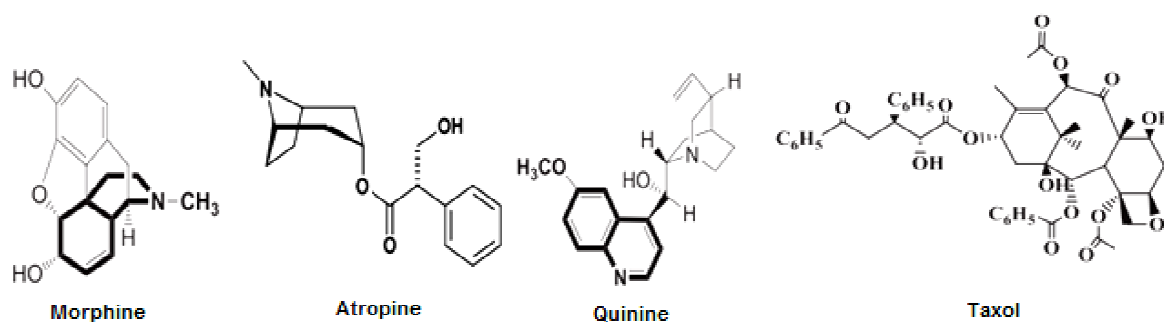


Figure 20. Exemples de structures alcaloïdiques (Badiaga, 2011)

1.2.2. Les composés phénoliques et la santé de l'homme

Des recherches importantes sur les métabolites secondaires sont en cours, compte tenu des bénéfices considérables qu'elles permettent d'escompter, mais aussi des dangers que ces substances comportent pour la santé des hommes.

Comme cela a déjà été signalé, les très nombreuses variations chimiques simples (hydroxylations, méthylations, glycosylations, acétylations, etc..) autour des structures de base (exemples de l'acide caféique, du kaempférol ou de la quercétine) conduisent à une énorme diversité des composés phénoliques et en particulier des flavonoïdes. L'activité biologique de ces molécules et des plantes médicinales qui les accumulent peut varier fortement avec de petits changements structuraux qui entraînent souvent des modifications

des interactions moléculaires avec l'eau, les protéines ou les lipides. Dans la plupart des cas, qu'il s'agisse de préparations brutes ou de fractions purifiées, l'action pharmacologique des composés phénoliques est associée à deux propriétés : d'une part, leur capacité à se lier aux protéines (propriété particulièrement marquée pour le groupe des tanins), ce qui peut conduire à l'inhibition d'activités enzymatiques (lipoxygénase, peroxydase, xanthine oxydase, glucosidase, galactosidase,...) et d'autre part, leur caractère antioxydant qui permet de neutraliser les formes activées de l'oxygène ou les radicaux libres à caractère toxique issus de la peroxydation lipidique (**Macheix et al., 2005**). Les formes activées de l'oxygène sont pour la plupart des radicaux chimiques dérivés de l'oxygène, capables d'attaquer l'ADN, les enzymes, les protéines, les membranes cellulaires, etc. Ces attaques peuvent être responsables de problèmes lors de la réplication de l'ADN entraînant mutations et cancers, de perturbations au sein des cellules qui peuvent conduire à leur mort, de la destruction des membranes cellulaires ; ceci peut mener au durcissement et à l'épaississement des artères mais aussi à des crises cardiaques, de la détérioration du collagène et donc à la rigidité des tissus (**Leitao, 2011**).

Il ne peut être question ici de rentrer dans le détail des multiples interventions des composés phénoliques dans la santé humaine. Nous indiquerons, dans le **Tableau 1**, quelques points particulièrement importants ou qui sont actuellement en évolution rapide et qui présentent un grand intérêt pour la valorisation économique des composés phénoliques :

Tableau 1. Quelques exemples de sources végétales riches en composés phénoliques connus pour leurs effets thérapeutiques (**Macheix et al., 2005**)

	Principaux composés	Activités biologiques principales
Ginkgo (feuilles) <i>Ginkgo biloba</i> L.	Flavonols: mono, di et triglycosides du kaempférol, de la quercétine et de l'isorhamnétine. Aglycones de flavonols et flavones.	Effet antioxydant Action neuroprotectrice Action positive sur la circulation cérébrale Action anticancéreuse
Soja (jeunes pousses) <i>Glycine max</i> L.	Phytoestrogènes du groupe des isoflavonoïdes (génistéine, daidzéine et glycitéine et leurs dérivés glycosylés et acylés)	Troubles de la ménopause Diminution du cholestérol sanguin Protection contre les accidents cardiovasculaires Action anticancéreuse
Lin (graines) <i>Linum sp.</i>	Phytoestrogènes du groupe des lignanes	Prévention des accidents coronariens
Houblon (cônes floraux) <i>Humulus lupulus</i> L.	Phytoestrogène : 8-prénylnaringénine Proanthocyanidines (dérivés de la catéchine, de l'épicatéchine, de l'épigallocatechine)	Action oestrogénique Effet antioxydant
Pin maritime (écorce) <i>Pinus maritima</i> L.	Proanthocyanidines à base de catéchine et d'épicatéchine Acides benzoïques et hydroxycinnamiques libres et glycosylés	Effet antioxydant Anti-inflammatoire Inhibition de l'agrégation des plaquettes sanguines

Raisin (pépins et vin) <i>Vitis vinifera</i> L.	Catéchine, épicatechine Proanthocyanidines oligomères Tannins condensés	Effet antioxydant Protection contre les affections cardiovasculaires
Raisin, vin rouge	Resvératrol	Diminution de l'agrégation des plaquettes sanguines Action anticancéreuse
<i>Podophyllum peltatum</i> L.	Podophyllotoxine (lignane)	Action anticancéreuse et antivirale
Trèfle des prés (jeunes pousses) <i>Trifolium pratense</i> L.	Isoflavones (formononétine, biochanine A)	Action phytoestrogénique voisine de celle du soja
Luzerne <i>Medicago sativa</i> L.	Coumestrol	Propriétés oestrogéniques
Agrumes (fruits) <i>Citrus</i> sp.	O- et C-glycosides de flavones et flavonones (naringine, diosmine, hespéridine) Flavones polyméthoxylées	Action anti-inflammatoire Action anticancéreuse Augmentation du tonus veineux

1.3. Monographie des plantes étudiées

Nous avons axé notre travail sur l'étude phytochimique de deux plantes sahariennes : *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) et *Rumex vesicarius* L. (Polygonaceae). Le choix de ces deux plantes a été guidé par leurs usages dans la pharmacopée traditionnelle et par les études chimiques répertoriées dans la littérature. Nous proposons avant de présenter nos résultats de donner une revue de la littérature des travaux antérieurs effectués sur ces deux espèces.

1.3.1. *Anvillea radiata* Coss. & Dur.

1.3.1.1. Données botaniques

a. La famille des Asteraceae

Les Asteraceae (anciennement appelées Compositae) sont une famille cosmopolite comprenant plus de 1 500 genres et plus de 25 000 espèces décrites dont 750 endémiques (suivant les sources), distribuées principalement dans les zones tempérées du globe. C'est l'une des familles les plus importantes des angiospermes, la seconde en importance derrière celle des Orchidaceae.

Cette famille présente des caractères morphologiques divers : végétaux à port extrêmement varié constitués d'arbustes et parfois d'arbrisseaux. Généralement, ce sont des herbes annuelles ou bisannuelles, plus ou moins pérennes. Ils possèdent des lianes herbacées grimpantes ou rampantes. Les feuilles très polymorphes petites sont sans stipules, alternes ou opposées et en rosettes. Elles sont simples, entières ou dentelées et parfois divisées en

plusieurs segments plus ou moins grands. En revanche, cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques : le capitule. Les fleurs serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité élargie d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales appelée involucre. Le fruit est un akène généralement surmonté d'un pappus provenant du calice après la fécondation. Son rôle est de favoriser la dispersion des graines par le vent (anémochorie) (**Barkely et al., 2006**).

b. Caractéristiques de l'espèce *Anvillea radiata* Coss. & Dur.

Plante endémique saharienne, cette arbrisseau (20-50 cm de hauteur) à port ligneux, tomenteux-pubescent est largement répandu dans l'ensemble du Sahara où il colonise les dépressions sablo-argileuses et les pâturages caillouteux. Reconnaisable à ses feuilles vert bleuté en forme de triangle allongé et à bord denté, cette plante se remarque par ses inflorescences disposées en larges capitules jaune orangé et entourées de feuilles rayonnantes qui passent progressivement aux bractées coriaces et piquantes (**Figure 21**). Dégageant, comme la plupart des plantes de la famille des Asteraceae, une forte odeur aromatique. Cette espèce constitue un excellent pâturage pour les chameaux et les chèvres (**Quézel et Santa, 1963 ; Boullard, 2001**).

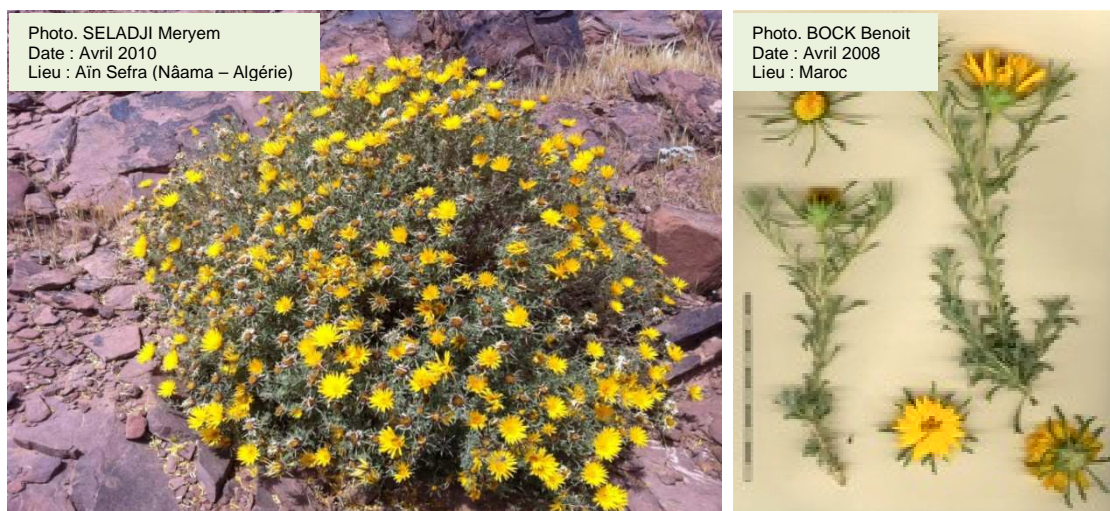


Figure 21. Aspects morphologiques de l'espèce *Anvillea radiata* Coss. & Dur.

D'après **Quézel et Santa (1963) ; Guignard et Dupont (2007)**, la classification qu'occupe *Anvillea radiata* Coss. & Dur. est la suivante :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophytes

Sous Embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Anvillea*

Espèce : *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (= *Anvillea Faurei* Gand.)

Var. *genuina* M. (Quézel et Santa, 1963)

Nom vernaculaire en Arabe : Nougd (Régions de Aïn Sefra, Béchar et Béni Abbès)

c. Utilisations en médecine traditionnelle

Selon la tradition locale, l'infusion (ou la macération) des feuilles et des tiges est utilisée dans le traitement des pathologies broncho-pulmonaires (refroidissement pulmonaire) (Maiza *et al.*, 1993) et digestives (indigestion) (Maiza *et al.*, 1993 ; Chehma, 2006). Les pousses d'*A. radiata*, en infusion à froid ou à chaud, sont utilisés comme remède contre le diabète (Maiza *et al.*, 1993 ; Chehma, 2006).

1.3.1.2. Données phytochimiques et pharmacologiques

Anvillea radiata a fait l'objet de quelques études phytochimique et pharmacologique. En 2004, El Hassany et son équipe ont isolé à partir de la partie aérienne d'*Anvillea radiata* Coss. & Dur. provenant du Maroc un nouveau parthénolide (C₁₅H₁₈O₄) dont la structure est présentée dans la figure 22, avec deux autres germacranolides déjà connues : 9- α -hydroxyparthénolide et parthénolid-9-one.

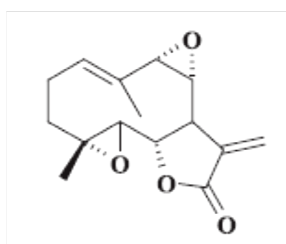


Figure 22. Structure chimique d'un 8- α ,9- α -époxyparthénolide isolé d'*Anvillea radiata* (El Hassany *et al.*, 2004)

Le 9- α -hydroxyparthénolide a été testé pour ces activités biologiques. Il a été démontré que ce composé possède une activité cytotoxique significative contre cinq lignées de cellules

cancéreuses humaines et un pouvoir antimicrobien contre *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* et *Streptococcus C*, selon **El Hassany et al.** en **2004**.

Dendougui et al. en **2006** ont focalisé leurs travaux sur la recherche des flavonoïdes dans la fraction butanolique de la partie aérienne d'*Anvillea radiata* où ils ont identifié 13 composés dont quatre aglycones et neuf flavonol glycosides.

Autres germacranolides: 9- α -hydroxy-1- β ,10- α -époxyparthénolide ; 9- β -hydroxyparthénolide ; 9- β -hydroxy-1- β ,10- α -époxyparthénolide ; *cis*-parthénolide-9-one (**Tyson et al., 1981** ; **Rustaiyan et al., 1986** ; **Sattar et al., 1996** ; **Sattar et Mc Phail, 2000**), des flavonols : quercétine 3-rhamnoglucoside 3', 4'-diméthyléther, 6-méthoxykaempférol 3-galactoside, 6-méthoxykaempférol 3-galactoside 7,4-diméthyléther, kaempférol 3-rhamnoglucoside, spinacétin 3-rhamnoglucoside ont été isolé de l'espèce *Anvillea garcini* (**Ulubelen et al., 1979**).

Enfin, la caractérisation de l'huile essentielle extraite de la partie aérienne d'*Anvillea radiata* Coss. & Dur. a fait l'objet d'une seule étude (**El Hanbali et al., 2007**). L'analyse chimique par CPG/SM de cette huile révèle une prédominance en 6-oxocyclonérolidol (66.6%) et en 6-hydroxycyclonérolidol (11.4%). Ces auteurs rapportent également que ces huiles essentielles possèdent une excellente activité antibactérienne vis-à-vis des microorganismes testés.

A l'issue de cette recherche bibliographique, il est à révéler aisément que les flavonoïdes et les sesquiterpènes lactones constituent principalement la majorité des métabolites secondaires que renferme cette plante. Ces composés possèdent des activités biologiques intéressantes (antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antioxydante, ...) qui sont tout à fait typiques des plantes de la famille des Asteraceae en générale.

1.3.2. *Rumex vesicarius* L.

1.3.2.1. Données botaniques

a. La famille des Polygonaceae

Les Polygonaceae sont une famille cosmopolite regroupant plus de 40 genres et au moins 1100 espèces dans le monde entier, distribuées principalement dans les zones tempérées de l'hémisphère nord. Les principaux genres sont Eriogonum représenté par 240 espèces, Rumex (200 espèces), Polygonum (150 espèces), Persicaria (150 espèces) et Coccoloba (120 espèces) (**Judd et al., 2002**).

Les polygonaceae constituent une famille clairement monophylétique et aisément identifiable (Judd *et al.*, 2002). Elles sont annuelles ou le plus souvent vivaces par un appareil souterrain tubérifié. Ce sont des herbes – parfois rampantes comme *Polygonum aviculare* L. la renouée des oiseaux, des lianes telle *Fallopia* (= *Polygonum*) *convolvulus*, la renouée liseron, parfois des arbustes ou des arbres (*Coccoloba*, les raisiniers). Le genre *Muehlenbeckia* possède des rameaux aplatis en cladodes, remplaçant les feuilles réduites à des écailles (Botineau, 2010).

Lorsque ce sont des herbes, elles présentent souvent des nœuds renflés, au niveau desquels sont insérées des feuilles en général alternes et simples ; le plus souvent entières et à nervation pennée, elles sont plus ou moins profondément lobées et à nervation palmée dans le genre *Rheum*. L'une des caractéristiques de cette famille est la présence presque constante d'une ochréa, fine gaine entourant la base de l'entre-nœud supérieur qui résulte de la soudure des stipules avec le pétiole élargi (Figure 23) (Botineau, 2010).



Figure 23. Feuilles de renouée pourvues d'une ochréa (Botineau, 2010)

Les tiges présentent souvent des faisceaux dits surnuméraires, situés dans l'écorce, le péricycle ou la moelle, et qui, de plus, présentent une disposition inverse avec un xylème externe et un phloème interne (Botineau, 2010).

Les inflorescences élémentaires sont de petites cymes bipares ou unipares, pauciflores, qui sont réunies en épis (*Polygonum bistorta* L.), grappes ou panicules. Parfois, un involucre de bractées entoure la base de l'inflorescence (*Eriogonum*) (Botineau, 2010).

Les fleurs des polygonaceae sont menues, à tépales pétaloïdes blancs à rouges, et elles sont pollinisées par des insectes variés, surtout des abeilles et des mouches. Les fleurs de *Rumex* sont pendantes, verdâtres, munies d'un stigmate élargi et lobé, et anémogames. Les fruits sont souvent associés aux tépales persistant qui contribuent à la dissémination par le vent ou par l'eau. Chez *Rumex*, les tépales du verticille interne forment des ailes

membraneuses alors que c'est le verticille externe qui est ailé chez *Triplaris* et *Ruprechtia* (Judd *et al.*, 2002).

Le fruit est un akène trigone, à l'origine du nom donné à la famille. Souvent, il est entouré par les tépales accrescents, constituant alors une samare. La graine possède un albumen amylicé abondant sans péricarpe et l'embryon est généralement périphérique, droit ou courbe (Botineau, 2010).

b. Caractéristiques de l'espèce *Rumex vesicarius* L.

Rumex vesicarius (Figure 24) est une plante herbacée annuelle ou vivace, poussant en touffes après la pluie, atteignant jusqu'à 50 cm de haut. Elle est fortement ramifiée à partir de la base avec de jeunes tiges vertes herbacées devenant brunes et ligneuses avec l'âge. Feuilles alternes, simples ; ochréa en entonnoir, atteignant 8 mm de long ; pétiole aussi long que le limbe ; limbe triangulaire à oblong-triangulaire, atteignant 7 cm x 4 cm, cunéiforme à tronqué à la base, glabre mais avec de petites verrues sur toute sa surface (Grubben et Denton, 2004). Les fleurs forment des panicules denses axillaires ou terminales. Le périanthe est formé de deux verticilles de 3 pièces, les 3 internes sont plus grandes et s'agrandissent dans le fruit formant 3 ailes parcourues de veines rouges. Le fruit est une nucule trigone de 3-5 mm de long, brune (Grubben et Denton, 2004).

Rumex vesicarius est une espèce saharo-arabique qui pousse dans les zones sèches parmi les pierrailles, sur des pentes herbeuses ou caillouteuses, du niveau de la mer jusqu'à 1150 m d'altitude (Grubben et Denton, 2004).



Figure 24. Aspects morphologiques de l'espèce *Rumex vesicarius* L.

D'après **Quézel et Santa (1962)** ; **Guignard et Dupont (2007)**, la classification qu'occupe *Rumex vesicarius* L. est la suivante :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophytes

Classe : Eudicots

Ordre : Caryophyllales

Famille : Polygonaceae

Genre : Rumex

Espèce : *Rumex vesicarius* L.

Nom vernaculaire en Arabe : Hummeida (Région de Ghardaïa)

c. Utilisations en médecine traditionnelle

Les données concernant l'utilisation des Rumex remontent à plus de huit cents ans. Les informations sont en effet riches sur le traitement traditionnel des affections tumorales ou cancéreuses (**Babulka, 2004**). Les emplois des espèces de Rumex dans d'autres affections, les plus citées en emploi thérapeutique sont : arrêt des hémorragies, scorbut, stomatites infectieuses, diarrhées diverses, bilharziose, vers intestinaux, spasmes abdominaux, problèmes gastriques, hémorroïdes, ictère, affections respiratoires, affections rénales, gonorrhée, ulcère syphilitique, infections cutanées, plaies par coupures, abcès, escarres, rhumatismes et tuméfactions, sont recensées dans plus de cinquante sources d'information différentes (médicohistoriques, médecine traditionnelle, ethnopharmacologie). Le traitement de ces affections a été fait sous diverses formes galéniques : parties de plante fraîche, séchée ou cuite, compresses, lotions, onguents à base de graisse ou d'huile, tisane, extraits alcooliques à base de vin, de vinaigre, d'eau de vie, sirop et suppositoires (**Babulka, 2004**).

La médecine populaire roumaine utilise la racine de divers Rumex sous différentes préparations et en particulier dans les affections dermatologiques (**Babulka, 2004**).

La médecine traditionnelle italienne utilise les feuilles et les pousses de l'oseille en pommade sur les plaies et les racines en cataplasme pâteux dans les dermatoses (**Babulka, 2004**).

Au Népal, on mâche des racines fraîches nettoyées de *Rumex hastatus* et le jus de la racine de *Rumex nepalensis* est donné dans le cas des infections à vers intestinaux. En Moyenne-Éthiopie, on propose une décoction de racine de *Rumex abyssinicus* dans les hypotensions, les douleurs d'estomac et les cervicalgies. La même décoction sert aussi comme lotion des zones douloureuses du corps (**Babulka, 2004**).

Dans plusieurs régions du Sahara et du Sahel, *Rumex vesicarius* est consommée comme légume, par exemple en Mauritanie, au Mali et au Soudan. En Inde, elle est considérée

comme aliment de famine et les feuilles sont d'abord bouillies. Elle est broutée par le bétail (**Grubben et Denton, 2004**). En Algérie, elle est utilisée comme légume et plante à salade. Les feuilles fraîches sont consommées, elles ont une saveur caractéristique, vive et un peu amère, rappelant l'épinard, mais avec une acidité d'agrumes due à leur forte teneur en acide oxalique (**Singh, 1973 ; Small et Deutsch, 2001**).

1.3.2.2. Données phytochimiques et pharmacologiques

Depuis des siècles, les divers *Rumex* poussent à l'état sauvage ou sont cultivés à travers le monde. Pourtant, ce groupe de plantes n'a pas éveillé assez l'attention des phytothérapeutes, alors qu'elles contiennent des constituants intéressants qui jouent par ailleurs un rôle important dans le cadre plus large de la phytothérapie.

La phytothérapie utilise avant tout les racines et les rhizomes, ainsi que les fruits et les semences. Les *Rumex* contiennent des principes biologiquement actifs comme les anthraquinones (sous forme libre ou sous forme de glycosides), les flavonoïdes et les tanins. L'effet laxatif est lié aux différentes anthraquinones, mais surtout au rapport entre taux d'anthraquinones et de tanins. En dehors de l'effet laxatif, les expérimentations permettent aussi de reconnaître aux divers *Rumex* des effets antimicrobien, anti-inflammatoire et hémostatique. On ajoutera des anthocyanes aux principes actifs cités ci-dessus (**Babulka, 2004**).

Selon **Al-Rumaih et al. (2002)**, les feuilles de *Rumex vesicarius* contiennent un taux élevé en minéraux suivis par les tiges et les racines. Alfawaz, dans ses travaux portés sur la composition chimique de *Rumex vesicarius*, confirme les résultats trouvés par Al-Rumaih et son équipe et indique que les feuilles sont aussi une bonne source d'acide oxalique, de protéines et d'acide ascorbique, alors qu'elles sont pauvres en lipides et en tocophérol (**Alfawaz, 2006**). Ainsi, Il a été démontré que cette espèce est une bonne source de β -carotène (**Bhaskarachary et al., 1995 ; Bélanger et al., 2010**).

En 2011, El-Hawary et son équipe ont focalisé leurs travaux sur l'identification du profil bioactive de *R. vesicarius*. Treize composés phénoliques, dont 8-C-glucosyl-apigénine, 8-C-glucosyl-lutéoline, 6-C-hexosyl-quercétine, 3-O-rutinosyl-quercétine, 7-O-rhamno-hexosyl-diosmétine, 7-O-rhamno-acétylhexasyl-diosmétine, catéchine, épicatechine, férulohexoside, 6-C-glucosyl-naringénine, gallate d'épicatechine, 6-C-glucosyl-catéchine, et gallate d'épigallocatechine, ont été identifiés dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des feuilles. Ainsi, l'analyse qualitative et quantitative de l'extrait hydro-éthanolique a révélé la richesse de *R. vesicarius* en vitamines (C et E). Ces mêmes auteurs ont déterminé la composition chimique de l'huile essentielle de *Rumex vesicarius* récoltée au Caire (Egypte). La caractérisation de cette huile essentielle par CPG/SM a permis d'identifier vingt six

composés représentant 90.66% de la composition totale. Les composés majoritaires sont : l'oxyde de caryophyllène (13.45%), 6,10,14-triméthyl-2-pentadécane (6.43%), 1,5,5,8-tétraméthyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodéca-3,7-diène (5.9%), et le naphthalène (5.31%). Ainsi, les potentiels antioxydant et hépato-protecteur de l'extrait hydro-éthanolique des différents organes ont été étudiés **(El-Hawary et al., 2011)**.

Les travaux ont ensuite porté sur l'étude des activités antioxydante et antimicrobienne des différentes parties de *R. vesicarius* **(Mostafa et al., 2011 ; Hariprasad et Ramakrishnan, 2011 ; Hariprasad et Ramakrishnan, 2012 ; El-Bakry et al., 2013)**. Une étude plus récente évalue l'effet pharmacologique et la composition chimique des différentes parties de *Rumex vesicarius*. 18 acides aminés, dont on peut citer comme composés majoritaires : la valine, la bêta-aminoisobutyrique, l'arginine, la cystine et l'acide glutamique, ont été identifiés dans les extraits de *R. vesicarius*. L'analyse des composés phénoliques par CLHP révèle la richesse de *R. vesicarius* en pyrogallol (291.40 mg/g), une teneur modérée en pyrocatechine (43.20 mg/g) et une faible teneur en acide *p*-hydroxybenzoïque (4.04 mg/g) ; en acide férulique (8.70 mg/g) et en acide syringique (1.80 mg/g) **(Foda et al., 2013)**. Une bonne activité antibactérienne a été observée pour l'extrait acétate d'éthyle contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Streptococcus faecalis* dont les zones d'inhibition étaient de 17, 15 et 12 mm, respectivement **(Foda et al., 2013)**. En sus, il a été démontré que les grains de pollen de *R. vesicarius* sont allergènes et devrait être utilisé comme prick test **(Foda et al., 2013)**.

A la lecture de ces travaux, il ressort que *Rumex vesicarius* a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques et pharmacologiques, mais aucun travail n'a été réalisé en Algérie.

Chapitre 2.

Stress oxydant et antioxydants

Sommaire

2.1. Généralités	35
2.1.1. Agents du stress oxydant	35
2.1.2. Causes possibles du stress oxydant	35
2.1.3. Maladies liées au stress oxydant	36
2.2. Les conséquences du stress oxydant	36
2.2.1. Les conséquences biochimiques	36
2.2.1.1. La peroxydation lipidique	36
2.2.1.2. Dommages causés à l'ADN	37
2.2.1.3. Dommages causés aux protéines	38
2.3. Mécanismes de défense contre le stress oxydant	39
2.3.1. Action des molécules antioxydantes de petite taille	40
2.3.2. Action des enzymes antioxydantes	40

2.1. Généralités

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (**Favier, 2003**).

2.1.1. Agents du stress oxydant

Les agents responsables du stress oxydant font partie de la famille des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (EROA). La catégorie des espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupe des radicaux libres (radical anion superoxyde O_2^\bullet , radical hydroxyle OH^\bullet ...) et des espèces oxygénées comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le dioxygène singulet 1O_2 , le peroxydinitrite $ONOOH$ et les oxydes d'azote NO^\bullet . Les ERO sont générés en permanence par l'organisme, en quantités limitées, soit en tant que coproduits de la respiration mitochondriale ("déchets"), soit pour remplir une fonction bien précise. Un exemple connu depuis assez longtemps est la fabrication massive de radicaux libres lors de la phagocytose (**Holevinsky et Nelson, 1995**), afin de détruire les tissus des bactéries nuisibles. Des ERO moins réactifs (superoxyde et monoxyde d'azote) servent de médiateurs régulant notamment la vasodilatation capillaire, et sont impliqués dans les communications inter et intracellulaires. Citons enfin l'apoptose (mort programmée des cellules, tumorales en particulier), la fécondation de l'ovule, le fonctionnement de certains neurones... comme autant de processus naturels capitaux qui nécessitent la présence de radicaux libres (**Favier, 2003**).

2.1.2. Causes possibles du stress oxydant

En temps normal, la balance entre oxydants et antioxydants est équilibrée par des systèmes de défense extrêmement fins. En d'autres termes, "stress oxydant" ne signifie pas présence mais excès de ces agents oxydants. Il apparaîtra, soit si la production d'ERO est trop importante pour être régulée (**Dickinson et Forman, 2002**), soit si le système antioxydant est défaillant.

Le premier cas est observé par exemple au sein de cellules qui ont subi une irradiation ou une intoxication aux métaux lourds, et dans tous les processus inflammatoires. Les défaillances du système de régulation peuvent avoir une origine génétique (mauvais codage d'une enzyme antioxydante, par exemple), ou résulter d'une carence nutritionnelle en antioxydants comme les vitamines et les oligo-éléments (mais l'absorption de quantités très

élevées d'antioxydants comme le β -carotène a le même effet carcinogène que les carences en antioxydant (**The alpha tocopherol, betacarotene cancer prevention study group, 1994**), tout étant une question d'équilibre).

2.1.3. Maladies liées au stress oxydant

En général le stress oxydant est la conséquence de plusieurs de ces processus, et il touche un tissu ou un type de cellule en particulier. Les conséquences pathologiques du stress oxydant sont donc aussi nombreuses que variées. Le seul facteur commun favorisant le stress oxydant est l'âge, dans la mesure où le vieillissement affaiblit les réponses antioxydantes et perturbe la respiration mitochondriale (**Sohal et al., 2002**).

Il faut distinguer les maladies dont le stress oxydant est la cause principale, et celles dont l'expression implique celui-ci (toute maladie implique une inflammation, donc un stress oxydant). La première catégorie inclut les rhumatismes, l'arthrite, l'arthrose, la cataracte, le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA), l'œdème pulmonaire... et de façon générale, le vieillissement accéléré de tissus comme la peau. La deuxième catégorie inclut le diabète, la maladie d'Alzheimer, les cancers et les maladies cardiovasculaires (**Montagnier et al., 1998**). Le problème principal est que l'organisme a des difficultés à réguler les phénomènes inflammatoires initiés par exemple par la défense contre une attaque virale ou bactérienne.

2.2. Les conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (**Favier, 2003**).

2.2.1. Les conséquences biochimiques

2.2.1.1. La peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés (ou PUFAs pour « Poly Unsaturated Fatty Acids ») sont très vulnérables à l'attaque des radicaux libres, et en particulier du radical hydroxyle. Celui-ci est suffisamment réactif pour arracher un atome d'hydrogène à un carbone et créer un radical

diène conjugué. Ceci constitue la propagation d'une réaction en chaîne que seule la vitamine E (présente dans la membrane des cellules) peut interrompre (Huang *et al.*, 2002).

La peroxydation lipidique débute par une phase d'**initiation** qui implique l'attaque des espèces réactives (hydroxyles, alcoxydes, peroxydes, oxygène singulet, peroxydinitrite) entraînant l'arrachement d'un hydrogène du PUFA (LH). Ceci aboutit à la formation d'un radical pentadiényl qui après addition avec O₂ donne le radical peroxyde (LOO•). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre PUFA et former un hydroperoxyde (LOOH), c'est la phase dite de **propagation** de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques : les LPO. La réaction en chaîne de la peroxydation lipidique peut être prévenue par la vitamine E (α-tocophérol) intercalée dans la bicouche lipidique des membranes qui joue le rôle de donneur d'hydrogène. En effet, la vitamine E transforme les radicaux peroxydes en hydroperoxydes et met fin à la réaction en chaîne de peroxydation des PUFAs. Cette dernière étape est alors désignée comme phase de **terminaison** (Daum-Badouard, 2006). Ces réactions sont résumées dans la figure ci-dessous.

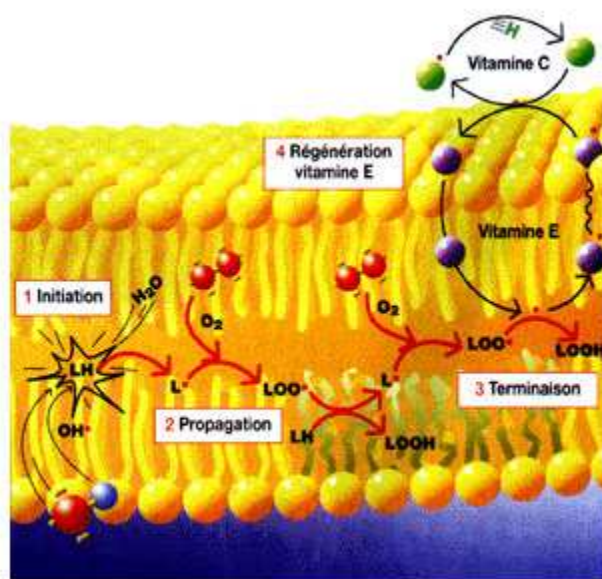


Figure 25. Réactions de la peroxydation lipidique (Daum-Badouard, 2006)

2.2.1.2. Dommages causés à l'ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène (Favier, 2003), et ceci de plusieurs manières différentes (Figure 26) (Cardey, 2007) :

- L'oxydation peut toucher directement les bases de l'ADN, et en particulier la guanine. Les multiples attaques possibles (principalement sur les doubles liaisons) peuvent

engendrer une dizaine de bases modifiées différentes, qui entraîneront des erreurs de réplication de l'ADN.

- Le radical hydroxyle peut également viser la liaison entre une base et le ruban de désoxyribose, créant ainsi des sites "abasiques".
- Le sucre peut être attaqué directement, ce qui provoque des coupures de chaîne "simple brin", ou "double brin" si les deux désoxyriboses sont oxydés au même niveau.
- Enfin, la modification d'une base par un agent oxydant peut modifier sa réactivité, et provoquer le pontage de protéines (ou des adduits d'aldéhydes) sur les nucléotides.

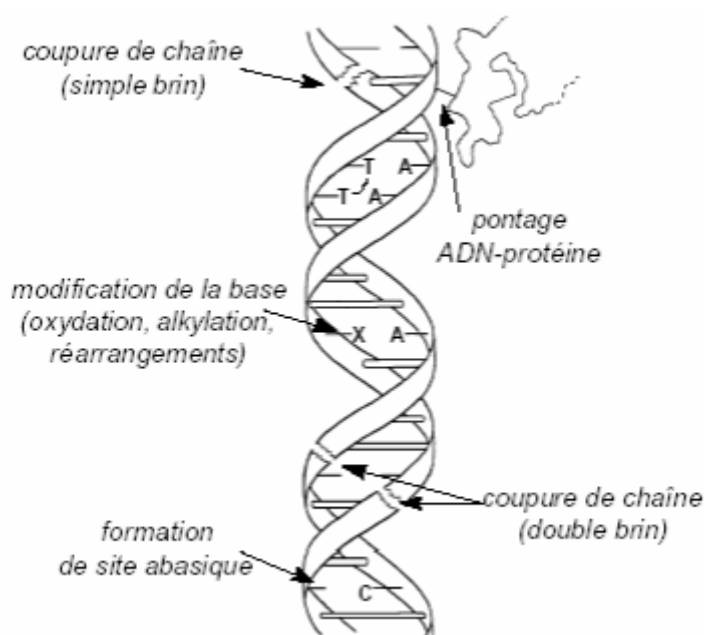


Figure 26. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Daum-Badouard, 2006)

2.2.1.3. Dommages causés aux protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ERO. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Peng *et al.*, 2000 ; Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent être classées en deux catégories :

- celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique ;
- et celles qui entraînent des modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE (4-Hydroxynonenal).

De telles modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées et deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier, 2003).

Les **conséquences biologiques du stress oxydant** seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression (Favier, 2003).

2.3. Mécanismes de défense contre le stress oxydant

Les types de radicaux produits ainsi que leurs lieux de production et de propagation étant variés, la riposte antiradicalaire est polymorphe, à la fois préventive et curative (Figure 27). Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles (Cano et al., 2007).

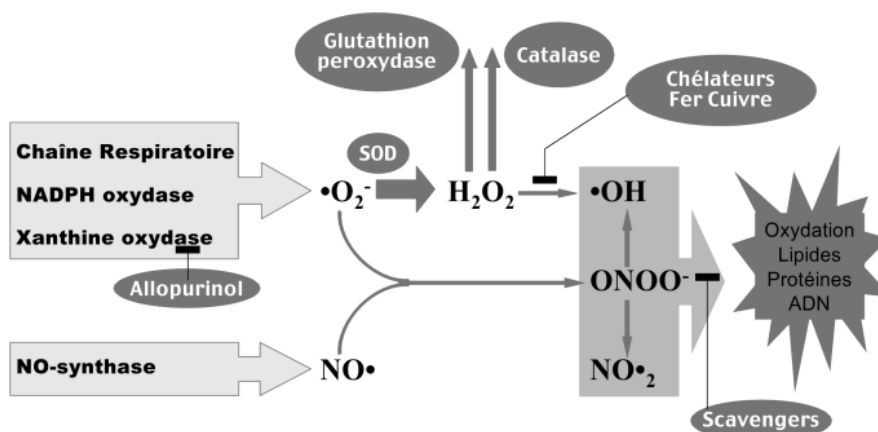


Figure 27. Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène (Cano et al., 2007)

2.3.1. Action des molécules antioxydantes de petite taille

La neutralisation des radicaux libres suit souvent le même principe : une molécule "vulnérable", par exemple un thiol, réduit le radical libre en une molécule ou un ion stable (eau, anion hydroxyde...). La molécule antioxydante devient alors un radical souvent plus stable, moins dangereux, qui peut être réduit par les enzymes ou protéines adaptées. Par exemple, les tocophérols (vitamine E) neutralisent des radicaux libres avant de se faire régénérer par des molécules d'ascorbate (vitamine C). Ces dernières sont ensuite réactivées grâce aux enzymes ascorbate réductases. Les polyphénols, alcaloïdes, phytates (présents dans l'alimentation), les glutarédoxines, thiorédoxines, polyamines, et surtout le tripeptide glutathion (endogènes) font tous partie de la famille des "éboueurs" antioxydants. Le glutathion (GSH) en particulier a un rôle très important dans la mesure où il peut réduire tous les radicaux oxygénés, mais également le peroxyde d'hydrogène. Le cytosol de la plupart des cellules en contient une concentration élevée (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

2.3.2. Action des enzymes antioxydantes

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO (**Garait, 2006**).

Une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD), est chargée de réduire l'anion superoxyde. Son centre actif est un atome de manganèse, ou une association de cuivre et de zinc, en fonction du lieu où œuvrent ces enzymes (mitochondrie, plasma...). Le peroxyde d'hydrogène peut ensuite être dégradé en eau grâce à certaines catalases à cofacteur fer, ou à des glutathion peroxydases (GPx) à sélénium (**Figure 28**). D'autres enzymes comme la thiorédoxine réductase et la glutathion transférase, entre autres, viennent compléter la gamme des enzymes dont le but est de neutraliser les oxydants. La plupart sont spécifiques et ne traitent qu'un seul type de molécule (**Cardey, 2007**).

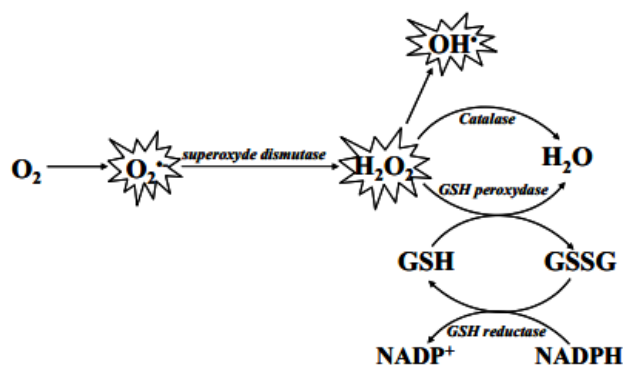


Figure 28. Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (**Garait, 2006**)

Chapitre 3.

Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes

Sommaire

3.1. Généralités	42
3.1.1. Phénotype de résistance (antibiotype)	42
3.1.2. Support génétique de la résistance	42
3.1.2.1. La résistance naturelle	42
3.1.2.2. La résistance acquise	43
3.1.3. Facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance	43
3.1.4. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne	44
3.2. Place des plantes médicinales dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques	45
3.2.1. Les plantes, source naturelle d'antimicrobiens	45
3.2.2. Les plantes, source naturelle d'inhibiteurs de l'efflux bactérien	46
3.2.3. Les plantes, productrices d'analogues des N-acylhomosérine-lactones (AHLs)	47

La résistance bactérienne aux agents antimicrobiens est un problème d'importance croissante en pratique médicale. Si l'apparition des premiers antibiotiques (sulfamides en 1935 puis pénicilline au lendemain de la Seconde Guerre Mondiale) avait suscité un espoir de voir les maladies infectieuses à jamais jugulées, ce dernier fut déçu très rapidement par l'apparition de bactéries devenues résistantes. L'utilisation ultérieure d'autres antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, tétracycline et érythromycine par ordre chronologique d'utilisation) connut une évolution comparable (**Vaubourdolle, 2007**).

A l'heure actuelle, le phénomène de résistance bactérienne est connu pour toutes les familles d'antibiotiques. Il concerne toutes les espèces bactériennes qui pourront développer des mécanismes différents selon leur sensibilité initiale et leurs capacités à exprimer les diverses résistances d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes (**Billing et Sherman, 1998 ; Vaubourdolle, 2007**).

3.1. Généralités

3.1.1. Phénotype de résistance (antibiotique)

La sensibilité ou la résistance à un antibiotique est généralement évaluée au laboratoire par la méthode de l'antibiogramme. Cette technique permet d'apprécier l'activité bactériostatique d'un ou de plusieurs antibiotiques vis-à-vis d'une bactérie. La lecture de l'antibiogramme d'un germe permet de déterminer l'expression phénotypique de la résistance de ce germe à un ensemble d'antibiotiques, et par là même de suspecter le ou les mécanismes de résistance (**Vaubourdolle, 2007**).

3.1.2. Support génétique de la résistance

On distingue deux types de résistance selon leur origine :

3.1.2.1. La résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. C'est ainsi que, les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à passer la membrane externe de leur paroi. Les mycoplasmes, bactéries dépourvues de parois, présentent une résistance naturelle aux β -lactames. Le composant principal de leur paroi est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constitué de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique

(NAM). Dépourvus de cet élément constitutif, les mycoplasmes présentent une résistance intrinsèque aux β -lactames, dont le mode d'action consiste en une inhibition de la synthèse du peptidoglycane (**Normak et Normak, 2002**).

3.1.2.2. La résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes. La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (**Goossens et al., 2006**). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées (**Yagupsky, 2006**).

La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation. La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron *vanA*, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (**Noble et al., 1992 ; Alekshun et Levy, 2007**).

3.1.3. Facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance

L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques sont le résultat d'une pression sélective exercée par les agents antimicrobiens et de la transmission de micro-organismes résistants (**Simonsen et al., 2004**). La résistance étant un phénomène écologique résultant de la réponse des bactéries aux antibiotiques avec lesquels elles sont en contact, la simple utilisation des antibiotiques est le principal facteur influençant l'apparition de germes résistants. On peut parler d'utilisation excessive lorsqu'une trop grande quantité est utilisée dans le cadre de traitements ou pour la prophylaxie, que ce soit dans le domaine humain, agricole ou vétérinaire. D'autre part, on observe une utilisation inappropriée lorsque l'antibiotique est utilisé pour des infections virales, à des doses trop

faibles ou trop élevées, sur une durée trop courte ou excessivement longue, favorisant ainsi l'apparition de souches résistantes (**Von Gunten, 2004**).

Les principaux facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance bactérienne sont présentés dans le tableau 2 (**Murthy, 2001 ; Rybak, 2004**).

Tableau 2. Facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques :

Facteurs	Exemples
Émergence de la résistance	Usage abusif d'antibiotiques ; Gravité accrue de l'état des malades hospitalisés ; Manque de fidélité au traitement ; Durée trop courte ou dose sous-thérapeutique ; Diagnostic non confirmé d'infection bactérienne ; Utilisation inadéquate d'antibiotiques dans les pays en voie de développement.
Propagation des souches résistantes	Mesures d'hygiène inadéquates dans les hôpitaux ; Non-respect des directives de lutte contre les infections ; Promiscuité des patients hospitalisés ; Réduction du personnel infirmier et de soutien ; Déplacements accrus des patients (transferts de patients colonisés ou infectés entre hôpitaux et milieu communautaire) ; Voyages internationaux.
Utilisation d'antibiotiques dans le secteur agro-alimentaire	Animaux destinés à la consommation ; Agriculture et aquaculture.
Utilisation d'antiseptiques et de désinfectants	Agents antibactériens dans les produits d'entretien ménager, le dentifrice, les pastilles contre le mal de gorge, les savons, etc.

3.1.4. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne

La montée des résistances contre les principales classes d'antibiotiques, combinée au nombre limité d'agents en cours de développement, a conduit à l'avènement de l'ère post-antibiotique. Face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence de germes multi-résistants, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue. Les champs d'investigation sont vastes. Toutefois, deux grandes stratégies, recourant aux progrès récents de la modélisation moléculaire, de la biologie moléculaire, de la génomique et de la protéomique, se dessinent dans le domaine de la recherche (**Guinoiseau, 2010**).

La plus originale se base sur l'identification de nouvelles cibles bactériennes, en vue de développer des agents susceptibles d'inhiber les mécanismes de résistance ou d'interférer avec la virulence bactérienne (**Tan et al., 2000 ; Schmidt, 2004 ; Falconer et Brown, 2009**). Au lieu de tuer les bactéries, ces nouvelles molécules atténueraient leur pouvoir pathogène en ciblant leurs gènes de résistance, leurs facteurs de virulence ou en entravant la communication intercellulaire. L'idée sous-jacente est d'empêcher les bactéries de s'adapter à leur environnement sans porter atteinte à leur survie, ce qui devrait ainsi limiter l'apparition des résistances. En réduisant la pathogénicité et la résistance bactérienne, ces molécules devraient permettre de restaurer l'activité des antibiotiques conventionnels devenus aujourd'hui inefficaces.

Les efforts se concentrent également sur la recherche d'agents antibactériens, capables d'agir par de nouveaux mécanismes d'action (**Tan et al., 2000 ; Schmidt, 2004 ; Falconer et Brown, 2009**). Ces molécules devraient être radicalement différentes des antibiotiques classiques, qui concentrent leurs effets sur une seule et même cible bactérienne. Aussi, pour être innovants, les nouveaux antibactériens devraient pouvoir induire la mort cellulaire en agissant simultanément sur plusieurs cibles bactériennes ou en développant des mécanismes d'action originaux. Depuis quelques années, les substances naturelles, qui avaient été délaissées au profit des molécules de synthèse, connaissent un regain d'intérêt. Les ressources naturelles sont donc à nouveau exploitées pour mener à terme de telles recherches. Actuellement, l'accent est mis sur l'exploration de nouveaux réservoirs naturels, comme les peptides antimicrobiens, qui montrent déjà des résultats prometteurs. Les ressources plus anciennes, comme les bactériophages ou les plantes, suscitent également un regain d'intérêt.

3.2. Place des plantes médicinales dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques

Notre travail a pour objectif l'étude des plantes traditionnellement utilisées pour combattre diverses pathologies dont les infections. C'est dans ce cadre que nous allons traiter des plantes médicinales comme sources non seulement de composés antimicrobiens, mais aussi d'inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques.

3.2.1. Les plantes, source naturelle d'antimicrobiens

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**). Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont donc plus élevées

pour les molécules isolées de plantes que pour celles issues de bactéries et de champignons. En effet, une molécule phytochimique est considérée comme « antimicrobienne » si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100 µg/ml et 1000 µg/ml. Pour les antibiotiques d'origine microbienne, des CMI, variant de 0.01 µg/ml à 10 µg/ml, suffisent à générer une activité inhibitrice (**Tegos et al., 2002**).

Le spectre d'action des antimicrobiens produits par les plantes est plus restreint que celui généré par les antibiotiques conventionnels. En effet, ces derniers possèdent une haute activité contre les bactéries à Gram positif, mais demeurent peu actifs contre les bactéries à Gram négatif et les levures (**Lewis, 2001**). L'une des rares exceptions concerne l'acide 3-farnésyl-2-hydroxy benzoïque (**Figure 29**), isolé de la plante *Piper multiplinervium*. Ce composé démontre une activité antibactérienne avec des CMI comprises entre 6.25 µg/ml et 37.5 µg/ml contre *Helicobacter pylori*, *E. coli* et *P. aeruginosa*, qui demeurent, à l'heure actuelle, les bactéries à Gram négatif les plus difficiles à traiter cliniquement (**Rüegg et al., 2006**).

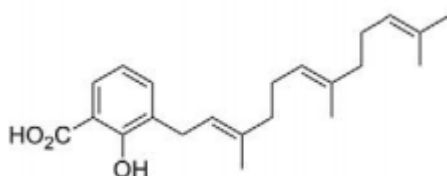


Figure 29. L'acide 3-farnésyl-2-hydroxy benzoïque (**Gibbons, 2008**)

De nombreux autres antibactériens, démontrant une activité contre *S. aureus* et des variants résistants aux antibiotiques, ont été répertoriés dans la littérature (**Gibbons, 2008**). La xanthone, molécule géranylée, isolée de *Garcinia cambodgiae*, présente une haute activité anti-staphylococcique avec des CMI comprises entre 0.3 µg/ml et 1.25 µg/ml (**Linuma et al., 1998**). L'hyperforine, produite par *Hypericum perforatum*, démontre une activité encore plus élevée avec des CMI comprises entre 0.1 µg/ml et 1 µg/ml contre des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline et à la pénicilline (**Schempp et al., 1999**).

3.2.2. Les plantes, source naturelle d'inhibiteurs de l'efflux bactérien

Les plantes ont développé plusieurs stratégies pour contrôler les infections bactériennes. La synthèse d'un grand nombre de molécules faiblement actives, plutôt que de puissants antibiotiques, en fait partie. Elle semble d'ailleurs utilisée pour diminuer la pression sélective, qui favorise le développement des résistances. Toutefois, l'activité de ces antibactériens peut être potentialisée lorsqu'ils agissent en synergie avec d'autres molécules. La preuve en

a été fournie par les interactions établies entre deux composés produits par les plantes *Berberis* sp. : la berbérine et la 5'-méthoxyhydnocarpine (5'-MHC) (Guinoiseau, 2010). Les structures de ceux-ci sont représentées dans la figure 30.

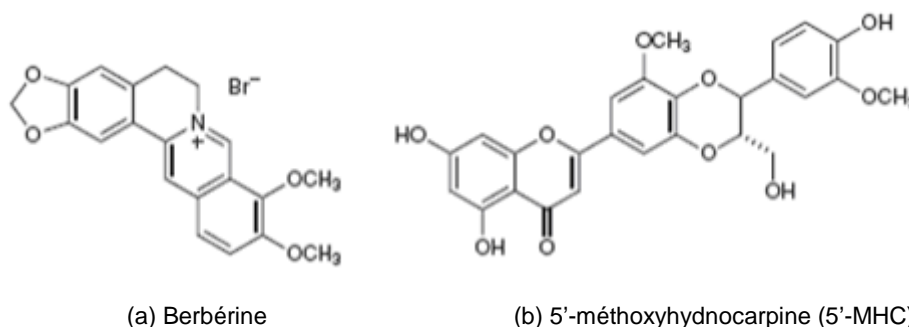


Figure 30. Structures chimiques de la berbérine (a) et de l'inhibiteur des pompes MFS, la 5'-méthoxyhydnocarpine (b), isolés de *Berberis fremontii* (Stermitz *et al.*, 2000)

La berbérine est un alcaloïde ayant pour cible cellulaire l'ADN (Amin *et al.*, 1969). Ce cation hydrophobe (Figure 30, a) est aussi un substrat des pompes d'efflux exprimées à la surface membranaire. Le rejet de la berbérine, hors de la cellule, limite son accumulation intracellulaire et, en l'empêchant d'accéder à sa cible, diminue son activité antibactérienne. Pour compenser cette faible activité, les plantes *Berberis* sp. synthétisent une flavonolignane, la 5'-MHC (Figure 30, b), qui, en bloquant les pompes bactériennes d'efflux, potentialise les effets de la berbérine. La combinaison « 5'-MHC/berbérine » agit donc comme un puissant antibactérien (Guinoiseau, 2010).

3.2.3. Les plantes, productrices d'analogues des N-acylhomosérine-lactones (AHLs)

La production de substances, capables d'interférer avec la voie du quorum sensing (QS), semble être une autre stratégie employée par les plantes pour lutter contre les infections causées par les bactéries à Gram négatif. De récentes études ont démontré que les plantes *Pisum sativum* (Teplitski *et al.*, 2000 ; Bauer et Mathesius, 2004) et *Medicago truncatula* (Gao *et al.*, 2003) synthétisent des analogues des AHLs, molécules impliquées dans la régulation du QS de ces bactéries. Ces composés, mimétiques de l'action des AHLs, perturbent la communication intercellulaire bactérienne, en activant ou en inhibant certaines voies de la régulation du QS (Bauer et Mathesius, 2004).

Même si ces composés n'ont pas encore été identifiés et que les mécanismes par lesquels ils agissent restent à élucider, ils offrent des perspectives intéressantes pour la compréhension des relations « hôte-bactérie » et des comportements bactériens, notamment ceux impliqués dans l'expression de la virulence (Guinoiseau, 2010).

2^{ème} partie : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal, criblage phytochimique et extraction

1.1. Critères de sélection des plantes

Afin d'isoler des substances nouvelles de plantes et de trouver de ce fait de nouvelles voies d'applications tant dans les domaines de la pharmacie que de la cosmétique et afin de rendre la stratégie d'isolement le plus efficace, il convient de sélectionner avec soin les plantes à étudier. Dans cette optique, un certain nombre de critères ont été pris en compte pour la sélection de nos plantes :

- **Une origine géographique commune** : Le Sahara septentrional

Le Sahara, qui occupe 10% de la surface du continent africain, est le plus grand désert chaud du monde (**Rognon, 1994**). Nonobstant sa vaste étendue, la richesse en espèces et l'endémisme y sont faibles. Malgré ça, certaines espèces acclimatées survivent avec des formes d'adaptations extraordinaires (**Le Houérou, 2001**). Cette écorégion comprend la partie septentrionale du Sahara, où les précipitations se produisent pendant l'hiver, nourrissant ainsi une variété de plantes qui fleurissent avant l'été chaud et sec.

La flore du Sahara septentrional est très pauvre compte tenu de l'immensité de l'écozone. D'autre part, bien que le Sahara détienne 80% de la surface de l'Algérie, il n'a fait l'objet que de très peu de travaux relatifs à la mise en valeur de la flore spontanée qu'il renferme. Cela contribue à faire de cette partie une zone de choix pour la mise en lumière de nouvelles molécules élargissant ainsi la connaissance de la biodiversité de notre pays.

- **L'utilisation des plantes en médecine traditionnelle**

Les informations de terrain recueillies auprès des populations et l'usage empirique des différentes préparations traditionnelles ont retenu notre attention pour la sélection des plantes étudiées.

- **L'aspect botanique et chimiotaxonomique**

La connaissance des plantes choisies au travers des enquêtes ethnobotaniques peut être enrichie par la connaissance botanique des espèces citées. Les plantes appartenant aux mêmes familles ou à des familles voisines et/ou qui poussent dans les mêmes biotopes sont susceptibles de synthétiser les mêmes molécules chimiques. La chimiotaxonomie, ou classification des plantes en fonction de leurs métabolites secondaires complète la classification botanique basée sur des critères morphologiques et moléculaires (génétiques par exemple) (**Grayer et al., 1999**). L'aspect géobotanique est également intéressant, car

une plante qui est endémique d'une région doit certainement posséder des caractéristiques évolutives particulières et donc pouvoir fournir des substances chimiques nouvelles.

- Les apports de la littérature

Dans l'optique d'augmenter les chances d'isoler de nouvelles molécules et/ou de nouvelles voies d'application thérapeutiques (ou cosmétiques), il est plus judicieux de choisir des espèces qui ont été peu ou pas étudiées jusque-là. Cependant, le scientifique averti pourra également faire des découvertes dignes d'intérêt en investiguant une plante largement étudiée sous un angle nouveau : autre organe ou extrait, technique analytique nouvelle, cible biologique différente, etc. Dans les deux cas, une recherche de littérature approfondie devra précéder le début des processus d'extraction.

➡ Pour le présent travail, en tenant compte de tous ces critères, nous avons sélectionné deux plantes médicinales sahariennes ayant un fort potentiel d'activité du fait de leurs usages traditionnels largement répandus :

- Une plante endémique à usage thérapeutique : *Anvillea radiata* Coss. & Dur. de la famille des Asteraceae ;
- Une plante médicinale à usage alimentaire : *Rumex vesicarius* L. de la famille des Polygonaceae.

Une synthèse des connaissances bibliographiques à la fois botaniques et phytochimiques de ces deux plantes et des familles auxquelles elles appartiennent a été présentée au début de ce travail de thèse. Cela nous a permis de constater que les connaissances sur le genre *Rumex* se limitaient principalement à l'étude du pouvoir thérapeutique et du contenu phytochimique de ses racines et rhizomes, ainsi que ses fruits et semences, la partie aérienne fleurie de *Rumex vesicarius* étant très peu étudiée. Par ailleurs, *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) a retenu notre attention du fait de son usage traditionnel et le peu d'informations que nous avons tiré des recherches bibliographiques.

1.2. Collecte du matériel végétal

Les espèces sélectionnées ont été récoltées dans deux stations différentes du Sahara septentrional, à savoir : Ghardaïa et Aïn Sefra (**Tableau 3, Figure 31**). Leur identification botanique a été faite par Mr. MAHBOUBI (Maître assistant au département d'Ecologie et Environnement, Université de Tlemcen) et des échantillons de référence ont été déposés dans l'herbier du Laboratoire de Produits Naturels (Département de Biologie, Université d

Tlemcen), sous les numéros : A. 2788 pour *Anvillea radiata* Coss. & Dur. et P. 672 pour *Rumex vesicarius* L.

Tableau 3. Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations d'étude

Plantes	Stations	Période de récolte	Parties étudiées	Longitude	Latitude	Altitude (m)	Etage bioclimatique
<i>A. radiata</i>	Aïn Sefra (W. Nâama)	Avril 2010	Feuilles Fleurs Tiges	0°34'30" O	32°46'01" N	1087	Arde à hivers frais
<i>R. vesicarius</i>	Oued Nechou (W. Ghardaïa)	Mars 2012	Partie aérienne*	3°43'05" E	32°36'44" N	563	Saharien à hivers doux

Partie aérienne* : Tiges, feuilles et fleurs. N: Nord, O: Ouest, E: Est

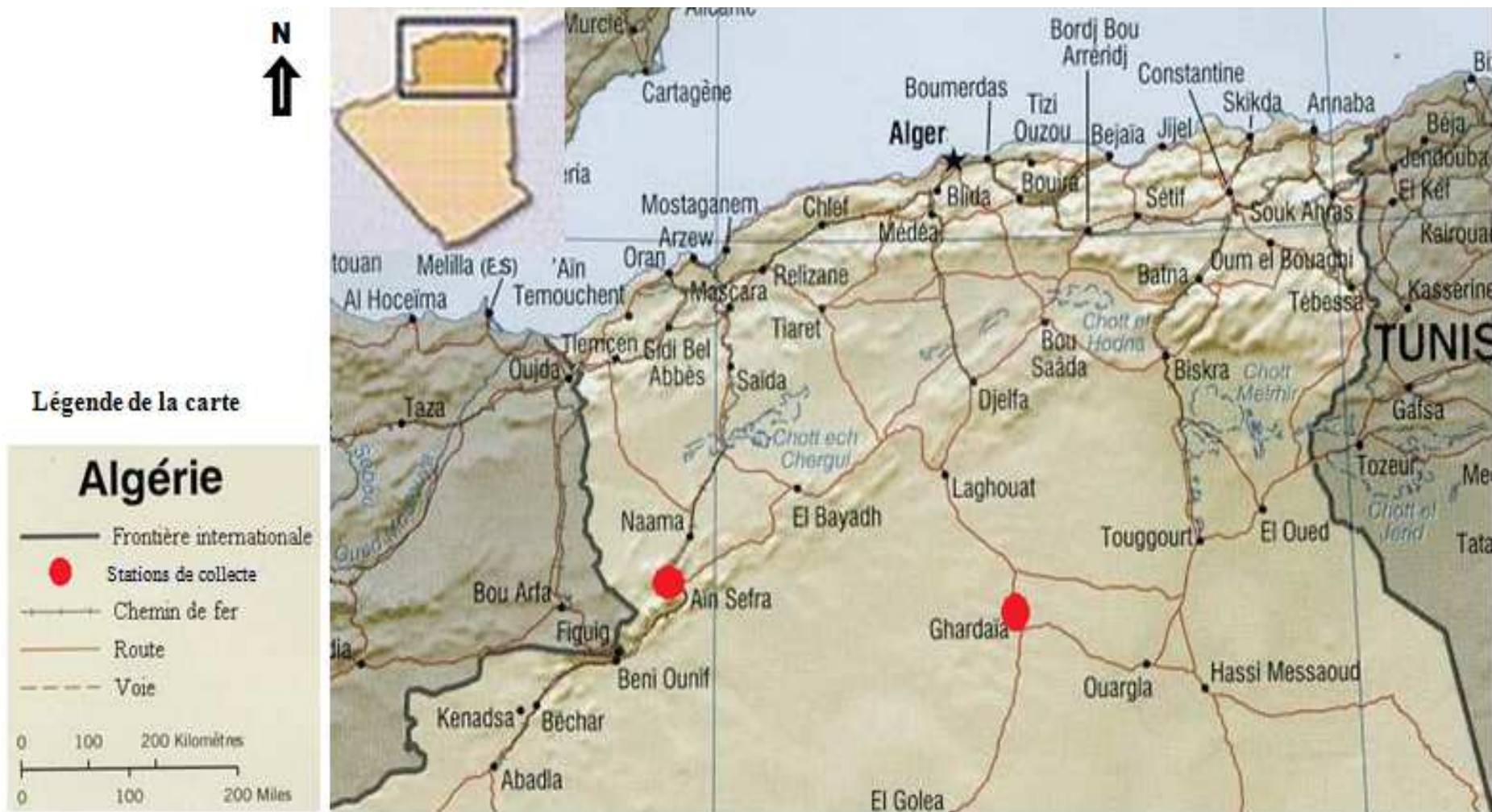


Figure 31. Situation géographique des stations de collecte

Le matériel végétal fraîchement collecté a été séché à l'ombre pendant 2 à 3 semaines puis broyé. Les poudres ainsi récupérées sont conservées au congélateur dans des flacons en verre, sur lesquels le nom et la partie de l'espèce sont mentionnés.

1.3. Criblage phytochimique

Des tests en tube sont réalisés sur les poudres végétales afin de déterminer de manière préliminaire les classes phytochimiques contenues dans les plantes analysées. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ainsi qu'à des examens en lumière ultraviolette (**Annexe 1**). Le tableau 4 indique les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés.

Tableau 4. Réactifs spécifiques et réactions de caractérisation du criblage phytochimique

Groupes chimiques	Réactifs et résultats positifs
Alcaloïdes	- Mayer (Iodomercurate de potassium) → précipité blanc jaunâtre - Dragendorff (iodobismuthate de potassium) → précipité rouge orangé
Flavonoïdes	- Réaction à la cyanidine → coloration orangée, rouge ou violette
Tanins	- FeCl ₃ → coloration bleu-foncée, verte ou noire
Coumarines	- NH ₄ OH (25%) → fluorescence sous lumière UV
Dérivés quinoniques	- Bornträger (réaction entre cycles quinoniques en milieu NH ₄ OH) → coloration rouge violacée
Stéroïdes et Terpènes	- Liebermann-Burchard (anhydride acétique-H ₂ SO ₄) → coloration violette-bleue ou verte
Saponosides	- Détermination de l'indice de mousse (IM*): test positif si IM > 100
Composés réducteurs	- Réactif de Fehling → précipité rouge brique

* IM est le degré de dilution d'un décocté aqueux de la drogue végétale qui, dans les conditions déterminées, donne une mousse persistante

La présence des principales classes phytochimiques est classée comme suit :

+ : présence certaine

+/- : présence incertaine

- : absence

1.4. Préparation des extraits

1.4.1. Un point bibliographique sur l'importance des solvants dans l'extraction des composés phénoliques

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification des molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes (**Michel, 2011**).

Nombreux sont les auteurs qui ont critiqué l'influence des méthodes de caractérisation et les conditions d'extraction des composés phénoliques. **Counet et Collin (2003)** ont montré qu'un mélange acétone/eau/acide acétique (70/28/2, v/v/v) était optimal pour l'extraction des flavonoïdes, surtout s'il s'agissait d'oligomères. Pour les anthocyanidines, le méthanol acidifié (1% HCl) et l'acétone aqueux (70/30, v/v) sont les solvants les plus fréquemment utilisés. Le second semble toutefois préférable pour éviter la formation de pyrano-anthocyanidines (**Collin et Crouzet, 2011**).

Un lavage à l'eau est généralement effectué avant l'élution des polyphénols par l'éthanol (pour les flavonols), le méthanol (pour les monomères de flavan-3-ols), ou l'acétone (pour les oligomères de proanthocyanidines), éventuellement mélangés avec un faible pourcentage d'eau et d'acide (**Collin et Crouzet, 2011**).

L'utilisation de mélanges méthanol/eau (50/50) est parfois préférable afin de permettre une extraction appropriée de glycosides. En effet, des études ont indiqué qu'un rapport de 70% de méthanol est utilisé généralement dans l'extraction des flavonoïdes (catéchines ou épicatechines), des acides-phénols et leurs dérivés et plusieurs autres sous groupes de flavonoïdes (**Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003 ; Tabart et al., 2007 ; Al-Farsi et Lee, 2008**).

Les solvants apolaires sont par contre recommandés pour récupérer sélectivement les acides tanniques de haut poids moléculaire. C'est ainsi qu'en utilisant l'acétate d'éthyle, il est possible de concentrer un extrait de gallotannins à raison de plus de 50% avec les fractions contenant plus de sept unités galloyles (**Tian et al., 2009**). Les arômes dérivés des acides hydroxycinnamiques sont quant à eux habituellement extraits par des solvants apolaires tels que le chloroforme et le diéthyléther (**Collin et Crouzet, 2011**).

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols (**Koffi et al., 2010 ; Mahmoudi et al., 2013**). Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les

composés phénoliques de la plante (**Garcia-Salas et al., 2010 ; Jokić et al., 2010 ; Mahmoudi et al., 2013**).

1.4.2. Préparation des extraits bruts par Extraction Solide - Liquide (ESL)

Dans cette partie de travail, nous avons tenté d'extraire les composés phénoliques totaux. Une quantité de 10 g de poudre végétale est mise en contact avec le solvant d'extraction qui a été choisi de manière à solubiliser un maximum de composés. Trois solvants ont ainsi été testés : le méthanol aqueux, l'acétone aqueux avec des proportions de 70% (v/v) et l'eau chaude (infusé) pour se rapprocher des préparations traditionnelles.

Le volume de solvant doit être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant la totalité de l'extraction. Les ratios optimums solide : liquide, les plus souvent trouvés dans la littérature, sont généralement situés entre 1/10 et 1/50 (mg/ml) (**Michel, 2011**). On a choisi le ratio 1/10 (mg/ml) dans la présente étude.

L'extraction sous reflux a été renouvelée trois fois toutes les 2h. Les extraits ont été filtrés par la suite et évaporés à sec sous pression réduite. Le rendement d'extraction a été calculé par rapport au poids total de la poudre végétale.

1.4.3. Fractionnement de l'extrait hydrométhanolique par Extraction Liquide - Liquide (ELL)

Dans l'optique de séparer les extraits bruts méthanoliques en fractions de polarités différentes, nous avons opté pour un fractionnement ELL qui permet de partager les molécules selon leurs propriétés physico-chimiques entre deux phases liquides non miscibles. Cette méthode, résumée dans la figure 32, comprend deux grandes étapes : la première étape d'extraction se fait avec le méthanol aqueux (70%) pour solubiliser les composés phénoliques et la deuxième étape consiste en un affrontement liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante, à savoir : l'hexane (pour se débarrasser des cires, des lipides et de la chlorophylle), le chloroforme (pour l'extraction des flavonoïdes aglycones et des aglycones méthoxylés), l'acétate d'éthyle (pour l'extraction des mono-glycosides) et le n-butanol (pour solubiliser les di- et les tri-glycosides). La solution aqueuse restante à la fin du partage à été utilisée comme fraction très polaire.

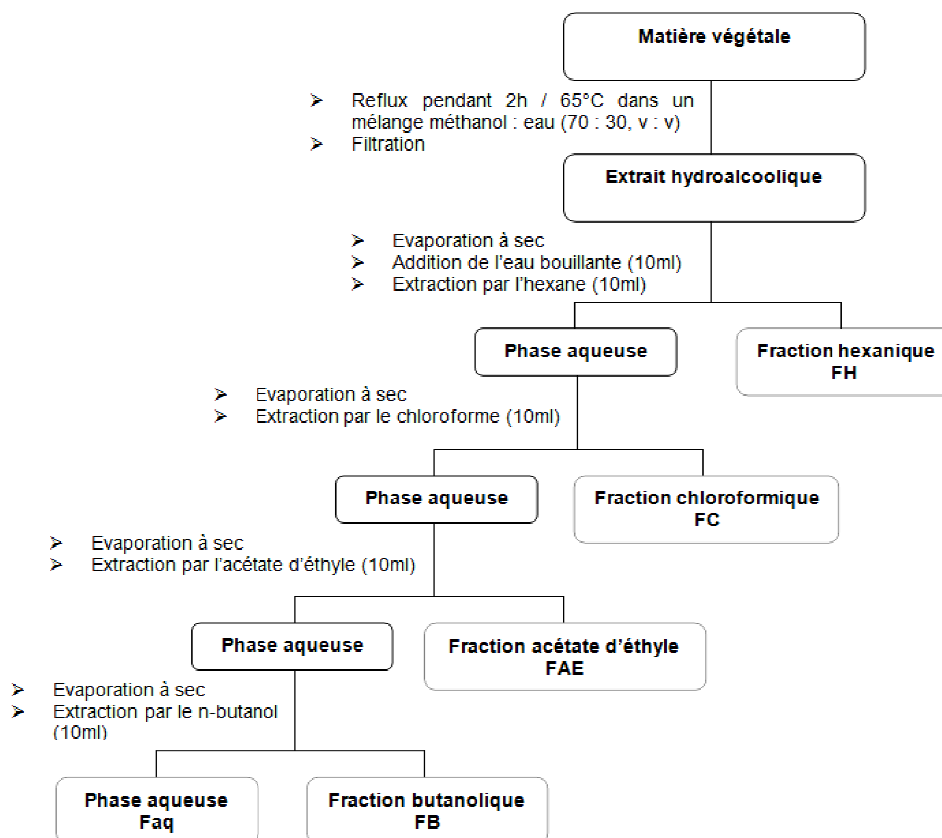


Figure 32. Schéma du fractionnement ELL adopté pour le partage en cinq fractions (FH, FC, FAE, FB et Faq) des extraits bruts hydro-méthanoliques

2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins des différents extraits/fractions sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage et exprimées en mg équivalent par g de la matière végétale sèche. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribués.

2.1.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits bruts et leurs différentes fractions a été déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu suivant la méthode décrite par **Awah et ses collaborateurs (2012)**. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de

molybdène (Mo_8O_{23}) (**Ribéreau-Gayon et al., 1972**). L'intensité de cette couleur renseigne sur le contenu en polyphénols totaux dans le mélange.

Une prise de 100 μl d'extrait convenablement dilué est mise dans un tube en présence de 750 μl du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Après agitation vigoureuse et repos du mélange pendant 5 mn à 22°C, 750 μl d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 60 g/l sont ajoutés. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec l'acide gallique, est mesurée à 725 nm après 90 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en terme d'équivalents acide gallique.

2.1.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits bruts et leurs différentes fractions a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium décrite par **Barros et al. (2011)**. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et la soude, entraînant ainsi la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm.

Une prise de 500 μl d'extrait convenablement dilué est mise dans un tube en présence de 2 ml d'eau distillée additionnée de 150 μl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2 , 5%). Après 6 mn d'incubation à température ambiante, 150 μl d'une solution fraîchement préparée de chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%) sont ajoutés au mélange. On apporte à ce dernier 2 ml d'une solution de soude (NaOH , 4%) après 6 mn de repos puis on ajuste le volume final à 5 ml avec de l'eau distillée. L'intensité de la couleur rose est mesurée à 510 nm après 15 min d'incubation. Une gamme étalon à base de catéchine est également préparée dans les mêmes conditions.

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est alors exprimée en mg d'équivalents catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg EC/g MS).

2.1.3. Détermination de la teneur en flavonols

La méthode au trichlorure d'aluminium (**Awah et al., 2012**) est utilisée pour quantifier les flavonols dans les différents extraits.

Dans un tube à essai sont introduits : 1 ml d'extrait dilué, 1 ml d'une solution alcoolique d' AlCl_3 à 20 mg/ml et 3 ml d'une solution d'acétate de sodium à 50 mg/ml. L'ensemble est incubé à l'ombre pendant 2h 30. Dans ces mêmes conditions, une gamme étalon est également préparée avec des solutions de quercétine à différentes concentrations. L'absorbance est ensuite mesurée à 440 nm permettant ainsi la quantification des flavonols.

2.1.4. Détermination de la teneur en tanins condensés

Les tanins condensés, également connus sous le nom de proanthocyanidines - dérivés polymériques de flavan-3-ol, sont déterminés par la méthode de **Sun et al. (1998)** qui consiste à dépolymériser les tanins en milieu méthanolique acide, et après réaction avec la vanilline, à les transformer en anthocyanidols de couleur rouge facilement analysables à 500 nm.

Une prise de 500 µl d'extrait convenablement dilué est ajoutée à 3 ml de vanilline à 4% et 1.5 ml d'acide chlorhydrique (HCl). Le mélange est mis en incubation à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance de cette préparation est mesurée à 500 nm.

Les concentrations des tanins condensés sont déduites à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la catéchine et sont exprimées en milligramme d'équivalent catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg EC/g).

2.2. Détermination de la teneur en pigments liposolubles

Les colorants naturels ou « pigments », dont la plupart sont d'origine végétale, forment une gamme très étendue de nuances (du jaune au bleu, en passant par le vert et même le noir). La chlorophylle, le lycopène et le β-carotène sont parmi les colorants les plus rencontrés et les plus utilisés dans les industries agroalimentaires. A des doses réglementées, ils sont bénéfiques pour la santé. Certains d'entre eux sont connus pour leurs activités antioxydantes, antimutagènes, voire anticarcinogènes (**Kamat et al., 2000 ; Bouchet et al., 2005 ; Ben Mansour et Latrach Tlemcani, 2009**).

Dans le but de quantifier leur teneur dans nos plantes, nous avons opté pour la méthode décrite par **Barros et ses collaborateurs (2011)**. 150 mg de poudre végétale sont agités vigoureusement après avoir ajouter 10 ml du mélange acétone-hexane (4/6, v/v) pendant 1 min puis filtrés. L'absorbance du filtrat est mesurée par la suite à différentes longueurs d'onde (λ = 453, 505, 645 et 663 nm).

La teneur en pigments est calculée suivant les équations indiquées ci-dessous et exprimée en µg/g de matière végétale sèche.

$$\begin{aligned}\beta\text{-carotène (mg/100 ml)} &= 0.216 \times A_{663} - 1.220 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453} \\ \text{Lycopène (mg/100 ml)} &= -0.0458 \times A_{663} + 0.204 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453} \\ \text{Chlorophylle a (mg/100 ml)} &= 0.999 \times A_{663} - 0.0989 \times A_{645} \\ \text{Chlorophylle b (mg/100 ml)} &= -0.328 \times A_{663} + 1.77 \times A_{645}\end{aligned}$$

3. Evaluation *in vitro* des activités biologiques

3.1. Le potentiel antioxydant des plantes

Même si les antioxydants de synthèse sont efficaces et bon marché et que leurs doses autorisées sont largement limitées pour éviter tout problème de toxicité, on a assisté depuis les années 1980 à un engouement pour les produits naturels, et au développement d'extraits végétaux à usage antioxydant, qui auraient des propriétés biologiques pouvant contribuer à réduire le risque de certaines pathologies (**De-Reynal et Multon, 2009**). Bien que le sujet soit en évolution permanente, il nous a paru nécessaire de faire le point sur cette question, d'autant que l'intérêt pour les antioxydants naturels, particulièrement les polyphénols, s'explique aussi par leur rôle potentiel *in vivo* vis-à-vis des radicaux libres, via l'alimentation ou la pharmacologie.

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées (**Tableau 5**). Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que les radicaux libres ou les complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs : soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron (**Prior et al., 2005**).

Tableau 5. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante *in vitro* (**Huang et al., 2005 ; Karadag et al., 2009**)

Classe de méthodes	Equation du mécanisme spécifique	Exemples
Transfert d'atome d'hydrogène	$\text{AH} + \text{X}^\bullet \rightarrow \text{XH} + \text{A}^\bullet$ AH : antioxydant (donneur d'atome d'hydrogène) X [•] : radical libre (accepteur d'atome d'hydrogène) XH : radical libre inhibé A [•] : antioxydant stable	- Capacité d'absorption des radicaux libres (test ORAC) ; - Capacité de piégeage des radicaux libres (test TRAP) ; - Inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique
Transfert d'électron	$\text{M (III)} + \text{AH} \rightarrow \text{AH}^\bullet + \text{M (II)}$ M (III) : antioxydant (donneur d'un électron) AH : radical libre (accepteur d'un électron) AH [•] : radical libre inhibé M (II) : antioxydant stable	- Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (test FRAP) ; - Analyse des phénols totaux (test au Folin-Ciocalteu)
Analyses basées sur les deux mécanismes	Les réactions semblent plus complexes et suivent un des deux mécanismes selon la structure des antioxydants ou la nature du milieu réactionnel	- Piégeage du radical DPPH [•] - Réduction du radical-cation ABTS ^{•+} ou détermination de la capacité antioxydante en équivalents trolox (TEAC)

Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de six tests chimiques, à savoir : la réduction du phosphomolybdate (ou capacité antioxydante totale (CAT)), le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), le piégeage du radical-cation ABTS^{•+} (l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), le blanchiment du β -carotène et le pouvoir chélateur des ions ferriques. Le principe de ceux-ci repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques.

3.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

Cette technique est basée sur la réduction des molybdates Mo(VI) en molybdène Mo(V) en présence d'un antioxydant avec la formation d'un complexe vert (phosphate / Mo(V)) à pH acide (Prieto *et al.*, 1999). C'est un test quantitatif puisque les résultats sont exprimés en nombre d'équivalents d'acide gallique.

Le réactif au phosphomolybdate a été préparé à partir d'un mélange d'acide sulfurique (H₂SO₄, 0.6 M), de phosphate de sodium (Na₃PO₄, 28 mM) et de molybdate d'ammonium ((NH₄)₆ Mo₇O₂₄•4H₂O, 4 mM). Une prise de 1 ml de ce réactif est additionnée à 100 μ l d'extrait convenablement dilué. Le tube est incubé à 95°C pendant 90 mn. Après un repos à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait.

3.1.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), fut l'un des premiers radicaux utilisés pour étudier la relation structure / activité antioxydante des composés phénoliques. Depuis, certaines modifications ont été apportées et un paramètre important a été introduit : la détermination de la CI₅₀ définie comme étant la concentration en substrat entraînant une

diminution de 50% de l'absorption. A cette concentration, 50% du DPPH• est sous forme réduite (**Brand-Williams et al., 1995**).

Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl-picrylhydrazine (**Figure 33**), dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel (**Sanchez-Moreno, 2002**).

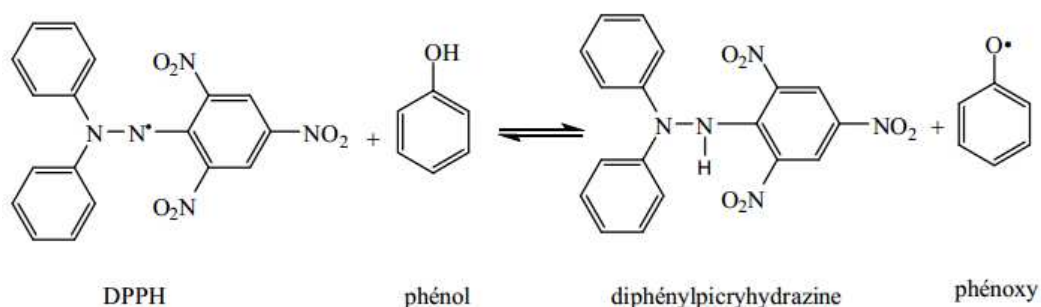


Figure 33. Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH• (**Molyneux, 2004**)

Pour la mesure de cette activité, nous avons utilisé la méthode décrite par **Barros et al. (2011)**. Des aliquotes de 30 µl d'extrait à différentes concentrations sont placées dans une plaque à 96 puits en présence d'une solution hydrométhanolique (80/20, v/v, 270 µl) contenant le radical DPPH• (6×10^{-5} M). En parallèle, un contrôle négatif (sans extrait) est préparé. Après 60 min d'incubation dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 515 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Bio-Tek ELx800).

A des fins comparatives, trois antioxydants standards sont utilisés : l'α-tocophérol (vitamine E), le BHT (Butyl-hydroxytoluène, E 321) et le BHA (Butyl-hydroxyanisole, E 320). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition donné par la formule :

$$PI \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Avec : **PI %** : pourcentage d'inhibition
A_C : absorbance du contrôle négatif
A_E : absorbance de l'échantillon testé

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI₅₀), plus la valeur de CI₅₀ est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres.

3.1.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristique de l'action antioxydante des polyphénols (**Yildirim et al., 2001**).

Elle consiste à mélanger 1 ml de l'extrait à différentes concentrations avec 2.5 ml de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% (m/v)). Le mélange obtenu est incubé à 50°C pendant 20 min, puis 2.5 ml d'acide trichloracétique (CCl_3COOH) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Le mélange est centrifugé à 3 000 g pendant 10 min à température ambiante. A 2.5 ml du surnageant sont additionnés 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de chlorure de fer (FeCl_3) à 0.1%. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (**Oyaizu, 1986**).

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**). La concentration CE_{50} , qui est définie comme étant la concentration effective à laquelle l'absorbance est égale à 0.5, est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives.

L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle des antioxydants synthétiques (l' α -tocophérol, le BHT et le BHA).

3.1.4. Piégeage du radical-cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cationique $\text{ABTS}^{\bullet+}$, (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique), qui présente un spectre d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm (**Belkheiri, 2010**). En réagissant avec le persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), l'ABTS forme le radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, de couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange (**Figure 34**).

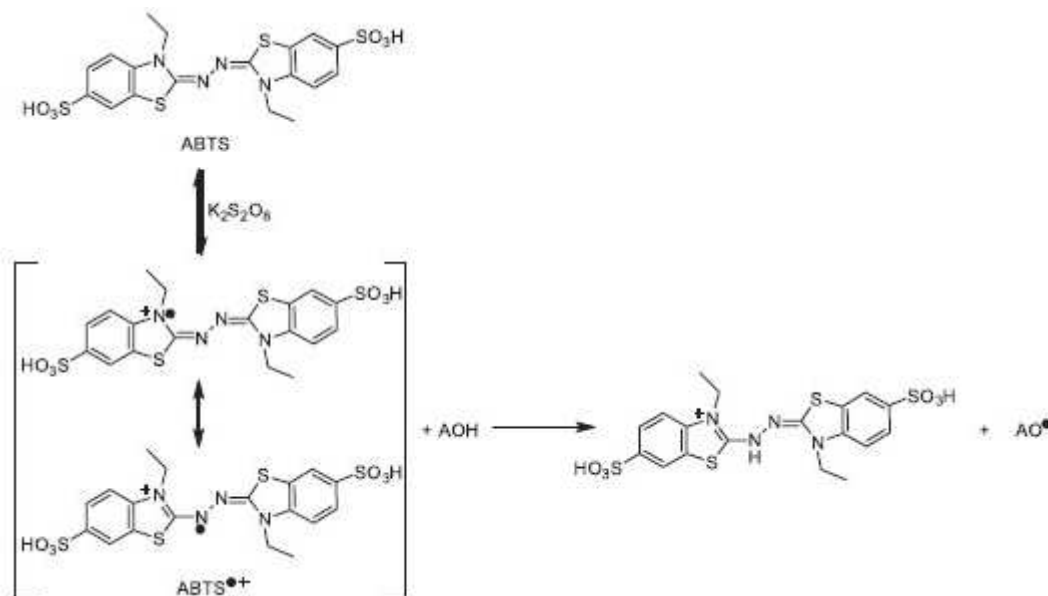


Figure 34. Génération du radical-cation ABTS^{•+} avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH) (de Oliveira *et al.*, 2014).

La décoloration du radical, mesurée par spectrophotométrie à 734 nm, est proportionnelle à la concentration en antioxydants. Le radical cationique ABTS^{•+} est formé par arrachement d'un électron (e⁻) à un atome d'azote de l'ABTS. En présence d'un antioxydant donneur de H[•], l'atome d'azote concerné piège un H[•], conduisant à l'ABTS⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution (Lien *et al.*, 1999).

En mode opératoire, un stock d'une solution mère d'ABTS^{•+} stable est préparé en mélangeant 7 mM d'une solution aqueuse d'ABTS avec 2.45 mM d'une solution de persulfate de potassium. Le mélange est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 à 16h avant utilisation. Cette solution est par la suite diluée avec l'éthanol afin d'avoir une absorbance de 0.700 (± 0.02) à 734 nm. A 950 µl de cette solution, 50 µl d'extrait végétal ou de témoin positif (BHT) sont ajoutés, après 6 min on note l'absorbance obtenue à 734 nm en se référant à un témoin sans extrait.

Les résultats permettent de calculer et d'exprimer cette activité antiradicalaire en CI₅₀ comme décrit précédemment pour le test DPPH[•].

Parce que ce test est simple, il est utilisé dans beaucoup de laboratoires pour l'étude de l'activité antioxydante. L'ABTS^{•+} réagit rapidement avec les antioxydants et peut être utilisé sur une large gamme de pH. Il est soluble dans l'eau et dans les solvants organiques et n'est pas affecté par la force ionique, il peut donc déterminer la capacité antioxydant lipophile et hydrophile.

3.1.5. Inhibition du blanchiment du β -carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir de groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique (**Kaur et Kapoor, 2002**). Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé qui perd ses doubles liaisons entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (**Yanishlieva et Marinova, 1995 ; Yang et al., 2008**).

La méthode décrite par **Koleva et al. (2002)** a été employée avec une légère modification. Une émulsion β -carotène/acide linoléique est préparée par solubilisation de 2 mg de β -carotène dans 20 ml de chloroforme. 4 ml de cette solution sont mises dans un ballon avec 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme (40°C), 100 ml d'eau distillée aérée sont ajoutés. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée. Des aliquotes de 10 μ l d'extrait à différentes concentrations sont placées dans une plaque à 96 puits en présence de 150 μ l d'émulsion. Deux témoins (positif où l'échantillon est remplacé par l'antioxydant de synthèse et négatif sans antioxydant) ont été aussi préparés avec la même procédure. Les microplaques sont alors mises en incubation à 50°C pendant 120 min et l'absorbance est mesurée (à t = 0 et t = 120 min) à 490 nm grâce à un lecteur de microplaques.

Le pourcentage d'inhibition (PI) est obtenu comme suit :

$$PI \% = [(A_E - A_{C120}) / (A_{C0} - A_{C120})] \times 100$$

A_E : absorbance de l'extrait à t = 120 min

A_{C120} : absorbance du contrôle (témoin négatif) à t = 120 min

A_{C0} : absorbance du contrôle (témoin négatif) à t = 0 min

Cette activité est également exprimée en CI_{50} comme décrit pour le test au DPPH•.

3.1.6. Chélation des ions ferreux

La chélation des ions ferreux est déterminée suivant une méthode basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe^{2+} -Ferrozine (**Figure 35**), chromophore de couleur violette intense ayant un maximum d'absorption à 562 nm (**Zhao et al., 2006a**). En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de

l'intensité de couleur qui sera suivie spectrophotométriquement. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

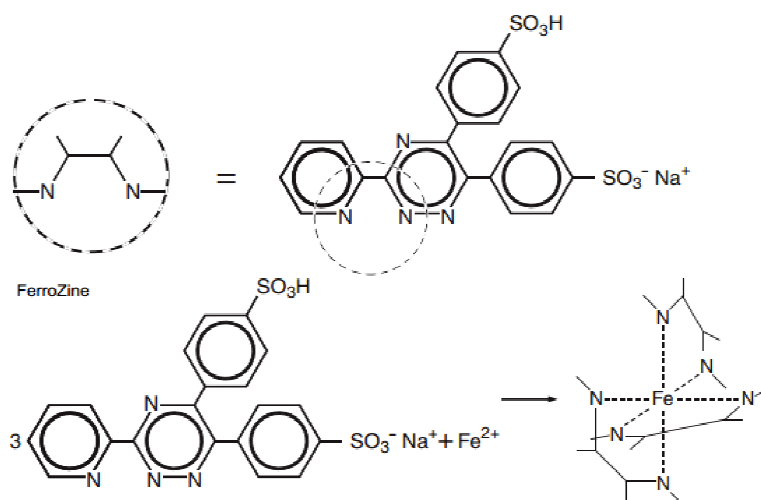


Figure 35. Mécanisme de formation du complexe Fe²⁺-Ferrozine

Une prise de 100 µl d'extrait à différentes concentrations est ajoutée à 50 µl de Chlorure de fer (FeCl₂, 4H₂O, 2 mM). Après une agitation vigoureuse et un repos de 5 min, 100 µl de ferrozine (5 mM) sont ajoutés, suivis de 2.75 ml d'eau distillée. Le mélange est laissé au repos pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la complexation du fer résiduel et la formation du complexe Ferrozine-Fe²⁺. Un contrôle négatif (sans extrait) est préparé dans les mêmes conditions.

L'absorbance est mesurée à 562 nm contre un blanc (sans ferrozine). L'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{Chélation} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Avec : **A_C** : absorbance du contrôle négatif
A_E : absorbance de l'échantillon testé

Les résultats sont alors exprimés en CI₅₀ comme décrit précédemment pour le test au DPPH• et comparés à un antioxydant de synthèse (EDTA, acide éthylène diamine tétraacétique).

3.2. Le potentiel antimicrobien des plantes

La médecine traditionnelle par les plantes jusqu'à aujourd'hui continue d'être utilisée par une grande partie de la population dans la plupart des pays en développement. Si ces utilisations sont justifiées par des effets validés, les plantes pourraient être des sources de biomolécules actives exploitables.

Dans cette partie, nous recherchons des composés antimicrobiens synthétisés par *Anvillea radiata* et/ou *Rumex vesicarius*, deux plantes médicinales connues pour leurs propriétés thérapeutiques.

3.2.1. Propriétés des germes étudiés

L'activité antimicrobienne des extraits et des fractions a été évaluée sur onze souches pathogènes (**Tableau 6**). Les souches bactériennes et fongiques proviennent du Laboratoire de Produits Naturels alors que les levures nous ont été fournies par le Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique, du département de Biologie (Université de Tlemcen).

3.2.2. Mise en culture des souches

Une pré-culture des souches microbiennes est préparée afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance. La turbidité est ensuite ajustée au standard McFarland 0.5 avec un spectrophotomètre, ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml pour les bactéries (DO = 0.08 à 0.1 / $\lambda = 625$ nm) et $1-5 \times 10^6$ UFC/ml pour les levures (DO = 0.12 à 0.15 / $\lambda = 530$ nm) (**NCCLS, 2001**). Pour les moisissures, les suspensions (préparées à partir d'une culture de 7 jours ayant atteint le stade de sporulation sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) sont ajustées à 10^6 spores/ml, ce qui correspond à une transmittance de 68-82 % ($\lambda = 530$ nm) (**Pfaller et al., 1998**).

3.2.3. Etude de l'activité antimicrobienne

Deux méthodes différentes ont été employées pour la détermination *in vitro* de l'activité antimicrobienne : la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé et la méthode de micro-dilution en milieu liquide.

La sensibilité des souches microbiennes, vis-à-vis de : la nystatine (Ny. 30 µg/disque), la céftazidime (CAZ. 30 µg/disque), l'amikacine (AK. 30 µg/disque), le céfotaxime (CTX. 30 µg/disque), l'ampicilline (AMP. 10 µg/disque) et l'oxacilline (OX. 1 µg/disque), a été testée comme contrôle positif et du DMSO (10 µl/disque) comme contrôle négatif.

Tableau 6 : Description et pouvoir pathogène des souches testées

Groupes de germes	Espèces	Références	Habitat préférentiel	Infections hospitalières les plus fréquentées
Bacille Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	- Matières fécales Aliments contaminés Eaux usées	- Infections urinaires Plaies Septicémies Infections respiratoires
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	- Sol, eau, plantes Voies respiratoires Matières fécales Réfrigérateurs Appareils sanitaires	- Infections pulmonaires et urinaires Brûlures Plaies Septicémies
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	- Matières fécales Voies aériennes supérieures Aliments contaminés	- Infections pulmonaires et urinaires Plaies Septicémies
Bacille Gram +	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Sol, poussières Eaux Aliments, Lait (en poudre)	Intoxications alimentaires* Septicémies chez les immunodéprimés
Cocci Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Peau, cheveux Nasopharynx Périnée Poussières, air Aliments contaminés	Infections cutanées, plaies, brûlures, abcès Ostéites, ostéomyélites Endocardites Septicémies Infections pulmonaires Intoxications alimentaires
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	Peau ; voies respiratoires supérieures ; oropharynx Sol ; poussières ; eaux ; air	Infections nosocomiales chez les immunodéprimés
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 IP 444	Tube digestif	Septicémies et infections viscérales Candidoses superficielles
Moisissures	<i>Fusarium oxysporum</i>	MNHN 963917	- Il est présent dans les sols sous forme sporulée.	- Agent d'onyxis, de kératites, d'endophtalmies, de péritonites et d'infections disséminées chez les patients atteints d'hémopathie maligne.
	<i>Aspergillus flavus</i>	MNHN 994294	- Espèce cosmopolite, elle peut coloniser de nombreux substrats.	- Aspergilloses pulmonaires ou généralisées.
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MNHN 566	- Espèce très fréquente sur les matières organiques humides.	- Aspergilloses aviaires et humaine.

ATCC: American Type Culture Collection. IP: Institut Pasteur. MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle. Les infections n'étant pas essentiellement hospitalières sont désignées par *.

3.2.3.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

Cette méthode est utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de nos extraits. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs.

Pour effectuer le test, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 10 µl d'extraits solubilisés dans le DMSO (1 mg/disque) sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de pétri (3 disques par boîte), préalablement ensemencées en surface en nappe avec 1 ml de suspension microbienne (10^6 UFC/ml pour les levures et souches bactériennes sauf *S. aureus* qui a été ensemencée à 10^7 UFC/ml et 10^4 spores/ml pour les moisissures) pendant 10 – 15 min. L'excédant de l'inoculum est éliminé par aspiration.

Les milieux de culture recommandés sont la gélose Mueller-Hinton pour les bactéries, la gélose Mueller-Hinton supplémentée avec 2% de glucose et 0.5 µg/ml de bleu de méthylène pour les levures (**NCCLS, 2004**) et le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) pour les moisissures.

Les boîtes sont laissées 1 h à température ambiante puis retournées et incubées à 37°C pendant 18-24 h pour les bactéries, à 30°C pendant 24-48 h pour les levures et à 25°C pendant 3 jours pour les moisissures. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré (mm), disque inclus.

3.2.3.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide

Ce test en milieu liquide a pour objectif de déterminer les valeurs des paramètres antimicrobiens dont la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) ou Fongicide (CMF). La méthode décrite par **Okusa et al. (2007)**, avec une légère modification, a été employée.

Les extraits étudiés sont dissouts dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 25 mg/250 µl puis dilués avec 5 ml de bouillon Mueller-Hinton (pour le test antibactérien) et Sabouraud (pour le test anti-Candida). La concentration finale en DMSO dans le milieu est de 5%.

200 µl de la solution préparée sont transférés dans une microplaque à 96 puits et une gamme de concentrations de chaque extrait est effectuée par des dilutions au demi dans les milieux de culture.

A partir d'une culture microbienne de 24 h d'incubation, une pré-culture pour atteindre la phase exponentielle de croissance microbienne est préparée. Une fois sa densité optique obtenue, cette préculture est utilisée pour préparer un inoculum de 10^6 UFC/ml (pour les bactéries) et 10^4 UFC/ml (pour les levures) dans une solution de chlorure de sodium (0.9%). Ensuite, 100 µl de cet inoculum sont homogénéisés dans chaque puits de la gamme de concentrations préalablement préparée puis incubée à 30 ou 37°C pendant 24 ou 48 h. Les concentrations finales de la gamme ainsi générée sont comprises entre 10 et 0.078 mg/ml. Deux puits représentent les témoins négatifs : un 1^{er} puits contient le milieu de culture et l'inoculum et un 2^{ème} puits contient uniquement le milieu de culture.

La *Concentration Minimale Inhibitrice* (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration de l'extrait capable d'inhiber toute croissance visible du germe. Elle mesure donc, un effet bactériostatique et ne renseigne pas sur l'état de la population bactérienne, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier (**Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999**). La turbidité de chaque puits est appréciée à l'œil nu à la lumière du jour.

La *Concentration Minimale Bactéricide* (CMB) ou *Fongicide* (CMF) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99.9% de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0.01% de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'un échantillon donné. Des prélèvements sont effectués dans le puits témoin et dans chacun des puits dépourvus de culot bactérien puis déposés « en spots » sur gélose Muller-Hinton. Les boîtesensemencées sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

La CMB de nos extraits est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie ou de levure. Chaque expérience est réalisée trois fois au cours de trois expériences successives.

4. Analyses chromatographiques

4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour identifier les familles moléculaires présentes dans les extraits, ayant présentés une certaine activité, nous avons effectué un criblage phytochimique par CCM. C'est une technique appréciée en phytochimie car elle fournit une empreinte chromatographique des extraits étudiés et un grand nombre d'échantillons peut être analysé simultanément. De plus, des révélateurs spécifiques aux familles moléculaires ou à des activités biologiques peuvent être appliqués après la séparation, indiquant directement la présence ou non de molécules bioactives (**Marston, 2011**). Dans notre cas, nous avons utilisé différents systèmes à

différents révélateurs moléculaires dans le but d'identifier principalement des composés polaires : polyphénols et flavonoïdes, mais également des molécules apolaires: acide gras et terpènes (**Annexe 2**).

Le rapport frontal (Rf) des spots issus de la séparation, qui correspond à la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant, est calculé pour aider à évaluer la distance de migration des composés. Ainsi un Rf faible est caractéristique d'une molécule qui a peu migré et qui est donc proche de la ligne de dépôt, alors qu'un Rf élevé est caractéristique d'une molécule qui a fortement migré et qui est donc proche du front de migration, avec une forte affinité pour la phase mobile.

4.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'analyse a été réalisée au laboratoire des Plantes Extrêmophiles (LPE) de Borj Cédria (Tunisie), par Mme. BOURGOU Soumaya.

D'une manière générale la CLHP, qui fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, demeure la technique la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages tels que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection.

Notre choix s'est basé essentiellement sur la fraction acétate d'éthyle, qui a montré lors de cette étude une bonne activité biologique. Ainsi, il a été démontré qu'elle présente une composition très proche de celle de la fraction butanolique.

- Appareillage

La CLHP analytique de type Agilent est constituée des éléments suivants : une pompe Prostar 1 100, une colonne Hypersil ODS C18 (4.6 m x 250 mm) de porosité 5 µm, un détecteur à barrettes diodes 1100, un système d'injection automatique modèle 1 100.

- Conditions opératoires

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants A (acétonitrile) et B (eau à 0.2 % acide formique). L'échantillon est dissout dans le méthanol puis filtré à travers un filtre millipore 0.45 µm. La séparation a été réalisée à température ambiante sous un débit de 0.7 ml/min avec un gradient de solvants programmé selon le tableau 7.

Tableau 7. Programme (temps, débit et gradient de solvant) utilisé en CLHP analytique pour l'injection de nos extraits ainsi que des standards

Temps	A %	B %	Débit
6	35%	65%	0.7 ml/min
9	60%	40%	0.7 ml/min
14	80%	20%	0.7 ml/min
25	100%	0%	0.7 ml/min
30	35%	65%	0.7 ml/min

Le volume de l'injection est de 20 µl. Les pics sont examinés à 280 nm et identifiés par les temps de rétention comparés à ceux des témoins purs. Une gamme de 44 standards a été utilisée composée d'acides phénoliques et de flavonoïdes (**Annexe 3**).

5. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyennes ± déviation standard. Les valeurs de CI_{50}/CE_{50} ont été calculées à partir des équations linéaires, logarithmiques ou projection directe sur les courbes (% inhibition = f concentrations). Plus elles sont petites, plus l'activité antioxydante des extraits testés est grande. Les coefficients de corrélation entre les composés phénoliques et les méthodes de l'activité antioxydante ont été démontrés en utilisant EXCEL (2010).

3^{ème} partie : Résultats et discussion

Le processus général de caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir de matrices complexes, telles que les plantes, fait intervenir différentes étapes, dont les trois principales sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt, toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques (**Hostettmann et Wolfender, 2004**).

1. Criblage phytochimique

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des différentes parties traitées des plantes sélectionnées pour cette étude a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 8. Résultats du criblage phytochimique réalisé sur *A. radiata* et *R. vesicarius*

		Alcaloïdes	Flavonoïdes	Tanins	Coumarines	Dérivés quinoniques	Stéroïdes et Terpènes	Saponosides	Composés réducteurs
<i>A. radiata</i>	Fe	+	+	+	-	-	+	+	+
	Fl	±	+	+	-	-	+	±	+
	T	-	+	±	-	-	±	+	+
<i>R. vesicarius</i>	Pa	-	+	+	+	-	+	+	+

Pa : Partie aérienne, Fe : feuilles, Fl : fleures, T : tiges, + : présence certaine, +/- : présence incertaine, - : absence

La nature des principes chimiques mis en évidence par le criblage phytochimique laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes des plantes étudiées. Il s'agit essentiellement :

- Des **flavonoïdes** : souvent présentés comme anti-inflammatoires, anti-allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiants, diurétiques, antibactériens, antiviraux *in vitro*... (**Bruneton, 2009**) ;
- Des **tanins** : les applications des drogues à tanins sont assez restreintes et découlent de leur affinité pour les molécules protéiques. Par voie externe, elles imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont aussi un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. Par voie interne, ils exercent un effet

antidiarrhéique certain. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique – antibactérien et antifongique – clairement démontré de ces molécules est intéressant (diarrhée infectieuses, dermatites) (**Bruneton, 2009**) ;

- Des **saponosides** : sont habituellement hémolytiques. Cette propriété est attribuée à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire. Il est également assez fréquent que ces molécules aient une très forte activité spermicide, logiquement corrélée avec l'activité hémolytique. *In vivo*, bon nombre de saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique. Quasiment dépourvus d'activité antibactérienne, les saponosides sont parfois actifs, *in vitro*, sur des virus (**Bruneton, 2009**).

L'espèce *Anvillea radiata* renferme, en plus de ces molécules, des alcaloïdes. Ces derniers sont en majorité retrouvés dans les feuilles. La recherche des coumarines et des dérivés quinoniques s'est montrée négative. Ceci est en accord avec les travaux faits par **Djellouli et al.** en 2013.

Lakhdar et ses collaborateurs ont rapporté la présence des huiles volatiles, d'acides gras, des dérivées anthracéniques et des émodols dans les feuilles et les fleurs d'*A. radiata* (**Mebarki et al., 2013**), alors qu'ils ont affirmé l'absence des anthocyanosides et des composés réducteurs.

Une analyse faite par **Londonkar et Asha Tukappa** en 2013, sur les extraits méthanoliques et aqueux de la partie aérienne de *R. vesicarius*, rapporte la présence des alcaloïdes, tandis que Rao et ses collaborateurs ont signalé l'absence des tanins, des alcaloïdes et la présence des antraquinones dans la partie aérienne de *R. vesicarius* (**Rao et al., 2011**).

Les résultats de ce criblage permettent d'élaborer des hypothèses pour expliquer l'activité biologique d'un extrait par la présence d'une famille chimique particulière.

2. Criblage biologique des différents extraits obtenus par extraction solide-liquide

Les espèces sélectionnées pour cette étude ont retenues notre attention du fait de leur usage traditionnel et le peu d'informations que nous avons tiré des recherches bibliographiques. Comme nous ne disposons d'aucun travail qui différencie l'activité biologique des différentes parties d'*Anvillea radiata*, on a choisi de mener notre étude sur les feuilles, les fleurs et les tiges de cette espèce végétale. Ainsi nous nous sommes attaché à utiliser les différentes méthodologies développées précédemment et qui sont résumées dans la figure suivante :

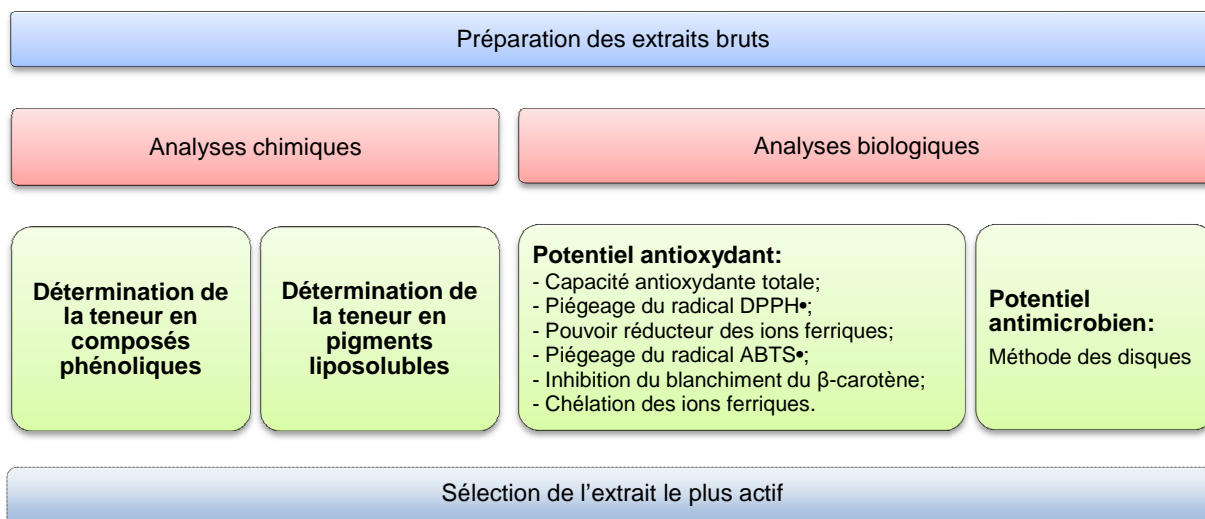
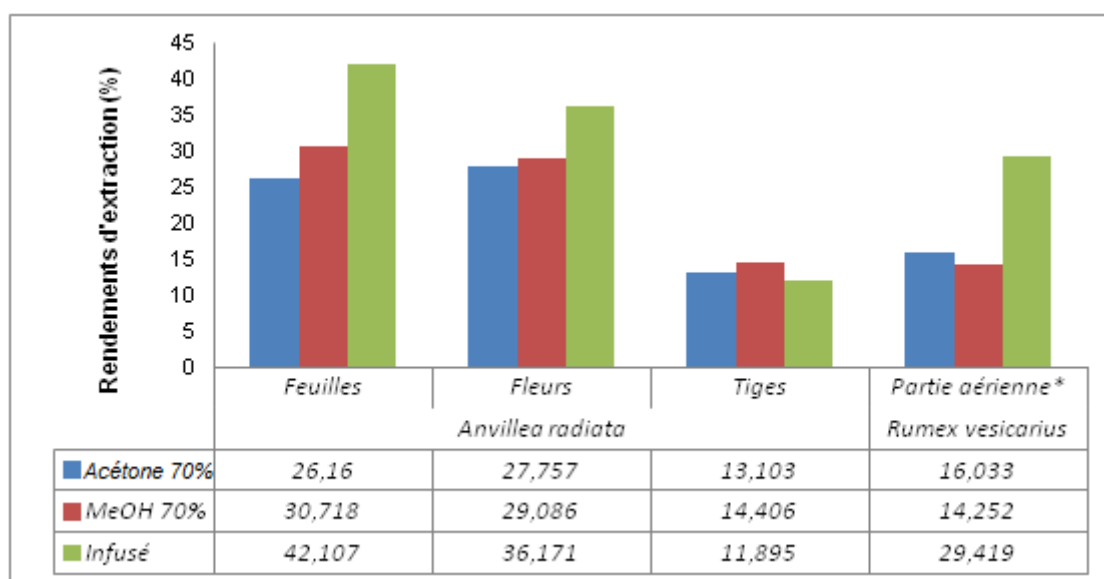


Figure 36. Méthodologie adoptée pour l'étude phytochimique et biologique des extraits bruts

2.1. Rendements en extraits bruts

Les rendements d'extraction ont été calculés par rapport au poids total de la poudre végétale et présentés dans la figure 37.



* : Feuilles, fleurs et tiges ; Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique

Figure 37. Rendements d'extraction moyens (%) obtenus par ESL

Les rendements d'extraction observés dépendent à la fois de l'organe de la plante et aussi du solvant d'extraction. On constate que quelque soit l'organe utilisé, le rendement d'extraction obtenu avec l'eau chaude est toujours plus élevé sauf pour les tiges d'*A. radiata*

où les valeurs se rapprochent. Par ailleurs, la quantité des molécules extraites est supérieure dans les feuilles (42.107%) par rapport aux autres organes.

On constate aussi la tendance d'extraire plus de composés avec l'eau qu'avec les autres solvants. Cela peut s'expliquer par le simple fait que l'eau est un solvant fortement polaire connu pour extraire une large gamme de molécules dont une quantité importante de composés non phénoliques comme les glucides et les protéines (Bonnaillie *et al.*, 2012).

2.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

2.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques

2.2.1.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Les différents extraits bruts, obtenus par extraction solide-liquide, ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en polyphénols. Les résultats sont exprimés en terme d'équivalents acide gallique à l'aide d'une courbe étalon (Figure 38).

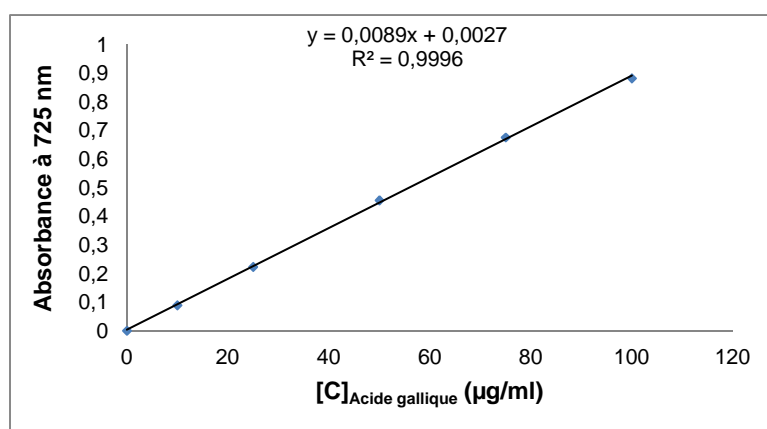


Figure 38. Courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

En se basant sur les valeurs d'absorbance des diverses solutions d'extraits, ayant réagi avec le réactif de Folin-Ciocalteu et comparées à la solution étalon en équivalence d'acide gallique, les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux sont résumés dans le tableau 9 et sont représentés sur la figure 42.

Tableau 9. Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g), en flavonoïdes (mg EC/g), en flavonols (mg EQ/g), et en tanins condensés (mg EC/g) des différents extraits obtenus par ESL

Extraits bruts		Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Flavonols	Tanins condensés		
Acétone 70%	<i>A. radiata</i>	Fe	129.121±0.764	56.482±0.091	10.472±0.047	5.978±0.112	
		Fl	208.572±0.233	148.292±0.249	5.077±0.373	1.048±0.063	
		T	78.088±0.864	43.724±0.046	2.288±0.047	1.311±0.024	
	<i>R. vesicarius</i>	Pa	176.599±1.546	109.712±0.199	7.048±0.045	46.771±0.398	
		<i>A. radiata</i>	Fe	95.513±7.908	50.250±0.000	7.231±0.425	6.758±0.714
			Fl	198.951±21.505	164.486±0.843	8.058±0.773	1.549±0.051
T	98.618±7.770		52.220±0.537	3.384±0.232	0.769±0.153		
<i>R. vesicarius</i>	Pa	43.278±0.280	19.721±0.374	2.679±0.023	4.336±0.192		
	<i>A. radiata</i>	Fe	123.430±2.240	78.136±1.423	0.386±0.014	1.147±0.043	
		Fl	171.724±3.956	122.000±0.823	0.936±0.140	0.494±0.086	
T		77.839±4.099	35.210±0.050	0.884±0.036	0.000±0.000		
Infusé	<i>R. vesicarius</i>	Pa	70.150±1.692	32.688±0.971	1.480±0.026	2.283±0.055	

Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures \pm standard de déviation. Fe : feuilles ; Fl : fleurs ; T : tiges ; Pa : partie aérienne ; Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique

Les résultats montrent que les teneurs en polyphénols totaux varient considérablement entre les extraits des différentes parties étudiées d'*A. radiata*. L'acétone aqueux possède les teneurs les plus élevées, avec des valeurs allant de 78.088 \pm 0.864 mg EAG/g jusqu'à 208.572 \pm 0.233 mg EAG/g de matière végétale sèche. Considérant les organes, les fleurs accusent les teneurs les plus importantes en ces composés. La répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une même plante a été rapportée par plusieurs auteurs (Falleh *et al.*, 2007 ; N'Guessan *et al.*, 2011 ; El-Haci *et al.*, 2012). L'extrait hydro-acétonique de *R. vesicarius* était également riche en polyphénols (176.599 \pm 1.546 mg EAG/g).

Le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane *et al.*, 2006). Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha *et al.*, 2007).

Ce test, basé sur une réaction d'oxydo-réduction, peut être également considéré comme une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante (Prior *et al.*, 2005). De ce fait, les

extraits les plus riches en composés phénoliques peuvent être également considérés comme les plus antioxydants.

2.2.1.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits bruts a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium. Les résultats sont exprimés en terme d'équivalents catéchine à l'aide d'une courbe étalon (**Figure 39**).

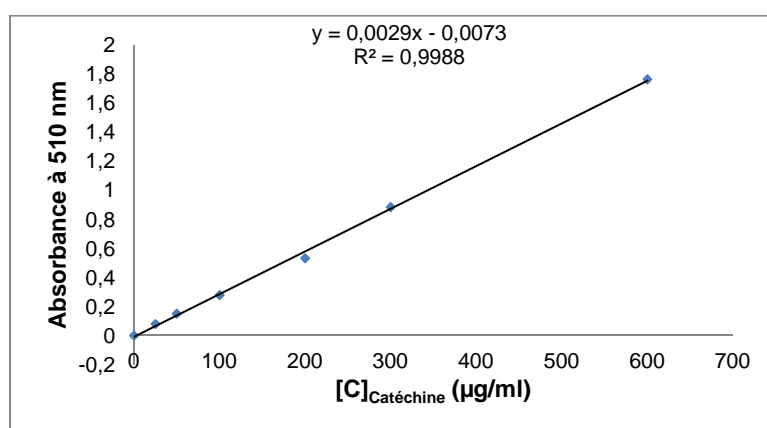


Figure 39. Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

Les résultats, présentés dans le tableau 9, montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents organes. La grande distinction entre les parties étudiées apparait au niveau de la richesse de certaines et la pauvreté des autres ; les fleurs d'*A. radiata* enregistrent un maximum de flavonoïdes (144.926 mg EC/g en moyenne) tandis que les feuilles et les tiges renferment des teneurs 2.352 à 3.315 fois plus faibles (soit 61.622 et 43.718 mg EC/g en moyenne, respectivement). Ces résultats sont en concordance avec les travaux de **Mahmoudi et al. (2013)**.

En ce qui concerne le solvant d'extraction, le méthanol aqueux reste le meilleur extracteur des flavonoïdes contenant dans l'espèce *A. radiata*, soit en moyenne 88.985 mg EC/g contre 82.832 mg EC/g et 78.448 mg EC/g pour l'acétone aqueux et l'eau chaude, respectivement. Alors que pour l'espèce *R. vesicarius*, l'acétone aqueux enregistre la teneur la plus élevée (109.712 ± 0.199 mg EC).

2.2.1.3. Détermination de la teneur en flavonols

La méthode au trichlorure d'aluminium a été utilisée pour quantifier les flavonols dans les différents extraits. Les résultats sont exprimés en terme d'équivalents quercétine à l'aide d'une courbe étalon (**Figure 40**).

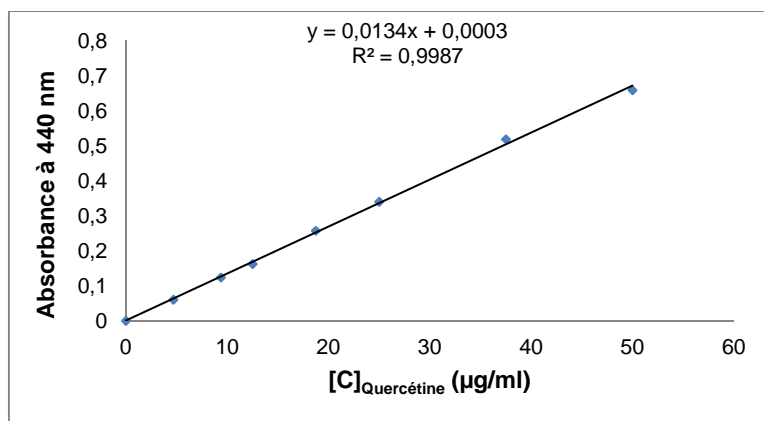


Figure 40. Courbe étalon de la quercétine pour le dosage des flavonols

Les résultats présentés dans le tableau 9 montrent bien que ces composés sont présents dans tous les extraits avec des concentrations variantes (de 0.386 ± 0.014 à 10.472 ± 0.047 mg EQ/g MS) selon l'organe et le solvant utilisé pour l'extraction. Le méthanol aqueux possède la teneur la plus élevée pour l'espèce *A. radiata* avec en moyenne 6.224 mg EQ/g contre 5.946 mg EQ/g et 0.735 mg EQ/g pour l'acétone aqueux et l'eau, respectivement. Par ailleurs, c'est l'extrait hydro-acétonique de l'espèce *R. vesicarius* qui a enregistré la teneur la plus élevée en flavonols (7.048 ± 0.045 mg EQ/g).

2.2.1.4. Détermination de la teneur en tanins condensés

Les tanins condensés, ou proanthocyanidines, ont été déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. Les résultats sont exprimés en terme d'équivalents catéchine à l'aide d'une courbe étalon (**Figure 41**).

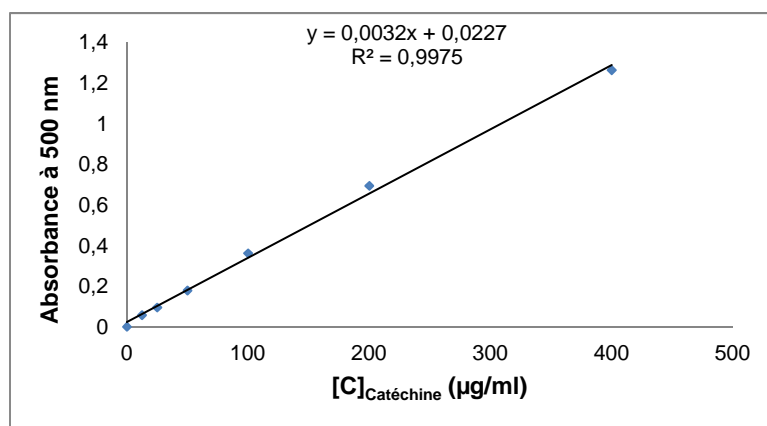


Figure 41. Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

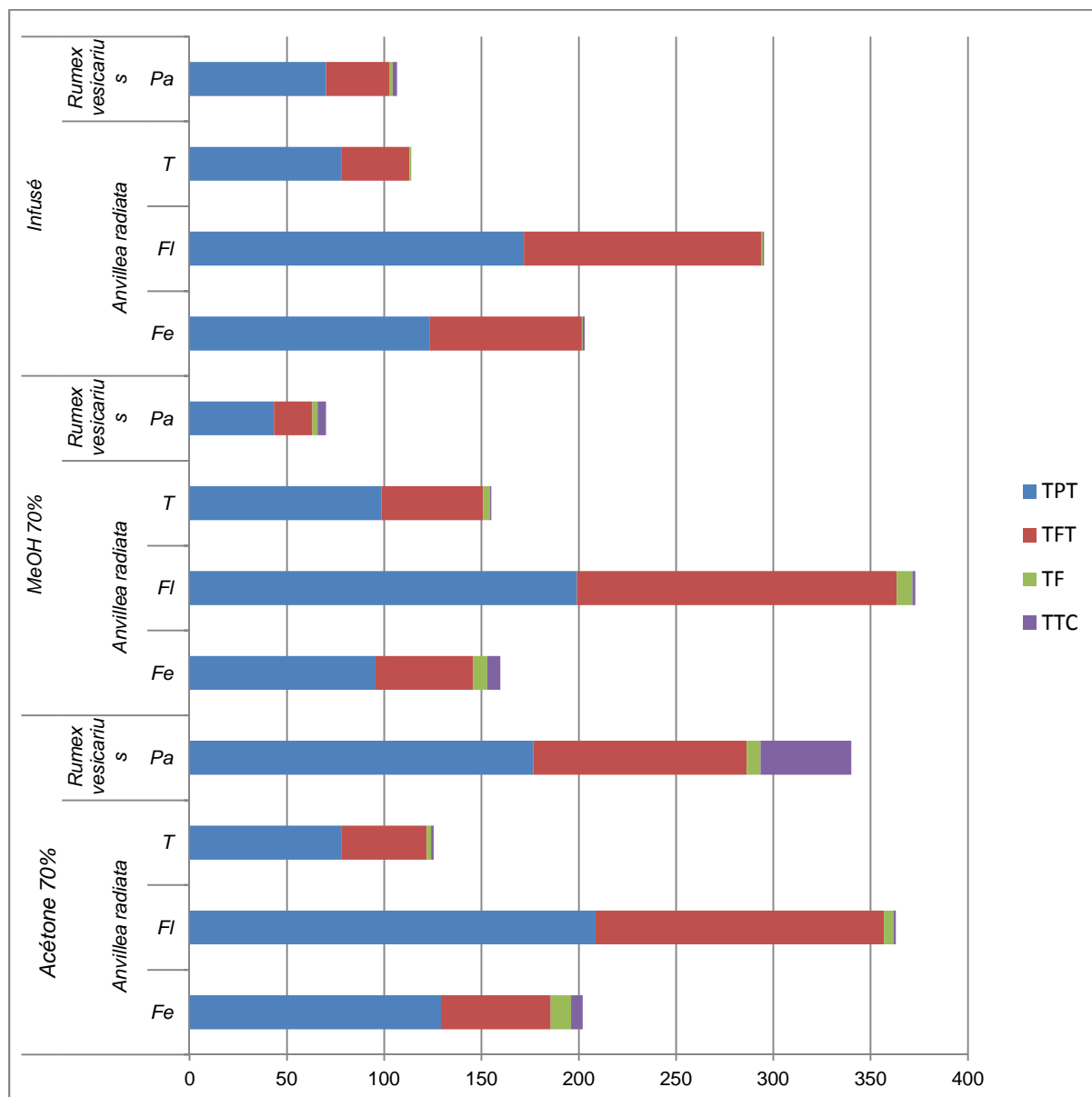
On peut remarquer du tableau 9 que, quelque soit l'organe étudié, l'acétone aqueux possède les teneurs les plus élevées en tanins condensés, suivi du méthanol et de l'infusé aqueux. *Rumex vesicarius* s'est avérée riche en ces molécules présentant ainsi des valeurs allant de 2.283 ± 0.055 à 46.771 ± 0.398 mg EC/g MS. En outre, considérant les différents organes étudiés, nos résultats révèlent que les tanins condensés sont essentiellement localisés dans les feuilles d'*Anvillea radiata* (4.628 mg EC/g MS, en moyenne). Les tiges sont très pauvres en ces molécules avec une valeur 6 fois inférieure à celle évaluée pour les feuilles.

Selon Bruneton (2009), l'extraction des tanins est, en règle générale, réalisée par un mélange d'eau et d'acétone ce qui explique nos résultats. Seigler et ses collaborateurs, en faisant l'extraction de quatre espèces d'Acacia du Mexique et du Texas, ont eux aussi montré que l'acétone à 70% dans l'eau donne un meilleur rendement que l'eau ou le méthanol à 80% (Seigler et al., 1986).

L'acétone possède la capacité de solubiliser les proanthocyanidines qui ne sont pas solubles dans le méthanol (Kennedy, 2002 ; Nacz et Shahidi, 2006). Mais le problème selon Rosales (1999) et Jokić et al. (2010) est que l'eau et l'acétone, spécialement à hautes températures, extraient aussi des substances indésirables comme les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques qui causent des interférences lors du dosage des tanins.

Au vu des résultats présentés ci-dessus, il ressort que l'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs. Elle dépend à la fois du solvant d'extraction et de la nature de l'organe étudié. Pour cela, la sélection d'un système de solvant approprié reste l'une des étapes les plus importantes dans l'optimisation d'extraction des polyphénols, des flavonoïdes et d'autres composés antioxydants (Zhao et al., 2006b).

L'examen de l'ensemble des résultats est résumé dans la figure 42.



TPT : Teneur en polyphénols totaux ; TFT : Teneur en flavonoïdes totaux ; TF : Teneur en flavonols ; TTC : Teneur en tanins condensés ; Fe : feuilles ; Fl : fleurs ; T : tiges ; Pa : partie aérienne ; Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique

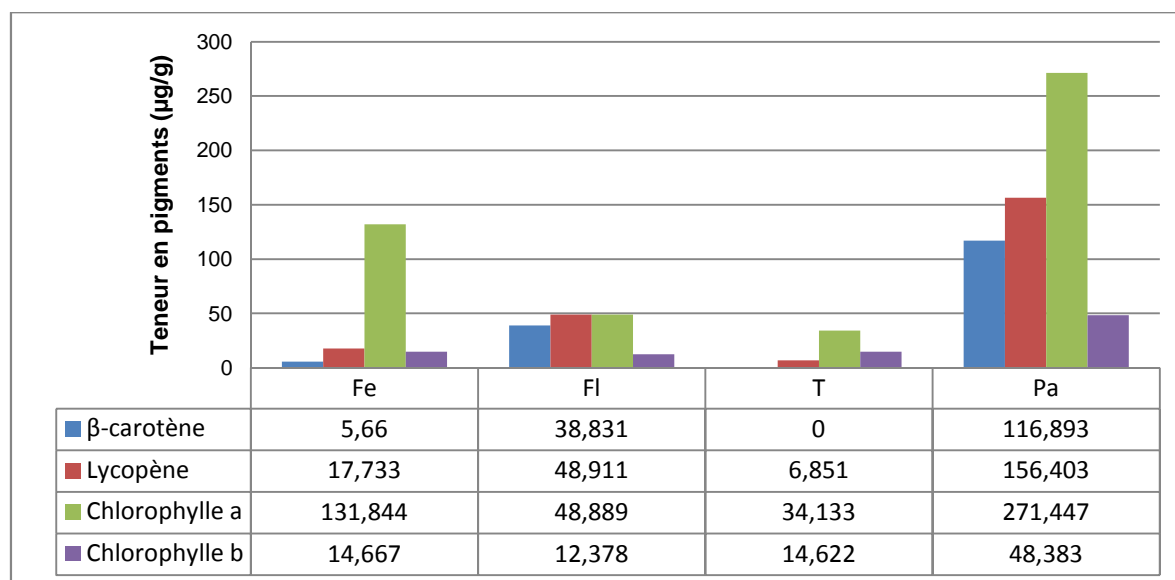
Figure 42. Détermination du contenu en composés phénoliques des différents extraits obtenus par ESL

2.2.2. Détermination de la teneur en pigments liposolubles

En examinant les résultats illustrés dans la figure 43, nous signalons la richesse de *Rumex vesicarius* en β -carotène ($116.893 \pm 1.602 \mu\text{g/g MS}$), en lycopène ($156.403 \pm 1.592 \mu\text{g/g MS}$) et en chlorophylle a ($271.447 \pm 3.457 \mu\text{g/g MS}$). Par contre, en comparant les différents

organes d'*A. radiata*, nous remarquons que les fleurs contiennent une teneur élevée en β -carotène ($38.831 \pm 0.927 \mu\text{g/g MS}$) et en lycopène ($48.911 \pm 0.567 \mu\text{g/g MS}$), tandis que les feuilles sont riches en chlorophylle a ($131.844 \pm 1.267 \mu\text{g/g MS}$). Ces composés mineurs confèrent aux deux plantes des qualités nutritionnelles et thérapeutiques importantes (**Saleh et al., 1993 ; Al-Rumaih et al., 2002 ; Alfawaz, 2006 ; Filho et al., 2008 ; Bélanger et al., 2010**).

Bhaskarachy et al. (1995) et **Bélanger et al. (2010)** ont rapporté, dans leurs travaux portés sur *R. vesicarius* que la teneur en β -carotène par rapport à la matière végétale fraîche est de $26 \mu\text{g/g}$ et $45 \mu\text{g/g}$, respectivement, mais aucun travail n'a été réalisé sur le contenu en caroténoïdes ou en chlorophylle par rapport à la matière végétale sèche, ce qui rend difficile de comparer nos résultats.



Fe : feuilles ; Fl : fleurs ; T : tiges ; Pa : partie aérienne

Figure 43. Teneur en pigments liposolubles contenus dans les différents organes testés ($\mu\text{g/g MS}$)

Des études épidémiologiques montrent l'influence favorable de la consommation des fruits et légumes riches en caroténoïdes pour la prévention de certaines pathologies dégénératives (**Rémésy, 2005**). Le β -carotène, outre son activité provitaminique A, et les autres caroténoïdes (lycopène, canthaxanthine, astaxanthine, lutéine, zéaxanthine) ont une activité antioxydante bien établie *in vitro*. Ils neutralisent notamment l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et les radicaux hydroperoxydes $\text{ROO}\cdot$. Des travaux récents suggèrent qu'ils ont aussi un effet sur l'expression génique (**Beaudeau et Durand, 2011**).

Contrairement au β -carotène et au lycopène qui appartiennent à la famille des caroténoïdes, la chlorophylle constitue à elle seule une famille. Aujourd'hui, nous pouvons distinguer plus de 50 chlorophylles différentes. Toutefois, la chlorophylle a et b restent majoritaires et dominent le marché des colorants alimentaires (**Ben Mansour et Latrach Tlemcani, 2009**).

Cette molécule est décrite par plusieurs auteurs (**Kato et al., 1983 ; Dashwood et al., 1991 ; Warner et al., 1991**) pour son pouvoir antimutagène vis-à-vis des carcinogènes chimiques et biologiques, en particulier le benzo(a)pyrène. En effet, cette molécule accélère la dégradation du carcinogène ultime (époxyde) issu de la métabolisation du benzo(a)pyrène (**Ferruzzi et al., 2002**). Un autre travail a montré une amélioration remarquable chez 47 patients sur une totalité de 50 patients souffrant d'un ulcère chronique, suite à l'utilisation d'un onguent contenant les dérivés hydrosolubles de la chlorophylle (**Cady et Morgan, 1984**).

2.3. Etude des activités biologiques des extraits bruts

2.3.1. Evaluation du potentiel antioxydant des extraits

A travers nos recherches bibliographiques et compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il apparaît clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de six tests chimiques. Le principe de ceux-ci repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques.

Dans ce qui suit, nous présentons les résultats du potentiel antioxydant des extraits bruts sélectionnés pour cette étude.

2.3.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des extraits bruts est exprimée en nombre d'équivalents d'acide gallique à partir d'une courbe d'étalonnage, établie en utilisant l'acide gallique comme référence (**Figure 44**). A la différence des autres tests, la CAT permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E, ...) (**Prieto et al., 1999**).

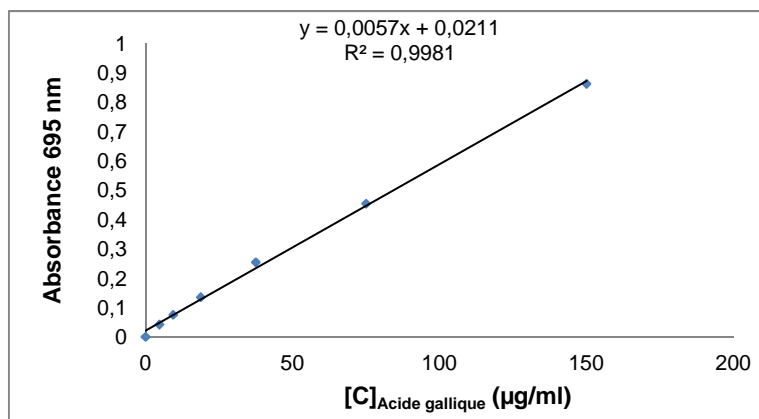
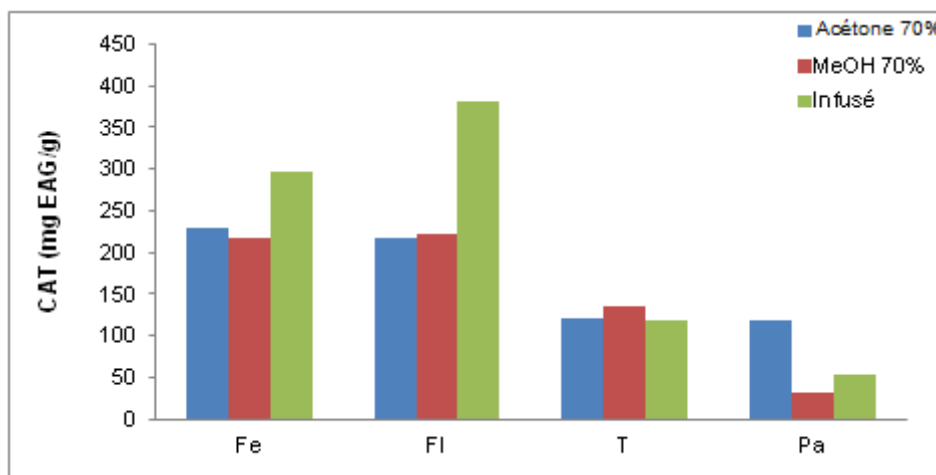


Figure 44. Courbe étalon de l'acide gallique pour la mesure de la capacité antioxydante

L'estimation de la capacité antioxydante totale des extraits bruts a montré une importante variabilité en fonction de l'organe étudié et la nature du solvant utilisé pour l'extraction (**Figure 45**). En outre, les extraits d'*Anvillea radiata* présentent les teneurs les plus élevées avec 381.551 ± 4.982 mg EAG/g et 298.147 ± 4.137 mg EAG/g pour les infusés aqueux des fleurs et feuilles, respectivement. L'extrait hydro-méthanolique de *Rumex vesicarius* a présenté la teneur la plus faible de l'ordre de 32.969 ± 4.405 mg EAG/g. Le tableau 10 rassemble les valeurs obtenues par cette analyse.



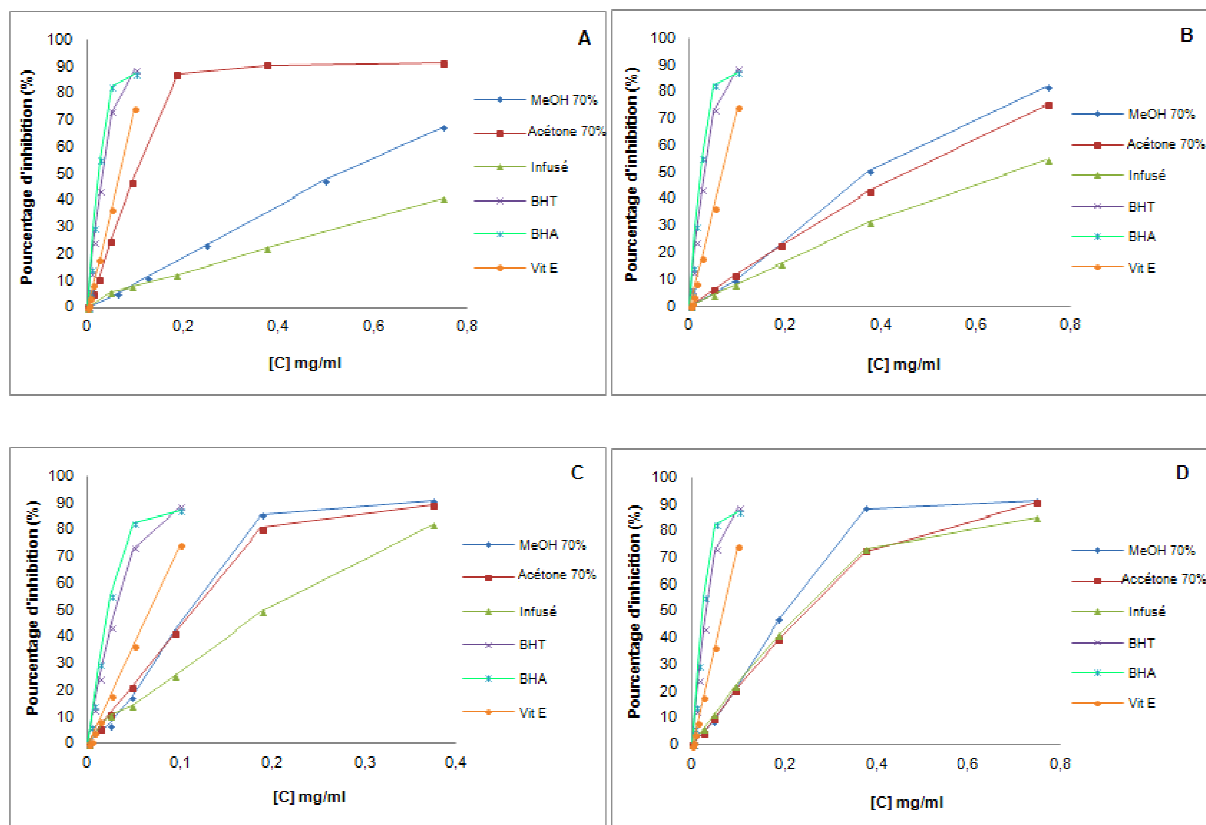
CAT : capacité antioxydante totale ; Fe : feuilles ; Fl : fleurs ; T : tiges ; Pa : partie aérienne de *R. vesicarius* ;
Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique

Figure 45. Capacité antioxydante totale, exprimée en mg EAG/g MS, des extraits bruts

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'activité antioxydante totale des extraits de ces deux espèces. Pour cela, il est difficile, voire impossible de comparer nos résultats avec les travaux antérieurs.

2.3.1.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant (PI %), nous avons établi les profils d'activité antiradicalaire présentés dans la figure 46, et c'est à partir de ces profils que nous avons déduit la valeur correspondante à la CI_{50} (la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres).



MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique ; Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; Vit E : α -tocophérol ; (A) : La partie aérienne de *R. vesicarius* ; (B) : Les feuilles d'*A. radiata* ; (C) : Les fleurs d'*A. radiata* ; (D) : Les tiges d'*A. radiata*

Figure 46. Profils de l'activité antiradicalaire (test DPPH•) des extraits bruts

Les profils de l'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits testés possèdent une activité dose-dépendante. La présence d'une phase stationnaire signifie une réduction presque totale du radical DPPH• en sa forme non radicalaire DPPH-H.

L'extrait hydro-acétonique de l'espèce *R. vesicarius* a montré un pouvoir réducteur plus important par rapport aux autres extraits. A une concentration de 0.375 mg/ml, il a atteint un pourcentage d'inhibition égale à 90.580%, alors que les extraits hydro-méthanolique et

aqueux n'ont atteint que 35.182% et 22.141% à cette même concentration. Par contre, chez *A. radiata*, se sont les extraits hydro-méthanoliques qui expriment les meilleures pourcentages à neutraliser le radical DPPH•.

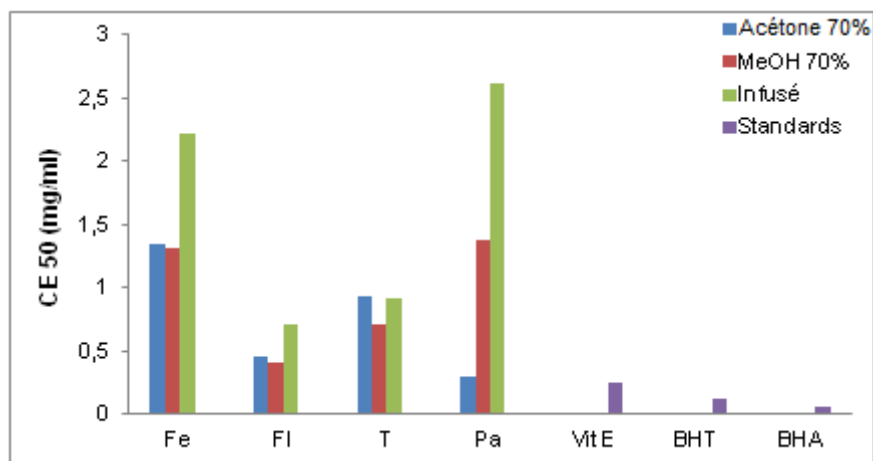
Indépendamment de la nature du solvant, la comparaison des profils de l'activité antiradicalaire des différents organes d'*A. radiata* a permis de distinguer que les extraits des fleurs présentent des pourcentages significativement plus importants.

Les valeurs des CI_{50} , présentées dans le tableau 10, nous permettent d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits. Nous rappelons que plus la valeur de la CI_{50} est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres. Deux groupes peuvent ainsi être distingués : un premier ayant des valeurs supérieures ou égales à 0.380 mg/ml (c'est le cas de l'infusé aqueux de *R. vesicarius* et des différents extraits des feuilles d'*A. radiata*), et un deuxième groupe ayant des valeurs inférieures ou égales à 0.250 mg/ml (c'est le cas de l'extrait hydro-acétonique de *R. vesicarius* et des différents extraits des fleurs et des tiges d'*A. radiata*). On constate que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs.

En comparaison avec les antioxydants standards, les extraits bruts testés s'avèrent moins actifs.

2.3.1.3. Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)

Par analogie à la capacité antiradicalaire, la comparaison des concentrations efficaces (CE_{50}) des extraits a révélé une variabilité significative corroborée à l'effet du solvant d'extraction et l'organe de la plante étudié (**Figure 47**). En effet, les extraits hydro-acétonique de la partie aérienne de *R. vesicarius* et hydro-méthanolique des fleurs d'*A. radiata* présentent les valeurs les plus faibles en CE_{50} (0.290 ± 0.002 mg/ml et 0.401 ± 0.002 mg/ml, respectivement). Ces valeurs reflètent la capacité de ces extraits à réduire les ions Fe^{3+} . Cette dernière est moins importante dans les tiges d'*A. radiata*, avec des CE_{50} inférieures ou égales à 0.920 mg/ml. Quant aux feuilles, l'activité réductrice des ions ferriques était plus basse (CE_{50} supérieures à 1.310 mg/ml) (**Tableau 10**).



Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique ; Fe : feuilles ; FI : fleurs ; T : tiges ; Pa : partie aérienne ; Vit E : α -tocophérol ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole butylé

Figure 47. Pouvoir réducteur des ions ferriques, exprimé en CE_{50} (mg/ml), des extraits bruts

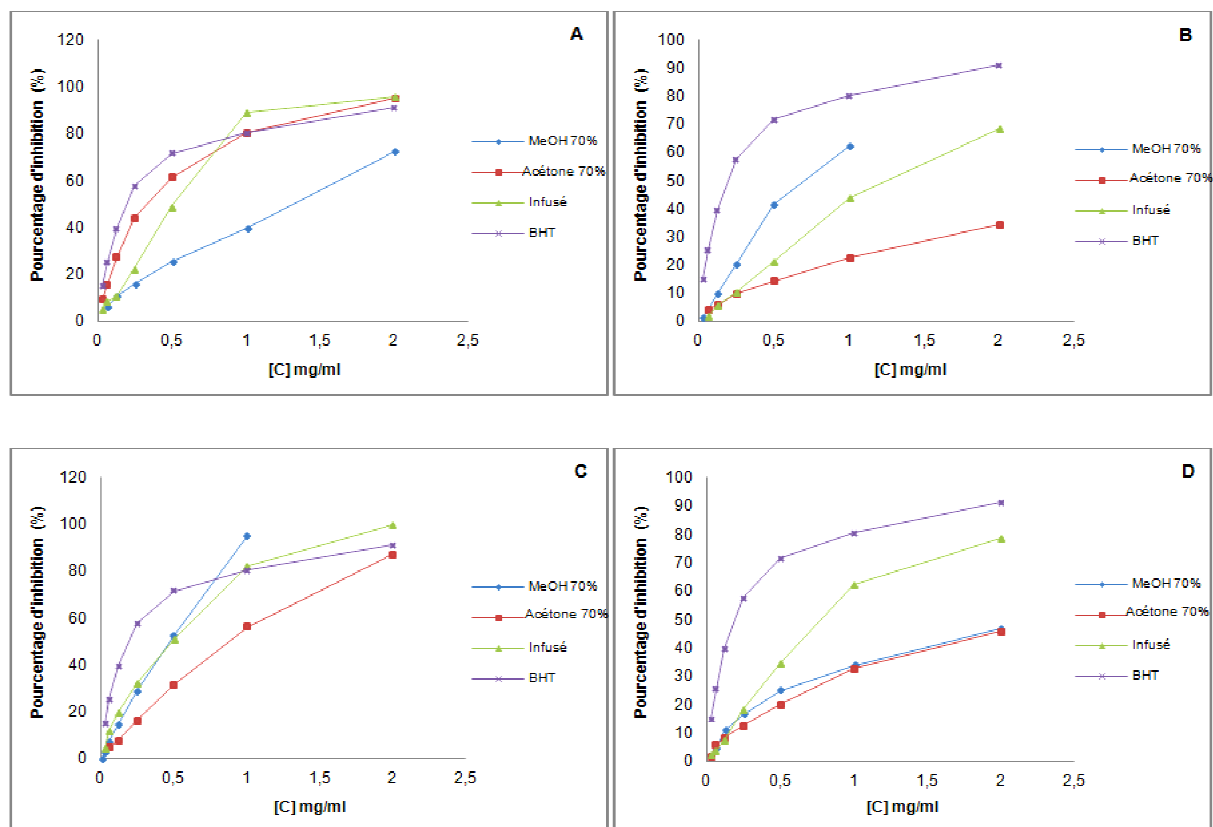
Ces résultats sont tout à fait semblables aux résultats obtenus par le test DPPH \bullet . Cette ressemblance est due certainement au mécanisme des réactions mises en jeu (transfert d'électrons).

2.3.1.4. Piégeage du radical-cation ABTS $^{+\bullet}$

L'activité antioxydante des différents extraits est déduite de leur capacité à inhiber le radical ABTS $^{+\bullet}$, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence : le BHT.

La figure 48 illustre les courbes représentatives du pourcentage d'inhibition du radical en fonction des concentrations des extraits testés. De ces courbes est déduite la CI_{50} , la concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres.

A une concentration de 1 mg/ml, les infusés aqueux des fleurs d'*A. radiata* et de la partie aérienne de *R. vesicarius* révèlent une activité intéressante, comparable à celle du standard utilisé (BHT), avec une inhibition de plus de 82% du radical ABTS $^{+\bullet}$. A une concentration plus élevée (2 mg/ml), ces deux organes dépassent les 95% avec les extraits hydro-alcooliques. Les feuilles et les tiges d'*A. radiata*, montrent des activités nettement inférieures.



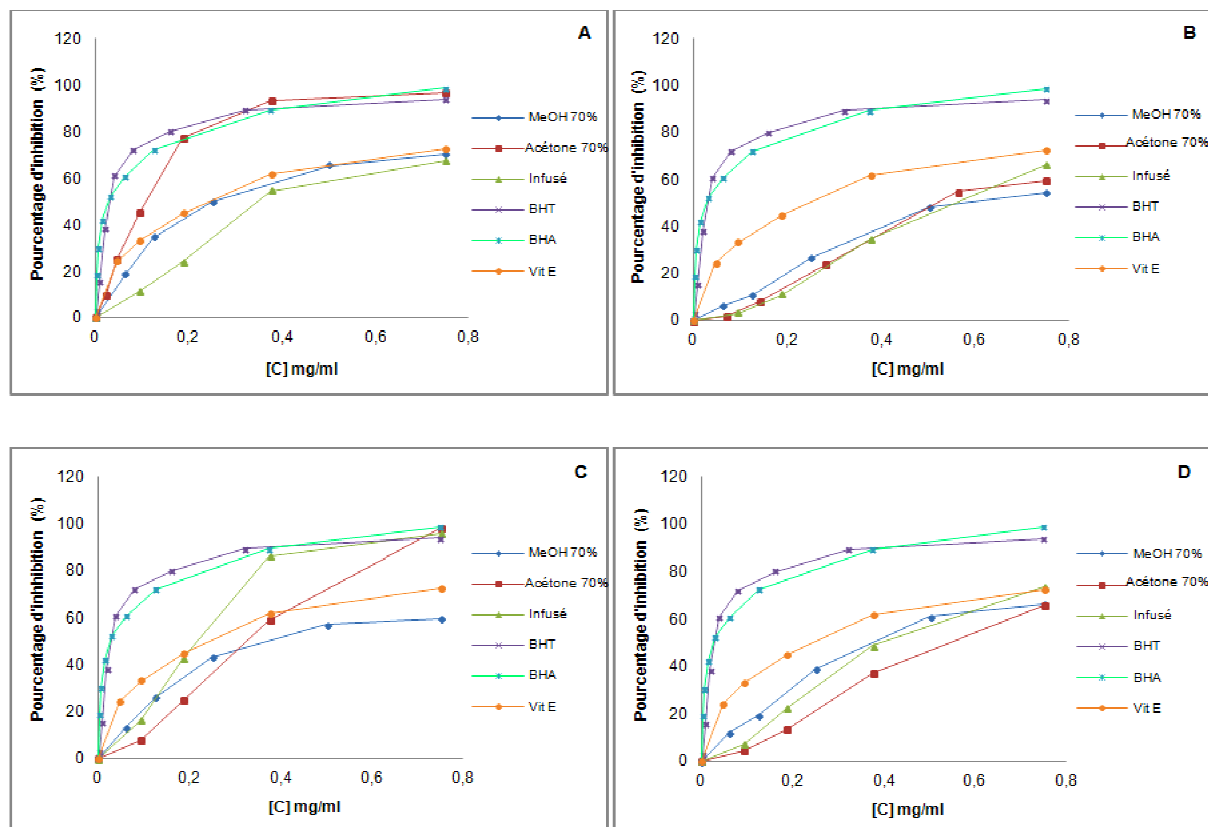
MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique ; Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; BHT : hydroxytoluène butylé ;
 (A) : La partie aérienne de *R. vesicarius* ; (B) : Les feuilles d'*A. radiata* ; (C) : Les fleurs d'*A. radiata* ; (D) : Les tiges d'*A. radiata*

Figure 48. Profils de l'activité antiradicalaire (test ABTS^{•+}) des extraits bruts

Les valeurs des CI_{50} sont représentées dans le tableau 10. Considérant les organes testés d'*A. radiata* et en comparaison avec les différents solvants utilisés, l'extrait hydro-méthanolique des fleurs a présenté la meilleure capacité à neutraliser le radical ABTS^{•+}, avec une CI_{50} égale à 0.486 ± 0.038 mg/ml. Par contre, pour l'espèce *R. vesicarius*, c'est l'extrait hydro-acétonique qui s'est révélé le plus actif ($CI_{50} = 0.278 \pm 0.001$ mg/ml).

2.3.1.5. Inhibition du blanchiment de β -carotène

La décomposition des acides gras est une des causes principales de détérioration de la nourriture. La lutte contre l'oxydation des lipides, par l'utilisation des conservateurs naturels, représente donc un enjeu considérable pour les industries alimentaires. C'est dans ce contexte que nous avons évalué l'activité antioxydante des deux plantes : *Anvillea radiata* et *Rumex vesicarius*. Les données expérimentales obtenues par le test de blanchiment de β -carotène sont représentées dans la figure 49. Les valeurs des CI_{50} ont été calculées par la suite et sont présentées dans le tableau 10.



MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique ; Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; Vit E : α -tocophérol ; (A) : La partie aérienne de *R. vesicarius* ; (B) : Les feuilles d'*A. radiata* ; (C) : Les fleurs d'*A. radiata* ; (D) : Les tiges d'*A. radiata*

Figure 49. Profils de l'activité inhibitrice (test de blanchiment de β -carotène) des extraits bruts

Il est évident que tous les extraits testés inhibent l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène. A une concentration de 0.75 mg/ml, les extraits hydro-acétoniques des fleurs d'*A. radiata* et de la partie aérienne de *R. vesicarius* révèlent une puissante activité inhibitrice supérieure à celle de l' α -tocophérol et qui dépasse les 96%. Les autres extraits présentent à cette même concentration un pourcentage nettement inférieur.

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus pour cette activité affiche une nette hétérogénéité de son efficacité aussi bien en fonction de l'organe étudié que du solvant d'élution. Considérant le premier paramètre, une tendance similaire à celle du pouvoir réducteur est décelée (**Tableau 10**). En effet, les fleurs d'*A. radiata* affichent des CI_{50} plus faibles, comprises entre 0.192 ± 0.005 et 0.355 ± 0.007 mg/ml, en les comparant avec les autres organes. Par ailleurs, l'extrait hydro-acétonique de *R. vesicarius* a démontré le pouvoir anti-radicalaire le plus élevé avec une CI_{50} égale à 0.095 ± 0.001 mg/ml, une activité qui est significativement supérieure à celle de l' α -tocophérol ($CI_{50} = 0.238 \pm 0.007$ mg/ml). Il

existe probablement des différences qualitatives dans la nature des composés phénoliques extraits influençant le pouvoir antioxydant des deux espèces.

Selon **Liyana-Pathirana et Shahidi (2006)**, un extrait qui inhibe ou retarde le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire.

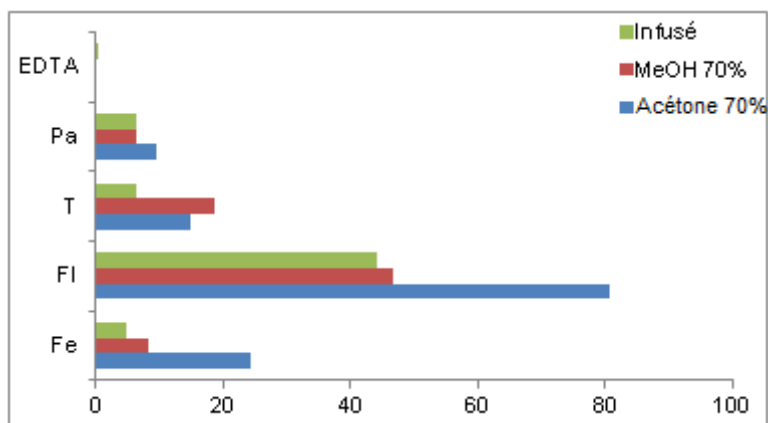
Tableau 10. Résultats de la capacité antioxydante totale (exprimé en mg EAG/g MS) et des valeurs des CI_{50} et des CE_{50} (exprimées en mg/ml) des différents extraits bruts

Extraits bruts- Standards		CAT (mg EAG/g)	* $CI_{50}/DPPH$	* $CE_{50}/FRAP$	* $CI_{50}/ABTS$	CI_{50}/β -Carotène	$CI_{50}/Chélation$ de fer	
Acétone 70%	<i>A. radiata</i>	Fe	228.785±31.025	0.477±0.015	1.339±0.002	3.078±0.010	0.519±0.013	24.213±4.251
		Fl	218.499±9.103	0.115±0.002	0.458±0.002	0.868±0.055	0.306±0.004	80.787±10.366
		T	120.961±16.552	0.253±0.004	0.927±0.012	2.407±0.517	0.530±0.055	14.913±1.703
	<i>R. vesicarius</i>	Pa	117.726±12.547	0.106±0.001	0.290±0.002	0.278±0.001	0.095±0.001	9.361±1.099
MeOH 70%	<i>A. radiata</i>	Fe	216.493±23.154	0.385±0.045	1.310±0.025	0.595±0.012	0.647±0.004	8.169±0.368
		Fl	221.186±1.316	0.113±0.001	0.401±0.002	0.486±0.038	0.355±0.007	46.639±18.354
		T	136.291±11.575	0.212±0.006	0.717±0.002	3.500±0.460	0.370±0.013	18.637±1.078
	<i>R. vesicarius</i>	Pa	32.969±4.405	0.558±0.002	1.380±0.009	1.299±0.001	0.258±0.008	6.478±0.403
Infusé	<i>A. radiata</i>	Fe	298.147±4.137	0.670±0.002	2.224±0.077	1.143±0.038	0.512±0.010	4.827±0.491
		Fl	381.551±4.982	0.212±0.000	0.709±0.013	0.521±0.082	0.192±0.005	44.293±10.113
		T	119.075±6.636	0.246±0.003	0.918±0.000	0.784±0.020	0.401±0.004	6.212±0.677
	<i>R. vesicarius</i>	Pa	53.263±4.374	1.002±0.008	2.614±0.002	0.545±0.012	0.347±0.004	6.324±0.076
α- tocophérol (Vit E)		-	0.068±0.009	0.242±0.006	-	0.238±0.007	-	
BHT		-	0.032±0.000	0.117±0.003	0.199±0.013	0.034±0.002	-	
BHA		-	0.022±0.004	0.064±0.001	-	0.030±0.002	-	
EDTA		-	-	-	-	-	0.033±0.002	

* Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures \pm standard de déviation ; CE_{50} = concentration effective à laquelle l'absorbance est égale à 0.5 ; CI_{50} = concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres ; CAT : capacité antioxydante totale ; Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique ; Vit E : α -tocophérol ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique ; - : non déterminé

2.3.1.6. Chélation des ions ferreux

La capacité des extraits de *R. vesicarius* et d'*A. radiata* à chélater les ions ferreux est présentée dans la figure 50.



Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique ; Fe : feuilles ; FI : fleurs ; T : tiges ; Pa : partie aérienne ; EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

Figure 50. Pouvoir chélateur des ions ferreux, exprimé en Cl_{50} (mg/ml), des différents extraits et du standard de référence (EDTA)

Selon cette figure, et contrairement aux résultats d'essais précédents, l'infusé aqueux des feuilles d'*A. radiata* chélate les ions ferreux plus efficacement que les autres extraits. Les valeurs de la Cl_{50} , présentées dans le tableau 10, varient de 6.324 ± 0.076 mg/ml à 9.361 ± 1.099 mg/ml pour l'espèce *R. vesicarius*, et de 4.827 ± 0.491 mg/ml à 80.787 ± 10.366 mg/ml pour les différents organes d'*A. radiata*, contre seulement 0.033 ± 0.002 mg/ml pour la molécule de référence (EDTA).

La capacité chélatrice est très importante du fait qu'elle réduit la concentration de métaux de transitions catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxydes et alcoxydes qui peuvent à leur tour entretenir la réaction en chaîne (Elmastaş et al., 2006). Il a été rapporté que les agents chélateurs qui forment une liaison de type σ avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique (Suresh-Kumar et al., 2008).

2.3.2. Relation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits bruts

En combinant les résultats de cette étude, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une relation étroite entre la teneur en composés phénoliques des extraits bruts et leurs activités antioxydantes. L'étude de cette relation a été réalisée par la mesure du coefficient de corrélation linéaire, dit de *Bravais-Pearson* (ou de *Pearson* ; ρ). Ce dernier est compris entre -1 et 1. Un signe négatif indique que y varie en sens inverse de x, on parle alors de

corrélation négative. Si le coefficient est proche de 0, les deux variables sont linéairement indépendantes tandis qu'une liaison linéaire est d'autant plus marquée que le coefficient s'approche de 1 ou de -1. En outre, la corrélation d'une variable avec elle-même est égale à 1 (da Silva et al., 2011 ; Rakotomalala, 2012). Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 11. Coefficients de corrélation linéaire (ρ) entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits bruts

ρ	TPT	TFT	TF	TTC	CAT	Cl ₅₀ /DPPH	CE ₅₀ /FRAP	Cl ₅₀ /ABTS	Cl ₅₀ /β-Carotène	Cl ₅₀ /Chélation de fer
TPT	1	0.970	0.416	0.264	0.611	-0.589	-0.582	-0.307	-0.372	0.774
TFT		1	0.317	0.161	0.581	-0.584	-0.579	-0.388	-0.388	0.790
TF			1	0.375	0.065	-0.313	-0.370	0.139	0.129	0.245
TTC				1	-0.206	-0.243	-0.312	-0.270	-0.491	-0.220
CAT					1	-0.268	-0.157	-0.112	0.118	0.460
Cl ₅₀ /DPPH						1	0.977	-0.014	0.269	-0.516
CE ₅₀ /FRAP							1	0.000	0.403	-0.102
Cl ₅₀ /ABTS								1	0.365	-0.102
Cl ₅₀ /β-Carotène									1	-0.252
Cl ₅₀ /Chélation de fer										1

TPT : Teneur en polyphénols totaux ; TFT : Teneur en flavonoïdes totaux ; TF : Teneur en flavonols ; TTC : Teneur en tanins condensés ; CE₅₀ = concentration effective à laquelle l'absorbance est égale à 0.5 ; Cl₅₀ = concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres ; CAT : capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante des extraits semble être influencée par les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Ces derniers ont montré des coefficients élevés par rapports aux autres composés ($0.790 \geq \rho \geq -0.579$). Il est évident que la forte activité des extraits est attribuée à leur richesse aux composés phénoliques. En effet, les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. Ils pourraient donc être considérés comme de bons marqueurs de pouvoir antioxydant.

D'autre part, on remarque qu'il y a une bonne corrélation entre les valeurs d'Cl₅₀ des tests au DPPH et FRAP ($\rho = 0.977$), cela indique que les activités antioxydantes prouvées par ces deux tests sont assurées, probablement, par les mêmes molécules actives.

2.3.3. Le potentiel antimicrobien des extraits bruts

Pour caractériser l'activité antimicrobienne de nos extraits, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disques. C'est une technique qualitative basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition apparents autour des disques chargés d'extraits végétaux.

Nous rapportons dans le tableau 12 les diamètres des zones d'inhibition des extraits bruts d'*Anvillea radiata* et de *Rumex vesicarius* relatives aux souches microbiennes testées.

Tableau 12. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différents extraits relatives aux différentes souches selon la méthode des disques

Espèces végétales	Parties étudiées	Extraits (1 mg/disque)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)											
			Bactéries à Gram +			Bactéries à Gram -			Levures		Moisissures			
			<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans IP</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>F. oxysporum</i>	
<i>A. radiata</i>	Feuilles	Acétone 70%	6	13	6	6	6	6	6	7	6	6	6	
	Fleurs		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	Tiges		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
<i>R. vesicarius</i>	Partie aérienne*		6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
<i>A. radiata</i>	Feuilles		MeOH 70%	8	12	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Fleurs			6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Tiges	6		8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
<i>R. vesicarius</i>	Partie aérienne*	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
<i>A. radiata</i>	Feuilles	Infusé		6	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Fleurs			6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Tiges		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
<i>R. vesicarius</i>	Partie aérienne*		6	6	6	6	6	6	6	8	6	6	6	
DMSO (10 µl/disque)			6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
AK (30 µg/disc)			27	26	25	25	29	24	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	
CTX (30 µg/disc)			29	8	33	30	23	19	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	
CAZ (30 µg/disc)			16	6	21	23	24	10	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	
AMP (10 µg/disc)			27	6	Nt	15	6	6	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	
OX (1 µg/disc)			16	6	Nt	6	6	6	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	
Ny (30 µg/disc)			Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	16	20	22	35	14	

*feuilles, fleurs et tiges ; Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique ; DMSO : Diméthylsulfoxyde (contrôle négatif) ; Contrôles positifs : AK. Amikacine ; CTX. Céfotaxime ; CAZ. Céftazidime ; AMP. Ampicilline ; OX. Oxacilline ; Ny. Nystatine ; Nt : non testé

Les feuilles d'*A. radiata* présentent une certaine sensibilité contre *Bacillus cereus* avec des diamètres compris entre 8 et 13 mm. Les autres souches microbiennes se sont révélées résistantes à tous les extraits. Cela s'explique soit par l'absence des molécules fortement antimicrobiennes soit par la faible capacité des composés antibactériens, présents dans les différents extraits, à diffuser de manière uniforme à travers l'agar (Rauha *et al.*, 2000).

3. Criblage biologique des différentes fractions obtenues par extraction liquide-liquide

La méthodologie employée dans la recherche de principes actifs se base sur l'extraction et l'isolement des composés par le biais de protocoles orientés selon les résultats obtenus lors du criblage biologique. À l'heure actuelle, le méthanol est le solvant le plus employé. En fait, il a été utilisé afin d'obtenir des extraits riches en flavanones, flavones, flavone-glycosides, méthoxyflavones et flavones dimères (Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003).

Dans l'optique de séparer les extraits bruts hydro-méthanoliques en fractions de polarités différentes, nous avons opté pour un fractionnement liquide-liquide. Ce dernier comprend une extraction primaire hydroalcoolique ; après concentration le résidu aqueux est partagé contre des solvants à polarité croissante. Les analyses quantitatives réalisées sur les extraits bruts des différentes parties d'*A. radiata* nous ont permis de sélectionner les fleurs comme organe très riche en composés phénoliques. Ainsi, il nous a paru nécessaire de :

- Procéder à un fractionnement grossier des extraits hydro-méthanoliques des fleurs d'*A. radiata* et de la partie aérienne de *R. vesicarius* ;
- Evaluer l'effet des fractions obtenues sur la réduction des radicaux libres ;
- Corréler le pouvoir antioxydant des différentes fractions à leur contenu phytochimique ;
- Etudier leur pouvoir antimicrobien ;
- Déterminer le profil phytochimique des fractions actives.

3.1. Rendements en extraits

Le tableau 13 présente les pourcentages massiques ainsi que les couleurs des fractions obtenues à partir des extraits bruts hydro-méthanoliques des fleurs d'*Anvillea radiata* et de la partie aérienne de *R. vesicarius*.

Tableau 13. Pourcentages massiques (%) et couleurs des fractions obtenues par extraction liquide-liquide des extraits hydrométhanoliques

		FH	FC	FAE	FB	Faq
Rendement d'extraction (%)	<i>A. radiata</i>	0.051±0.027	1.906±0.546	3.546±2.707	4.186±0.540	20.588±5.957
Couleur des fractions	<i>A. radiata</i>	Jaune citron	Vert foncé	Vert clair	Jaune	Miel
Rendement d'extraction (%)	<i>R. vesicarius</i>	0.545±0.167	0.249±0.160	0.539±0.105	1.612±0.297	8.852±4.457
Couleur des fractions	<i>R. vesicarius</i>	Vert clair	Vert	Marron	Rouge brique	Miel

FH : Fraction hexanique ; FC : Fraction chloroformique ; FAE : Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq : Fraction aqueuse

En général, le rendement d'extraction augmente avec l'augmentation de polarité des solvants utilisés. Cette constatation a été observée pour l'espèce *A. radiata* où les rendements varient de 0.051 à 20.588%. Par ailleurs, la fraction chloroformique obtenue à partir de l'extrait hydro-méthanolique de *R. vesicarius* a représenté le rendement le plus faible (0.249%), cela est probablement dû à la faible solubilité des molécules au chloroforme. Un rendement plus élevé dans la fraction hexanique (0.545%) se justifie par la présence d'une quantité non négligeable d'acides gras (Tahiri et al., 2011).

3.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

3.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques

En se basant sur les valeurs d'absorbance des diverses solutions d'extraits et en se référant aux courbes d'étalonnage présentées précédemment (Figures 38-41), nous avons calculé les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols et en tanins condensés. Les résultats de ces analyses sont résumés dans le tableau 14.

La fraction acétate d'éthyle constitue dans les extraits d'*A. radiata* la fraction phénolique la mieux représentée (73.698 ± 3.092 mg EAG/g MS), suivie par les fractions aqueuses (67.691 ± 0.571 mg EAG/g MS) et butanolique (45.403 ± 7.613 mg EAG/g MS). La fraction chloroformique renferme seulement 3.801 ± 0.391 mg EAG/g MS, alors que la fraction hexanique ne contient que 0.115 ± 0.002 mg EAG/g MS.

Concernant l'espèce *R. vesicarius*, les résultats révèlent la richesse de la fraction butanolique en ces composés (12.404 ± 0.018 mg EAG/g MS), suivie par les fractions acétate d'éthyle (9.948 ± 0.009 mg EAG/g MS) et aqueuse (4.157 ± 0.325 mg EAG/g MS). La fraction hexanique présente également la valeur la plus basse.

Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tout les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres, des protéines, etc. (Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca et al., 2006). Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait.

Tableau 14. Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g), en flavonoïdes (mg EC/g), en flavonols (mg EQ/g), et en tanins condensés (mg EC/g) des différentes fractions

Espèces	Fractions	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Flavonols	Tanins condensés
<i>A. radiata</i> *	FH	0.115 ± 0.002	0.201 ± 0.002	0.045 ± 0.001	0.010 ± 0.001
	FC	3.801 ± 0.391	1.336 ± 0.026	0.371 ± 0.008	0.209 ± 0.004
	FAE	73.698 ± 3.092	47.394 ± 1.497	4.247 ± 0.907	-
	FB	45.403 ± 7.613	55.910 ± 1.022	2.123 ± 0.548	-
	Faq	67.691 ± 0.571	24.138 ± 0.227	1.536 ± 0.437	-
<i>R. vesicarius</i> **	FH	0.366 ± 0.011	1.976 ± 0.041	0.667 ± 0.011	0.018 ± 0.002
	FC	2.447 ± 0.006	1.780 ± 0.032	0.418 ± 0.005	0.177 ± 0.001
	FAE	9.948 ± 0.009	4.648 ± 0.068	1.009 ± 0.017	0.092 ± 0.013
	FB	12.404 ± 0.018	5.597 ± 0.038	1.086 ± 0.000	0.008 ± 0.002
	Faq	4.157 ± 0.325	3.175 ± 0.147	0.073 ± 0.002	0.342 ± 0.100

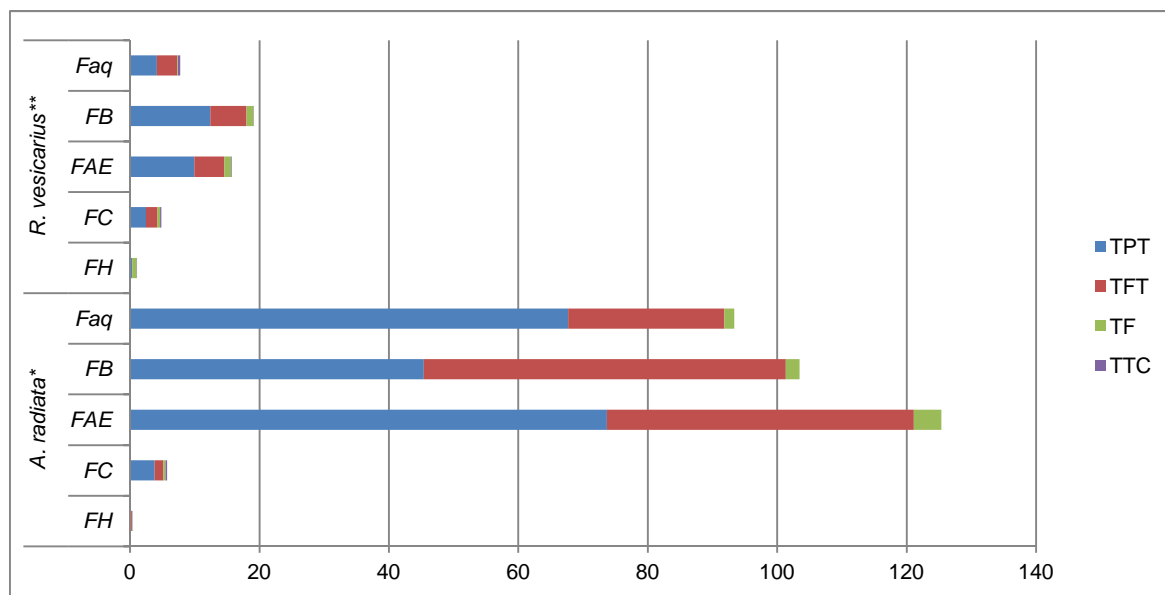
*Fleurs ; **Partie aérienne ; Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standard de déviation. FH : Fraction hexanique ; FC : Fraction chloroformique ; FAE : Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq : Fraction aqueuse.

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que les fractions butanolique et acétate d'éthyle sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs respectives de (55.910 ± 1.022 mg EC/g MS) et (47.394 ± 1.497 mg EC/g MS) pour les fleurs d'*A. radiata* et de (5.597 ± 0.038 mg EC/g MS) et (4.648 ± 0.068 mg EC/g MS) pour la partie aérienne de *R. vesicarius*. Cette même observation a été notée pour le dosage des flavonols. D'autre part, les fractions apolaires (hexanique et chloroformique) ont montré des valeurs voisines et sont pauvres en flavonoïdes.

Les teneurs en tanins condensés sont très faibles, voire absente dans les fractions FAE, FB et Faq.

En tenant compte de la sélectivité de chaque solvant utilisé pour le fractionnement on admet que les deux plantes étudiées sont riches en mono-, di- et tri-glycosides.

L'examen de l'ensemble de ces résultats est résumé dans la figure 51.



*Fleurs ; **Partie aérienne fleurie ; TPT : Teneur en polyphénols totaux ; TFT : Teneur en flavonoïdes totaux ; TF : Teneur en flavonols ; TTC : Teneur en tanins condensés ; FH : Fraction hexanique ; FC : Fraction chloroformique ; FAE : Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq : Fraction aqueuse.

Figure 51. Détermination du contenu en composés phénoliques des différentes fractions obtenues par ELL

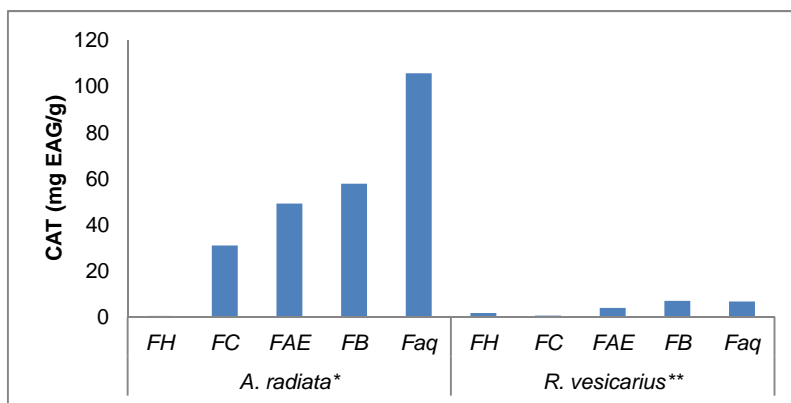
3.3. Etude des activités biologiques des différentes fractions obtenues par ELL

3.3.1. Evaluation du potentiel antioxydant

L'activité antioxydante des différentes fractions a été déterminée en utilisant cinq tests chimiques précédemment décrits (la capacité antioxydante totale ; le piégeage du radical DPPH[•] ; le pouvoir réducteur des ions ferriques ; le piégeage du radical ABTS^{•+} et l'inhibition du blanchiment du β -carotène). Notre but était de sélectionner les fractions les plus actives pour une caractérisation phytochimique ultérieure.

3.3.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

L'activité antioxydante des différentes fractions, obtenue avec le test de réduction des molybdates Mo(VI), varie de 0.460 ± 0.221 mg EAG/g à 105.721 ± 7.079 mg EAG/g pour les fleurs d'*A. radiata* et de 0.559 ± 0.021 mg EAG/g à 6.917 ± 0.889 mg EAG/g pour la partie aérienne de *R. vesicarius*. Les fractions les moins polaires (FC et FH) possèdent la capacité antioxydante la plus faible, tandis que les fractions les plus polaires présentent des capacités plus élevées (**Figure 52**).

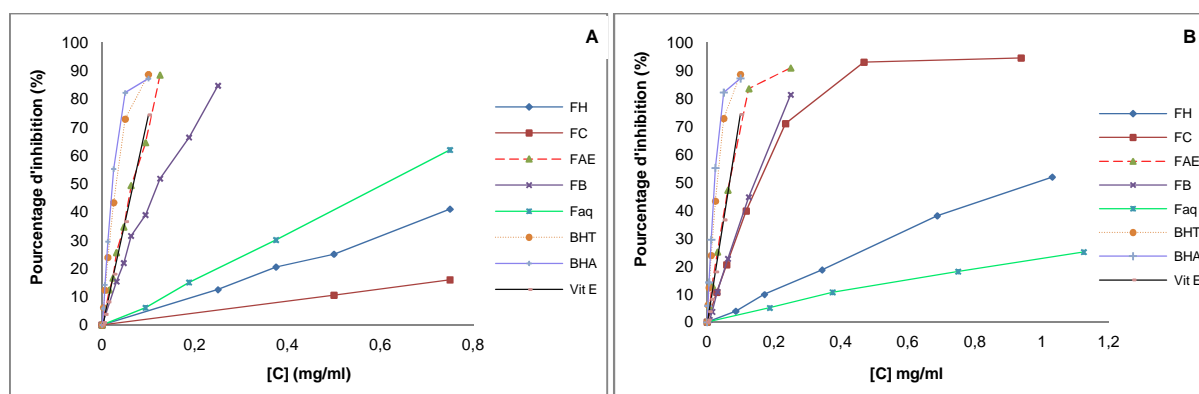


*Fleurs ; **Partie aérienne fleurie ; FH : Fraction hexanique ; FC : Fraction chloroformique ; FAE : Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq : Fraction aqueuse ; CAT : capacité antioxydante totale

Figure 52. Capacité antioxydante totale, exprimée en mg EAG/g MS, des différentes fractions obtenues par ELL

3.3.1.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

Les profils du test au DPPH• obtenus (**Figure 53**) révèlent que toutes les fractions testées possèdent une activité antiradicalaire dose-dépendante. La fraction acétate d'éthyle a montré une inhibition puissante du radical DPPH• très proche de celle de la solution témoin (vitamine E) ; 88.528% pour les fleurs d'*A. radiata* et 83.611% pour la partie aérienne de *R. vesicarius* à seulement 0.125 mg/ml. Cette dernière est suivie par la fraction butanolique. Par ailleurs, une très faible activité antiradicalaire a été exprimée par les fractions hexaniques et aqueuses dont le pourcentage inhibiteur n'atteint même pas les 20%, à cette même concentration.



(A) : Fleurs d'*A. radiata* ; (B) : Partie aérienne de *R. vesicarius* ; FH : Fraction hexanique ; FC : Fraction chloroformique ; FAE : Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq : Fraction aqueuse ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; Vit E : α -tocophérol

Figure 53. Profils de l'activité antiradicalaire (test au DPPH•) des différentes fractions obtenues par ELL et des standards utilisés

Les Cl_{50} de chacune des fractions ont été déterminées et sont présentées dans le tableau 15. La fraction acétate d'éthyle semble être la fraction la plus active avec une Cl_{50} égale à 0.069 ± 0.000 mg/ml pour l'espèce *A. radiata* et 0.071 ± 0.000 mg/ml pour l'espèce *R. vesicarius*. Ces deux valeurs sont très proches par rapport à la vitamine E, un composé reconnu pour son activité antioxydante élevée. Cet effet est probablement attribué à leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes. En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène, l'effet scavenger des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres (R^*) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyles. Cette réaction donne naissance au radical aroxyde (FLO^*) et à la molécule radicalaire rendu stable (RH), le FLO^* subira par la suite un réarrangement structurale permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation des radicaux aroxyde (**Javanovic et al., 1994**).

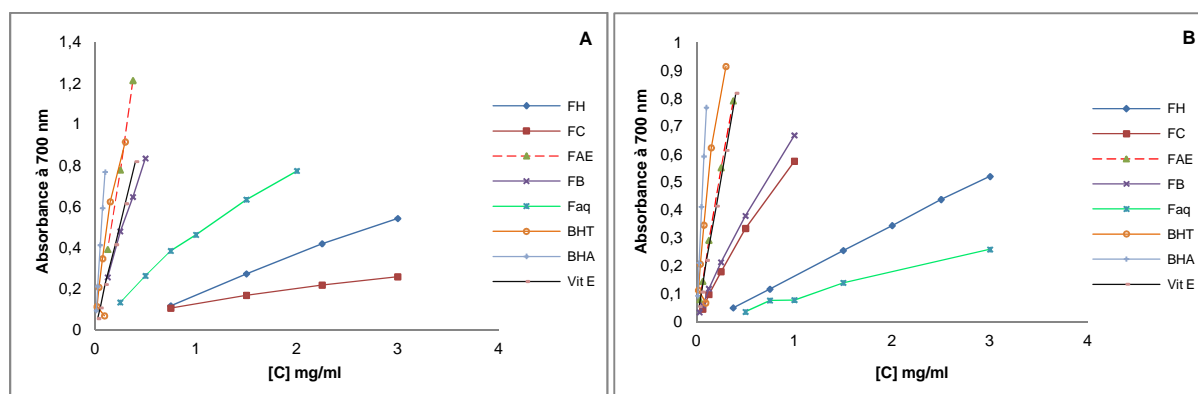
Tableau 15. Résultats de la capacité antioxydante (exprimés en mg EAG/g MS) et valeurs des Cl_{50} et des CE_{50} (exprimées en mg/ml) des différentes fractions obtenues par ELL

Espèces/Standards	Fractions	*CAT (mg EAG/g)*	* $Cl_{50}/DPPH$	* $CE_{50}/FRAP$	* $Cl_{50}/ABTS$	* Cl_{50}/β -Carotène
<i>A. radiata</i> **	FH	0.460±0.221	0.988±0.008	2.736±0.022	0.843±0.037	< 0.094
	FC	30.961±7.508	> 3	> 3	> 3	2.712±0.431
	FAE	49.097±2.476	0.069±0.000	0.161±0.005	0.124±0.011	0.319±0.018
	FB	57.786±2.119	0.120±0.004	0.278±0.002	0.209±0.018	0.140±0.037
	Faq	105.721±7.079	0.608±0.006	1.166±0.019	0.688±0.005	1.106±0.103
<i>R. vesicarius</i> ***	FH	1.621±0.003	1.009±0.035	2.867±0.029	0.706±0.084	2.565±0.376
	FC	0.559±0.021	0.159±0.002	0.797±0.001	1.561±0.193	0.211±0.000
	FAE	3.860±0.158	0.071±0.000	0.233±0.001	0.140±0.007	0.243±0.010
	FB	6.917±0.889	0.150±0.001	0.720±0.012	0.277±0.044	0.217±0.013
	Faq	6.673±1.840	2.902±0.040	> 3	1.278±0.010	0.627±0.013
Vit E	-	-	0.068±0.009	0.242±0.006	-	0.238±0.007
BHT	-	-	0.032±0.000	0.117±0.003	0.186±0.013	0.034±0.002
BHA	-	-	0.022±0.004	0.064±0.001	-	0.030±0.002

* Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures \pm standard de déviation ; **Fleurs ; ***Partie aérienne ; CE_{50} = concentration effective à laquelle l'absorbance est égale à 0.5 ; Cl_{50} = concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres ; CAT : capacité antioxydante totale ; FH : Fraction hexanique ; FC : Fraction chloroformique ; FAE : Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq : Fraction aqueuse ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; Vit E : α -tocophérol

3.3.1.3. Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)

Pour ce test, une gamme de concentration a été préparée pour chaque fraction. Les valeurs des densités optiques obtenues montrent une augmentation proportionnelle du pouvoir réducteur en fonction des concentrations. Ces résultats ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires (**Figure 54**).



(A) : Fleurs d'*A. radiata* ; (B) : Partie aérienne de *R. vesicarius* ; FH : Fraction hexanique ; FC : Fraction chloroformique ; FAE : Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq : Fraction aqueuse ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; Vit E : α -tocophérol

Figure 54. Pouvoir réducteur des ions ferriques, exprimé en CE_{50} (mg/ml), des différentes fractions obtenues par ELL et des antioxydants de synthèse

Nous pouvons constater aussi que tous les extraits testés possèdent une capacité dose-dépendante à réduire le fer. Du tableau 15, on remarque que le pouvoir réducteur varie considérablement entre les différentes fractions avec des valeurs qui oscillent entre 0.161 ± 0.005 mg/ml pour FAE d'*A. radiata* jusqu'à des valeurs qui dépassent les 3 mg/ml. C'est le cas des fractions FC pour l'espèce *A. radiata* et Faq pour l'espèce *R. vesicarius*.

Les fractions ayant présentées une activité réductrice la plus élevée sont les fractions acétate d'éthyle et n-butanol avec des CE_{50} qui varient de 0.161 ± 0.005 mg/m à 0.720 ± 0.012 mg/ml. Cependant, c'est la fraction acétate d'éthyle des fleurs d'*A. radiata* qui présente le pouvoir le plus élevé, avec une CE_{50} nettement inférieure à celle de la vitamine E ($CE_{50} = 0.242 \pm 0.006$ mg/ml). Cela nous laisse présager que cette fraction contient des molécules importantes pouvant servir comme source d'antioxydants naturels.

3.3.1.4. Piégeage du radical-cation ABTS^{•+}

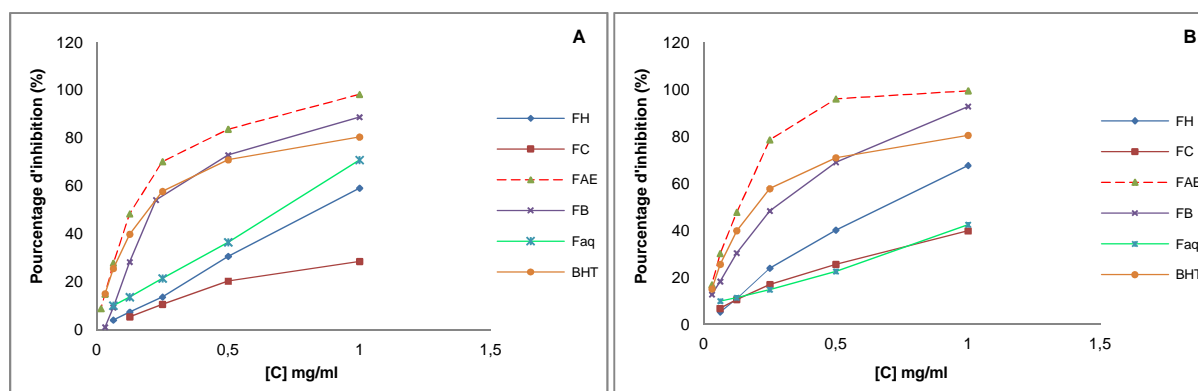
Le pouvoir piègeur du radical-cation ABTS^{•+} des différentes fractions a été évalué spectrophotométriquement en suivant la diminution de la réduction de ABTS^{•+} en ABTSH⁺.

Nous avons déterminé pour chaque extrait le pourcentage d'inhibition de l'ABTS^{•+}, calculé selon la formule ci-dessous :

$$PI (\%) = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Où A_C est l'absorbance en absence de composé à tester et A_E est l'absorbance mesurée après 6 min de mise en présence.

Les données expérimentales obtenues par ce test sont représentées dans la figure 55. On remarque que presque toutes les fractions étudiées possèdent une activité antioxydante et sont capables de piéger le radical cation ABTS^{•+}. A une concentration de 1 mg/ml, les fractions acétate d'éthyle et butanolique des deux espèces révèlent une puissante activité inhibitrice supérieure à celle du BHT et qui dépasse les 90%. Les autres extraits présentent à cette même concentration un pourcentage nettement inférieur.



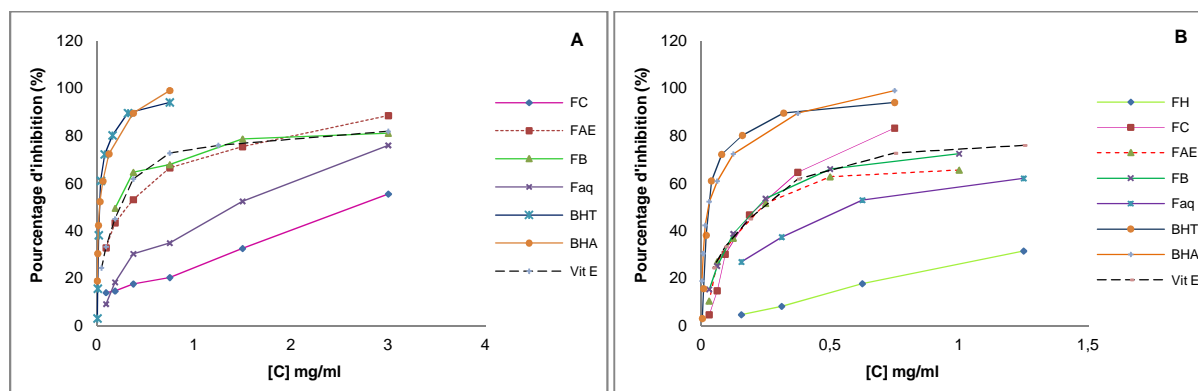
(A) : Fleurs d'*A. radiata* ; (B) : Partie aérienne de *R. vesicarius* ; FH : Fraction hexanique ; FC : Fraction chloroformique ; FAE : Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq : Fraction aqueuse ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; Vit E : α -tocophérol

Figure 55. Profils de l'activité antiradicalaire (test ABTS^{•+}) des différentes fractions obtenues par ELL et de l'antioxydant de synthèse (BHT)

En général, les résultats présentés dans le tableau 15 ont presque les mêmes tendances que ceux observés avec le test au DPPH. Le pouvoir antioxydant varie aussi largement entre les différentes fractions et les teneurs les plus élevées sont observées dans les fractions acétate d'éthyle des deux espèces étudiées (0.124 ± 0.011 mg/ml pour les fleurs d'*A. radiata* et 0.140 ± 0.007 mg/ml pour la partie aérienne de *R. vesicarius*), suivies des fractions butanoliques. Certaines fractions présentent des capacités antioxydantes moyennes, il s'agit des fractions hexaniques (0.706 ± 0.084 mg/ml pour la partie aérienne de *R. vesicarius* et 0.843 ± 0.037 mg/ml pour les fleurs d'*A. radiata*).

3.3.1.5. Inhibition du blanchiment de β -carotène

Dans ce test, l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique est mesurée en présence du β -carotène qui est employé comme marqueur. Les données expérimentales obtenues par ce test sont représentées dans la figure 56. Les valeurs des CI_{50} ont été calculées par la suite et sont présentées dans le tableau 15, permettant ainsi d'évaluer et de comparer l'efficacité de nos extraits.



(A) : Fleurs d'*A. radiata* ; (B) : Partie aérienne de *R. vesicarius* ; FH : Fraction hexanique ; FC : Fraction chloroformique ; FAE : Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq : Fraction aqueuse ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; Vit E : α -tocophérol

Figure 56. Profils de l'activité inhibitrice (test de blanchiment de β -carotène) des différentes fractions obtenues par ELL et des standards utilisés

Certaines fractions se démarquent en étant plus actives que la vitamine E. Il s'agit de la fraction butanolique des fleurs d'*A. radiata* et des fractions chloroformique et butanolique de la partie aérienne de *R. vesicarius*. Les valeurs de celles-ci varient de 0.140 ± 0.037 mg/ml à 0.217 ± 0.013 mg/ml. Une activité antioxydante intermédiaire a été obtenue avec les fractions acétate d'éthyle (0.243 ± 0.010 mg/ml pour la partie aérienne de *R. vesicarius* et 0.319 ± 0.018 mg/ml pour les fleurs d'*A. radiata*).

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (**Liyana-Pathirana et Shahidi, 2006**). Selon plusieurs auteurs, ce test paraît très utile comme modèle mimétique de la peroxydation lipidique dans les membranes biologiques (**Ferreria et al., 2006**).

Une exception a été levée pour la fraction hexanique des fleurs d'*A. radiata* ; une fraction très pauvre en composés phénoliques mais qui a présenté un pouvoir inhibiteur très puissant en comparaison avec les autres fractions (99% à seulement 0.094 mg/ml).

FH est une fraction assez complexe, elle peut contenir une variété de substances (cires, acides gras, stéroïdes, triterpènes, caroténoïdes, flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, coumarines) qui peuvent agir indépendamment ou en synergie (**Kar, 2007**). **Mariod et ses collaborateurs en 2009** ont trouvé une inhibition maximale avec la FH des graines de *Nigella sativa* L. Ils ont indiqué qu'en plus de la contribution probable des antioxydants à l'activité de la FH, un autre paramètre semble intervenir ; la polarité des solvants.

Etant donné que ce test est basé sur un système d'émulsion des lipides dans l'eau, **Frankel et Meyer en 2000** ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes que les antioxydants polaires. Dans ce système, les antioxydants apolaires sont concentrés dans l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation des radicaux lipidiques et, par conséquent, l'oxydation du β -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont, donc, moins efficaces (**Frankel et Meyer, 2000**).

3.3.2. Relation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des différentes fractions

Le tableau 16 indique la corrélation de Pearson qui a permis de mieux apprécier les relations éventuelles entre les différentes variables analysées. Il ressort de celui-ci que les différentes méthodes utilisées pour la détermination de la capacité antioxydante sont fortement corrélées. On a observé une corrélation positive entre FRAP et DPPH ($\rho = 0.992$), ABTS et DPPH ($\rho = 0.791$) et ABTS et FRAP ($\rho = 0.735$). Cette forte corrélation serait due au fait que ces trois méthodes sont basées sur la génération d'un radical libre par des mécanismes différents suivie par la détection et la quantification d'un point final dans la réaction. L'addition d'un antioxydant inhibe le développement du point final, inhibition qui est une expression de la capacité antioxydante de l'échantillon étudié (**Miller et Rice-Evans, 1996**). Notons aussi la présence d'une corrélation positive entre les différentes activités citées (DPPH, FRAP, ABTS) et l'activité inhibitrice de l'oxydation lipidique ($\rho = 0.620$; 0.592 et 0.664 , respectivement).

Des corrélations fortes et positives ont été également observées entre les flavonoïdes, les flavonols et les polyphénols totaux ($\rho \geq 0.848$), ceci confirme le fait que les flavonoïdes constituent le groupe le plus important des phénols dans les plantes (**Visioli et Hagen, 2007**).

Les proanthocyanidines sont reconnus être des tannins condensés qui sont des polymères des unités de flavonoïdes (flavan-3-ol) reliées par des liaisons carbone-carbone ce qui justifierait la corrélation existante entre les proanthocyanidines et les flavonoïdes ($\rho = -0.463$) et par conséquent la corrélation notée entre les proanthocyanidines et les phénols totaux ($\rho = -0.489$). Ces résultats indiquent bel et bien que les composés phénoliques que l'on retrouve souvent dans les plantes sont entre autres les flavonoïdes et les tanins (**Naczk et Shahidi, 2004**).

On remarque aussi une corrélation relativement positive entre la capacité antioxydante totale et les composés phénoliques totaux ($\rho = 0.863$), les flavonoïdes ($\rho = 0.668$), les flavonols ($\rho = 0.533$) et entre le pouvoir réducteur et les proanthocyanidines ($0.745 \geq \rho \geq 0.476$). Des corrélations négatives ont ainsi été observées entre le pouvoir réducteur et les composés phénoliques ($-0.470 \geq \rho \geq -0.306$) et entre le pouvoir réducteur et les flavonoïdes.

Ces observations, selon lesquelles les composés phénoliques joueraient un rôle antioxydant très important, ont été confirmées par plusieurs auteurs (**Nijveldt et al., 2001 ; Wong et al., 2006 ; Wei et al., 2007 ; Kumaran and Karunakaran, 2007**).

Toutefois, il est important de mentionner dans cette étude que la teneur en composés phénoliques totaux n'est pas toujours corrélée à l'activité antioxydante. C'est le cas particulièrement de l'inhibition de la peroxydation lipidique. Cette observation pourrait suggérer que le pouvoir réducteur exhibé par les différentes fractions n'est non seulement fonction des composés phénoliques totaux, mais également à la présence d'autres constituants à potentiel antioxydant (**Nsimba et al., 2008 ; Erkan et al., 2008 ; Ananthi et al., 2010**).

Tableau 16. Coefficients de corrélation linéaire (ρ) entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante des différentes fractions obtenues par ELL

ρ	TPT	TFT	TF	TTC	CAT	Cl ₅₀ /DPPH	CE ₅₀ /FRAP	Cl ₅₀ /ABTS	Cl ₅₀ /β-Carotène
TPT	1	0.848	0.864	-0.489	0.863	-0.400	-0.470	-0.306	-0.213
TFT		1	0.849	-0.463	0.668	-0.417	-0.473	-0.321	-0.300
TF			1	-0.515	0.533	-0.493	-0.548	-0.333	-0.243
TTC				1	-0.353	0.720	0.745	0.476	0.175
CAT					1	-0.114	-0.202	-0.011	0.062
Cl ₅₀ /DPPH						1	0.992	0.791	0.620
CE ₅₀ /FRAP							1	0.735	0.592
Cl ₅₀ /ABTS								1	0.664
Cl ₅₀ /β-Carotène									1

TPT : Teneur en polyphénols totaux ; TFT : Teneur en flavonoïdes totaux ; TF : Teneur en flavonols ; TTC : Teneur en tanins condensés ; CE₅₀ = concentration effective à laquelle l'absorbance est égale à 0.5 ; Cl₅₀ = concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres ; CAT : capacité antioxydante totale

3.3.3. Le potentiel antimicrobien des différentes fractions

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (**Billing et Sherman, 1998**).

La médecine traditionnelle par les plantes jusqu'à aujourd'hui continue d'être utilisée par une grande partie de la population dans la plupart des pays en développement. Si ces utilisations sont justifiées par des effets validés, les plantes pourraient être des sources de biomolécules actives exploitables.

Dans ce qui suit, nous présentons nos travaux sur l'activité antimicrobienne des fractions obtenues par ELL des différents organes d'*Anvillea radiata*, une plante endémique à usage thérapeutique. Les objectifs de cette partie consistent à identifier l'organe qui présente plus d'activité, puis à caractériser les composés antimicrobiens présents.

Les différentes fractions de l'espèce *Rumex vesicarius* L. n'ont donné aucune activité, c'est pourquoi on ne les a pas présentés ici.

3.3.3.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

L'activité antimicrobienne des fractions obtenues à partir des différents organes d'*A. radiata* a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats de ce criblage sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17. Diamètres des zones d'inhibition des différentes fractions obtenues par ELL relatives aux différentes souches selon la méthode des disques

Partie étudiée	Extraits (1mg/disque)	Rendement d'extraction (%)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)												
			Bactéries à Gram +			Bactéries à Gram -			Levures		Moisissures				
			S. aureus	B. cereus	M. luteus	E. coli	P. aeruginosa	K. pneumoniae	C. albicans	C. albicans IP	A. flavus	A. fumigatus	F. oxysporum		
<i>Anvillea radiata</i> Coss. & Durr.	Feuilles	FH	1.14	6	6	6	6	6	6	6	10	7	6	6	6
		FC	8.59	12	16	6	6	6	6	6	7	8	6	6	6
		FAE	2.94	14	15	6	6	6	6	6	7	7	6	6	6
		FB	2.41	8	14	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6
		Faq	15.36	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Fleurs	FH	0.85	6	6	6	6	6	6	6	8	7	6	6	6
		FC	2.24	8	14	6	6	6	6	6	7	8	6	6	6
		FAE	2.43	6	8	6	6	6	6	6	8	7	6	6	6
		FB	3.11	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Faq	16.77	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Tiges	FH	0.46	6	6	6	6	6	6	6	8	7	6	6	6
		FC	1.17	11	15	6	6	6	6	6	7	7	6	6	6
		FAE	1.10	6	8	6	6	6	6	6	7	7	6	6	6
		FB	1.00	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Faq	8.46	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
DMSO (10 µl/disque)			6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
AK (30 µg/disc)			27	26	25	25	29	24	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	
CTX (30 µg/disc)			29	8	33	30	23	19	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	
CAZ (30 µg/disc)			16	6	21	23	24	10	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	
AMP (10 µg/disc)			27	6	Nt	15	6	6	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	
OX (1 µg/disc)			16	6	Nt	6	6	6	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	
Ny (30 µg/disc)			Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	16	20	22	35	14		

FH : Fraction hexanique ; FC : Fraction chloroformique ; FAE : Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq : Fraction aqueuse ; DMSO : Diméthylsulfoxyde (contrôle négatif) ; Contrôles positifs : AK. Amikacine ; CTX. Céftaxime ; CAZ. Céftazidime ; AMP. Ampicilline ; OX. Oxacilline ; Ny. Nystatine ; Nt : non testé

L'évaluation d'actif antimicrobien est généralement effectuée en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits et/ou fractions testés. La CMI correspond à la plus faible concentration en agent actif capable d'inhiber totalement la croissance d'une bactérie donnée. L'objectif du criblage initial étant de différencier les organes en fonction de leur potentiel antimicrobien respectif.

Comme cela a été rapporté dans la littérature, un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm (Tekwu et al., 2012). Les fractions obtenues avec les feuilles d'*A. radiata* agissent de façon active sur deux bactéries à Gram+ : *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Par ailleurs, aucune activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries à Gram – n'a été observée. La différence de composition de l'enveloppe bactérienne entre les deux groupes explique nos résultats. En effet, l'enveloppe des bactéries à Gram positif ne possède pas de récepteurs spécifiques ou de perméases facilitant ainsi la pénétration des biocides dans les cellules (Russell, 2001). Alors que la nature de la membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif peut jouer un rôle de barrière vis-à-vis des agents chimiques (C.CLIN, 2000).

De même, l'effet du solvant d'extraction est fortement soumis à la variation de l'activité inhibitrice. Ceci a été remarqué pour les fractions chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique des feuilles (Figure 57).

Traditionnellement, les feuilles et les tiges d'*A. radiata* sont utilisés dans le traitement des pathologies digestives (indigestion) et broncho-pulmonaires (refroidissement pulmonaire). Par conséquent, l'inhibition de la croissance de *B. cereus* et *S. aureus* permet de justifier au moins partiellement les usages ethnopharmacologiques de cette plante.

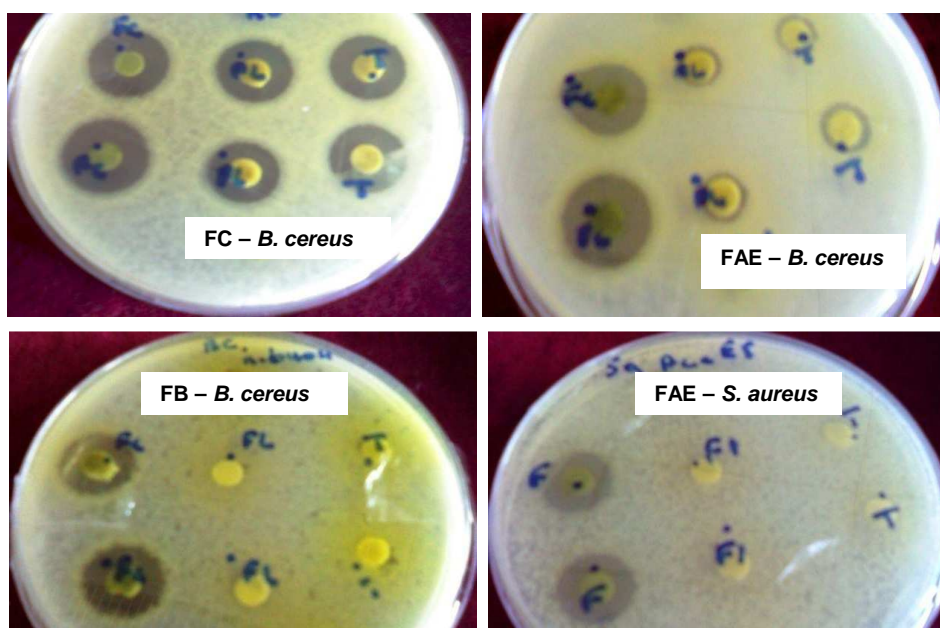


Figure 57. Zones d'inhibition des fractions actives relatives aux souches sensibles

Pour les autres organes, c'était plutôt la fraction chloroformique qui a induit l'inhibition de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*. Les autres fractions se sont révélées inactives vis-à-vis des souches testées.

Par ailleurs, une très faible activité a été observée contre les levures et aucune activité contre les moisissures.

De plus, l'inactivité du solvant utilisé pour dissoudre les résidus de ces fractions (DMSO) a été vérifiée. La sensibilité des souches aux antibiotiques de référence a été aussi testée et les valeurs des diamètres d'inhibition sont comprises entre 6 à 33 mm.

3.3.3.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide

La détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMB) nous permet non seulement de confirmer, quantifier et comparer les activités, mais aussi de caractériser la nature de l'effet révélé par un extrait sur un micro-organisme donné. Les résultats obtenus avec les fractions ayant présentées des zones supérieures à 7 mm sont reportés dans le tableau 18.

Tableau 18. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) des fractions les plus actives

Parties étudiées	Extraits	CMIs, CMBs (mg/ml)						CMIs, CMFs (mg/ml)				
		Bactéries à Gram +						Levures				
		<i>S. aureus</i>			<i>B. cereus</i>			<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans IP</i>		
		CMI	CMB	CMB/CMI	CMI	CMB	CMB/CMI	CMI	CMF	CMI	CMF	
<i>Anvillea radiata</i> Coss. & Dur.	Feuilles	FH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.625	0.625	0.625	1.25
		FC	0.312	0.625	2.003	0.156	0.156	1	1.25	> 1.25	1.25	1.25
		FAE	0.312	0.625	2.003	0.156	0.312	2	≥ 1.25	> 1.25	1.25	> 1.25
		FB	0.625	1.25	2	0.312	0.625	2.003	≥ 1.25	> 1.25	≥ 1.25	> 1.25
	Fleurs	FH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.25	> 1.25	1.25	> 1.25
		FC	0.625	1.25	2	0.312	0.625	2.003	≥ 1.25	> 1.25	1.25	> 1.25
		FAE	≥ 1.25	1.25	-	0.625	1.25	2	≥ 1.25	> 1.25	≥ 1.25	> 1.25
		FB	≥ 1.25	> 1.25	-	≥ 1.25	> 1.25	-	ND	ND	ND	ND
	Tiges	FH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.25	> 1.25	1.25	1.25
		FC	0.625	1.25	2	0.312	0.312	1	≥ 1.25	> 1.25	1.25	> 1.25
		FAE	≥ 1.25	1.25	-	1.25	1.25	1	≥ 1.25	> 1.25	≥ 1.25	> 1.25
		FB	≥ 1.25	> 1.25	-	1.25	1.25	1	ND	ND	ND	ND

ND : non déterminée

Une interprétation globale des résultats montre que les valeurs des CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition ; les extraits ayant induit une importante zone d'inhibition présentent les plus petites CMI sur les souches

correspondantes. C'est le cas des fractions FC, FAE et FB des feuilles sur les souches *B. cereus* et *S. aureus*.

Par conséquent, nous avons comparé les CMI et CMB des fractions sur les souches testées. Selon la méthode de **Fauchere et Avril (2002)**, une substance est bactéricide lorsque le rapport CMB/CMI est égale à 2, et bactériostatique lorsque ce rapport est > 2. Il en ressort que toutes les fractions exercent un effet bactéricide sur *B. cereus* et *S. aureus*.

Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence les propriétés antibactériennes des extraits d'*A. radiata*. Ces derniers révèlent la présence de principes actifs antibactériens dans les feuilles ce qui justifie certains usages ethnopharmacologiques. Ainsi, ils démontrent que cette plante peut être utilisée pour soigner quelques maladies infectieuses.

Il serait par conséquent intéressant d'entreprendre des études de toxicité des extraits purifiés de cette plante afin de déterminer les doses thérapeutiques et les doses létales car les remèdes traditionnels souffrent beaucoup du problème de dosage.

3.4. Détermination du profil phytochimique des fractions actives

En se basant sur l'importance des activités biologiques, l'identification chromatographique n'a été effectuée que sur les fractions les plus actives.

3.4.1. Caractérisation phytochimique par Chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette analyse a été effectuée dans notre laboratoire (LAPRONA). Pour chacune des plantes étudiées, nous disposons de trois fractions nommées :

- FC, FAE, FB des feuilles d'*A. radiata* ;
- FH, FAE, FB des fleurs d'*A. radiata* ;
- FC, FAE, FB de la partie aérienne de *R. vesicarius*.

Les résultats du criblage phytochimique sont indiqués dans les tableaux 19-22. Les tâches orange, jaune, bleu, verte, rose, pourpre, ... observées sous UV à 366 nm peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires. Afin de préciser la nature des composés révélés, des réactifs spécifiques aux coumarines (KOH, (CH₃CO₂)₂Pb, NH₃) ; aux flavonoïdes (AlCl₃, NH₃) ; aux stérols et aux polyterpènes (réactifs de Libermann-Bürchard et la vanilline sulfurique) ; aux alcaloïdes (réactif de Dragendorff) et aux tanins (FeCl₃) ont été utilisés (**Lhuillier, 2007 ; Guy et al., 2010 ; Kabran et al., 2011 ; Rathee et al., 2012**).

3.4.1.1. Interprétation des CCM préliminaires de la fraction hexanique des fleurs d'*A. radiata*

Les chromatogrammes de la fraction hexanique ont été obtenus avec un gradient n-C₆H₁₄/AcOEt, (8/1.9 (v/v)) (**Tableau 19**). Selon la littérature, l'hexane extrait les matières grasses et certains métabolites secondaires tels que les stéroïdes et les terpènes (**Bruneton, 2009**). Avant révélation, il peut être observé que la fraction hexanique (extrait apolaire) contient de la chlorophylle caractérisée par des bandes rouges sous UV à 366 nm.

Tableau 19. Composés identifiés dans la fraction hexanique des fleurs d'*A. radiata*

Phase mobile : n-C₆H₁₄/AcOEt, (8/1.9 (v/v))

Extraits	Sans révélation a			Avec révélation				Phytocomposés possibles	
				Liebermann-Bürchard A			Vanilline-H ₂ SO ₄ B		
	Rf	Visible	UV/366nm	Rf	Visible	UV/366nm	Rf		Visible
FH – Fleurs d' <i>A. radiata</i>	0.00	-	Jaune ^F	-	-	-	0.00	Gris	Dérivés phénoliques a (Michel, 2011)
	-	-	-	0.27	-	Jaune	-	-	Stéroïdes A (Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)
	0.30	-	Rouge ^F	0.31	-	Jaune	0.31	Gris	Stéroïdes A (Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)
	0.40	-	Rouge ^F	0.39	-	Violet ^C	0.36	Gris	NI
	-	-	-	0.48	Violet	Jaune ^F	-	-	Stéroïdes A (Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)
	-	-	-	0.53	Violet	Violet ^C	0.54	Gris	Génine triterpénique A, B (Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)
	-	-	-	0.64	Mauve	Orange	0.59	Gris	Triterpène de type lupane A (Lagnika, 2005 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)
	-	-	-	0.72	-	Jaune ^O	0.77	Bleu	Triterpène de type lupane A, B (Lagnika, 2005 ; Lhuillier, 2007 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)
	-	-	-	0.87	-	Rose ^C	-	-	NI
	-	-	-	0.94	-	Jaune	-	-	Stéroïdes A (Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)
	-	-	-	0.96	-	Rose ^C	-	-	NI

NI: non identifié; F: fluorescent; C: clair; O: orangé

Les travaux de **Lhuillier (2007)**, nous ont permis de déduire que le spot bleu (Rf = 0.77) identifié dans le visible en présence de vanilline sulfurique est un triterpène. Ainsi, nous constatons que la fraction hexanique des fleurs d'*A. radiata* est majoritairement composée de stéroïdes et de triterpènes. L'utilisation du réactif de Liebermann Burchard a confirmé notre assertion. En effet, il a révélé d'une part les triterpènes de type lupane en jaune-orangé, et d'autre part les stéroïdes sous forme de tâches jaunes ou jaune-vert. Le spot violet sous UV à 366 nm observé à un Rf = 0.53 serait une génine triterpénique. Ces constats ont été faits par (**Lagnika, 2005 ; Lhuillier, 2007 ; Guy et al., 2010 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a**) dans leurs travaux respectifs menés sur d'autres plantes.

Par ailleurs, les composés visibles sous UV à 366 nm et qui présentent un Rf inférieur ne semblent pas être des composés terpéniques, mais plutôt des composés plus polaires qui pourraient être des dérivés phénoliques (Michel, 2011).

3.4.1.2. Interprétation des CCM préliminaires des fractions chloroformiques

Les stérols, les terpènes, les coumarines, les flavonoïdes et les alcaloïdes ont été recherchés dans les fractions chloroformiques des feuilles d'*A. radiata* et de la partie aérienne de *R. vesicarius*. Des révélateurs polyvalents tels que $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb}$ basique à 1% (m/v) et NH_3 ainsi que des réactifs spécifiques aux stérols et terpènes (réactif de Liebermann Burchard), aux coumarines (KOH), aux tanins (FeCl_3) et aux alcaloïdes (réactif de Dragendorff) ont été employés à cet effet. Le développant choisi pour faire migrer ces composés est un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (10/8, v/v). Les résultats figurent dans le tableau 20.

En général, les coumarines sont révélées avec KOH en jaune dans le visible et la coloration varie ou s'intensifie sous UV à 366 nm (Ladyguina et al., 1983 ; Dohou et al., 2003 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a). $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb}$ basique et NH_3 sont des révélateurs communs aux coumarines et aux flavonoïdes. Toutefois, ils se distinguent par des colorations caractéristiques. En effet, NH_3 permet non seulement d'identifier les coumarines en les colorant en bleu, vert, jaune, pourpre ou rose, mais également de les caractériser (Dekker, 2002). Ainsi, les spots de Rf = 0.08, 0.15, 0.94 sont des coumarines (Tableau 20). En outre, le spot rouge de Rf = 0.93 révélé sous UV à 366 nm et qui persiste après traitement par NH_4OH concentré, est une anthraquinone (Mamyrbekova-Bekro et al., 2013b).

Les stérols et triterpènes ont été révélés par le réactif de Liebermann-Burchard sous UV à 366 nm. En effet, les spots jaunes (Rf = 0.14, 0.20, 0.22) correspondent aux stérols alors qu'une tâche rouge (Rf = 0.82) correspond aux triterpènes de type oléane et ursane (Lagnika, 2005 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a). Ainsi, deux tâches jaune-orangées caractéristiques des triterpènes de type lupane ont été visualisées dans les feuilles d'*A. radiata* (Lagnika, 2005).

La fraction chloroformique, obtenue à partir de la partie aérienne de *R. vesicarius*, s'est révélée pauvre en ces composés.

La mise en évidence des alcaloïdes s'est révélée négative. Ceci est probablement dû à leur faible concentration ou bien à leur absence dans les différentes fractions.

3.4.1.3. Interprétation des CCM préliminaires des fractions acétate d'éthyle

Les chromatogrammes des fractions acétate d'éthyle des feuilles et des fleurs d'*A. radiata* et de la partie aérienne de *R. vesicarius* ont été obtenus avec un gradient AcOEt/chloroforme/acétone dans les proportions 8/7/0.5 ; (v/v/v) et des révélateurs spécifiques et/ou polyvalents tels que NH₃ et KOH méthanolique à 5% (m/v) pour les coumarines, le AlCl₃ pour les flavonoïdes et le FeCl₃ pour les tanins ont été utilisés. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 21.

Les flavonoïdes présentent des tâches de colorations variables sous UV à 366 nm. L'AlCl₃ les révèle en jaune dans le visible et sous UV, les tâches sont de couleur bleu-brun (**Lagnika, 2005**) ou bien jaune-vert fluorescent (**Ladyguina et al., 1983**). En effet, certains tels que la quercétine, les flavonols et auronés sont jaunes. Les xanthones se révèlent en orange (**Ladyguina et al., 1983**). Les flavones méthylées et hydroxyflavonols sont bleus et pourpres (**Dawson et al., 1991**). C'est le cas des spots de R_f = 0.16 et 0.91 détectés dans *R. vesicarius*. Quant au NH₃, il les révèle sous forme de spots fluorescents jaune, vert et bleu sous UV à 366 nm (**Ladyguina et al., 1983 ; Dawson et al., 1991**). L'apparition de fluorescences jaune, verte, bleue, orange après pulvérisation avec KOH et visualisation sous UV à 366 nm, indique la présence de coumarines (**Ladyguina et al., 1983 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a,b**). C'est le cas des spots à R_f = 0.00 et 0.14 détectés dans *R. vesicarius*.

Le FeCl₃ caractérise les tanins en gris dans le visible (R_f = 0.21 détecté dans les feuilles d'*A. radiata* et 0.04 dans la partie aérienne de *R. vesicarius*) (**Kabran et al., 2011 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a**). Les dérivés phénoliques apparaissent en vert (R_f = 0.14 détecté dans les feuilles d'*A. radiata*).

Tableau 20. Composés identifiés dans les fractions chloroformiques

Phase mobile : cyclohexane/AcOEt, (10/8 (V/V))

Extraits	Sans révélateur a			Avec révélateur														Phytocomposés possibles	
				NH ₃ /NH ₄ OH A			Liebermann-Bürchard B			FeCl ₃ C		KOH D			Acétate de plomb basique E				
	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}		
FC - Feuilles d' <i>A. radiata</i>	0.00	Marron	Orange	0.00	Vert	Orange	0.00	Marron ^C	Jaune ^O	-	-	0.00	Vert	Rouge	0.00	Jaune ^V	Orange	Triterpénoïdes de type lupane B (Lagnika, 2005)	
	0.03	Vert	Rouge ^f	0.03	Vert	Orange	0.03	Marron ^C	Orange	0.03	Vert	-	-	-	0.04	Vert	Gris ^V	Dérivés phénoliques C (Kabran <i>et al.</i> , 2011)	
	0.06	Vert ^J	Rose ^f	0.07	-	Rose	0.07	Mauve	Marron ^V	-	-	0.08	Jaune	Mauve	0.07	-	Rose	Coumarines A, D (Ladyguina <i>et al.</i> , 1983 ; Dohou <i>et al.</i> , 2003 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)	
	0.10	-	Rose ^C	0.11	-	Rose	0.14	Gris	Jaune ^V	-	-	0.15	Jaune	Vert	0.11	-	Mauve	Stéroïdes B (Lagnika 2005), Coumarines A, D (Ladyguina <i>et al.</i> , 1983 ; Dohou <i>et al.</i> , 2003 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)	
	0.18	-	Marron	0.17	-	Mauve	0.20	-	Jaune	-	-	-	-	-	-	-	-	Stéroïdes B (Lagnika, 2005)	
	-	-	-	0.23	-	violet	0.22	-	Jaune	-	-	-	-	-	-	-	-	Stéroïdes B (Lagnika, 2005)	
	-	-	-	0.45	-	Mauve	0.65	-	violet	-	-	-	-	-	-	-	-	Non identifié	
	-	-	-	-	-	-	0.68	-	Jaune ^O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Triterpénoïdes de type lupane B (Lagnika, 2005)
	-	-	-	-	-	-	0.78	Jaune	Rose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Non identifié
	0.86	Jaune	Rose ^C	-	-	-	0.82	Vert	Rouge ^f	-	-	-	-	-	-	0.86	-	Rose	Triterpénoïdes de type Oléanane et Ursane B (Lagnika, 2005 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.89	Jaune ^V	Rouge ^f	0.90	Jaune ^V	Rose	0.88	Gris	Jaune ^f	-	-	-	-	-	-	0.89	-	Rose	Coumarines A (Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a), Stéroïdes B (Lagnika, 2005)
	0.93	Vert	Rouge ^f	0.94	Jaune ^V	Rouge	0.93	Gris	Jaune ^C	-	-	0.94	Jaune	Rouge	0.94	Jaune	Rouge	Anthraquinone a, A (Mamyrbekova- Bekro <i>et al.</i> , 2013b) ; Coumarines D (Ladyguina <i>et al.</i> , 1983 ; Dohou <i>et al.</i> , 2003)	

	Sans révélateur a			NH ₃ /NH ₄ OH A			Liebermann-Bürchard B			FeCl ₃ C		KOH D			Acétate de plomb basique E			Phytocomposés possibles
	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	
FC - Partie aérienne de <i>R. vesicarius</i>	0.00	Jaune	Jaune	0.00	Jaune	Jaune	0.00	Vert	Jaune ^V	-	-	0.00	Marron	Jaune	0.00	Jaune	Jaune	Stérols B (Lagnika, 2005 ; Kabran et al., 2011 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013b)
	0.07	-	Rouge ^C	0.04	-	Violet	-	-	-	-	-	-	-	-	0.06	-	Violet	Anthraquinone a (Mamyrbekova-Bekro et al., 2013b)
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12	-	Mauve	Non identifié
	0.70	-	Mauve	-	-	-	0.89	Violet	Violet	-	-	-	-	-	0.75	-	Mauve	Saponine stéroïdique B (Guy et al., 2010 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)

F: fluorescent; C: clair; O: orangé ; J : jaunâtre ; V : verdâtre

Tableau 21. Composés identifiés dans les fractions acétate d'éthyle

Phase mobile : AcOEt/chloroforme/acétone (8/7/0.5 (V/V/V))

Extraits	Sans révélation a			Avec révélation											Phytocomposés possibles
				NH ₃ A			KOH B			AlCl ₃ C			FeCl ₃ D		
	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	
FAE – Feuilles d' <i>A. radiata</i>	0.00	Marron	Orange	0.00	Marron	Orange	0.00	Vert	Rouge	0.00	Vert	Orange	-	-	Xanthone a, C (Ladyguina et al., 1983)
	0.03	Vert ^f	Rouge	0.03	Vert	Rose	-	-	-	0.03	Jaune	Rose	-	-	Coumarines A (Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)
	0.09	Jaune	Rose ^f	-	-	-	-	-	-	0.09	Jaune	Rose	-	-	Flavones a, C
	0.15	Vert	Rouge	0.14	Vert	Rouge	0.15	Vert	Rouge	0.15	Vert	Rouge	0.14	Vert	Dérivés phénoliques D (Kabran et al., 2011)
	0.20	Jaune ^V	Rouge	0.20	Jaune	Marron	0.23	-	Rouge	0.23	-	Rose	0.21	Gris	Tanins D (Kabran et al., 2011), Anthracène (Ladyguina et al., 1983)
	-	-	-	0.68	-	Pourpre	0.74	-	violet	-	-	-	-	-	Anthracène (Ladyguina et al., 1983), Coumarines A (Wagner et al., 1996 ; Dekker, 2002 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)
	0.90	-	Rose	0.90	-	Pourpre	-	-	-	-	-	-	-	-	Coumarines A (Wagner et al., 1996; Dekker, 2002 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a)
	0.94	Vert	Rouge ^f	0.95	Vert	Rouge	0.98	Vert	Rouge	0.93	Jaune ^V	Rouge	0.94	vert	Dérivés phénoliques D (Kabran et al., 2011)

	Sans révélation a			NH ₃ A			KOH B			AlCl ₃ C			FeCl ₃ D		Phytocomposés possibles
FAE – Fleurs d' <i>A. radiata</i>	0.00	Marron	Vert	0.00	Marron	Vert	0.00	Marron	Vert	0.00	Jaune	Jaune ^F	0.00	Gris	Flavonoïdes A, C (Ladyguina <i>et al.</i> , 1983)
	0.04	-	Rose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Non identifié
	0.15	Jaune	Rouge	-	-	-	-	-	-	0.13	Jaune ^C	Bleu ^F	-	-	Flavonoïdes C (Lagnika, 2005)
	0.22	-	Mauve	0.15	Jaune ^V	Vert	0.17	Jaune ^V	Rose	0.16	-	Rose	-	-	Coumarines A, B (Ladyguina <i>et al.</i> , 1983)
	0.91	-	Mauve	0.67	-	Mauve	0.74	-	Mauve	-	-	-	-	-	Anthocyanidine 3-glycosides a (Markham, 1982)
FAE – Partie aérienne de <i>R. vesicarius</i>	0.00	Brun	Vert	0.00	Marron	Jaune ^V	0.00	Marron	Vert ^F	0.00	Jaune	Brun	0.00	Gris	Coumarine A (Guy <i>et al.</i> , 2010), B (Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a,b), Flavonoïdes C (Lagnika, 2005) ; Tanins D (Kabran <i>et al.</i> , 2011 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.04	-	pourpre	-	-	-	0.03	Jaune	Violet	-	-	-	0.04	Gris ^C	Tanins D (Kabran <i>et al.</i> , 2011 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.12	Jaune	Orange	0.12	-	Orange	0.14	Jaune ^C	Orange	-	-	-	-	-	Coumarines B (Kabran <i>et al.</i> , 2011 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a), Xanthone a (Ladyguina <i>et al.</i> , 1983)
	0.16	-	Bleu	0.17	Jaune	Vert	-	-	-	0.16	Jaune	Bleu ^F	-	-	Flavones méthylées ou hydroxyflavonols a, A, C (Dawson <i>et al.</i> , 1991 ; Lagnika, 2005)
	0.91	-	pourpre	-	-	-	0.98	-	Pourpre	0.91	-	Mauve	-	-	Hydroxyflavonol a (Dawson <i>et al.</i> , 1991)

F: fluorescent; C: clair ; J : jaunâtre ; V : verdâtre

Tableau 22. Composés identifiés dans les fractions butanoliques

Phase mobile : Toluène/Acétone/Acide formique (3 :5 :1 (v/v/v))

Extrait	Sans révélation a			Avec révélation					Phytocomposés possibles
				AlCl ₃ A			FeCl ₃ B		
	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	UV _{366nm}	Rf	Visible	
FB – Feuilles d' <i>A. radiata</i>	0.76	Jaune ^C	violet	0.79	Jaune ^C	Bleu ^F	0.76	Gris	Flavonoïdes A (Lagnika, 2005), Tanins B (Kabran <i>et al.</i> , 2011)
	0.87	Jaune	Rose	-	-	-	-	-	Anthocyanidine 3,5-diglycosides a (Markham, 1982)
	0.89	Vert	Rouge	-	-	-	0.89	Vert	Dérivés phénoliques B (Kabran <i>et al.</i> , 2011)
	-	-	-	0.94	Vert	Orange	-	-	Xanthone A (Ladyguina <i>et al.</i> , 1983)

	Sans révélation			AlCl ₃			FeCl ₃		Phytocomposés possibles
	a			A			B		
FB – Fleurs d' <i>A. radiata</i>	0.00	-	Jaune	0.00	Jaune	Jaune	-	-	Flavonoïdes A (Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.2	Jaune	Marron	0.21	Jaune	Jaune ^V	-	-	Flavonols a, A (Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.46	Jaune	Jaune ^C	0.48	-	Blanc ^F	0.45	Gris	Flavonols a, A (Markham, 1982), Tanins B (Kabran <i>et al.</i> , 2011 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.5	Jaune	Vert	0.52	Jaune	Jaune ^V	-	-	Flavonols, flavanones ou auronés (Markham, 1982 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.57	-	Mauve	0.67	-	Jaune	-	-	Anthocyanidine 3-glycosides a (Markham, 1982)
	0.63	-	Mauve	0.78	Jaune	jaune ^F	-	-	Flavonoïdes A (Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.75	Jaune	Vert	0.85	-	Violet	0.73	Bleu	Tanins B (Kabran <i>et al.</i> , 2011 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.80	-	Pourpre	0.89	-	Mauve	-	-	Flavones a, A (Markham, 1982 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.85	-	pourpre	-	-	-	-	-	Flavones (Markham, 1982)
FB – Partie aérienne de <i>R. vesicarius</i>	0.00	Marron	Jaune	-	-	-	-	-	Flavonols et/ou auronés (Dawson <i>et al.</i> , 1991)
	0.16	Jaune	Vert	-	-	-	-	-	Flavonols, flavanones ou auronés (Markham, 1982)
	0.19	Jaune	Jaune	0.18	Jaune	Jaune ^F	-	-	Flavonols a, A (N'gaman Kohué <i>et al.</i> , 2009 ; Guy <i>et al.</i> , 2010)
	0.39	Jaune	Vert	0.42	Jaune	Jaune ^F	0.39	Gris	Flavonols, flavanones ou auronés (Markham, 1982 ; N'gaman Kohué <i>et al.</i> , 2009), Tanins B (Kabran <i>et al.</i> , 2011 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)
	0.47	Jaune	Vert ^J	0.51	Jaune	Jaune ^F	-	-	Flavonols, flavanones ou auronés (Markham, 1982 ; N'gaman Kohué <i>et al.</i> , 2009)
	0.6	Jaune	Jaune	0.63	Jaune ^C	Jaune ^F	0.6	Brun	Flavonols a, A (N'gaman Kohué <i>et al.</i> , 2009 ; Guy <i>et al.</i> , 2010), Tanins B (Kabran <i>et al.</i> , 2011)
	0.85	-	Vert	0.89	-	Rose	-	-	Flavonols, flavanones ou auronés (Markham, 1982)
	0.87	-	orange	0.91	-	rose	-	-	Xanthone a (Ladyguina <i>et al.</i> , 1983 ; Mamyrbekova-Bekro <i>et al.</i> , 2013a)

F: fluorescent; C: clair ; J : jaunâtre ; V : verdâtre

3.4.1.4. Interprétation des CCM préliminaires des fractions butanoliques

Dans les fractions butanoliques des feuilles et des fleurs d'*A. radiata* et de la partie aérienne de *R. vesicarius*, nous avons cherché à identifier les polyphénols. À cet effet, des révélateurs spécifiques aux flavonoïdes (réactif d' AlCl_3) et aux tanins (FeCl_3) ont été choisis. Pour faire migrer ces composés, nous avons utilisé le gradient : $\text{PhCH}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{HCOOH}$, (3/5/1 (v/v/v)).

À l'aide de la méthodologie d'approche (coloration des spots avant et après utilisation des réactifs) utilisée précédemment pour la détection et l'identification des phytoconstitués, nous avons montré la présence des tanins et la richesse des fractions en flavonoïdes (**Tableau 22**).

En conclusion, les analyses phytochimiques qualitatives par CCM ont révélé la diversité des composés phénoliques (particulièrement les stérols, les terpènes, les coumarines et les flavonoïdes) dans les deux espèces étudiées. Cependant, cette analyse a permis d'identifier des profils presque similaires entre les feuilles et les fleurs d'*A. radiata* et de distinguer un profil flavonique différent pour l'espèce *R. vesicarius*.

3.4.2. Caractérisation phytochimique par Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La vaste gamme de polarité des composés phénoliques nécessite souvent de travailler en gradient d'élution pour éviter les co-élutions et pour éluer l'ensemble des composés. L'ordre d'élution de ces molécules étant aussi déterminé par la nature et le gradient des solvants utilisés.

Les systèmes solvant sont composés d'eau (H_2O) et d'un modificateur organique le méthanol (MeOH) ou l'acétonitrile (ACN). La phase mobile est souvent acidifiée à un pH situé entre 2 et 4 afin d'éviter l'ionisation des nombreux groupes hydroxyles des composés phénoliques pendant l'analyse, ce qui améliore en même temps la résolution et la reproductibilité (**Marston et Hostettmann, 2006 ; Stalikas, 2007 ; Misan et al., 2011**).

La méthode développée ici est un gradient constitué d'eau acidifié et d'acétonitrile (ACN). Ce dernier (ACN) induit une perte de charge inférieure et une durée d'analyse plus courte par rapport au méthanol. En raison de sa meilleure force d'élution et de sa plus faible viscosité, l'ACN a été sélectionné pour poursuivre le développement (**Michel, 2011**).

Nos analyses ont été effectuées sur les fractions acétate d'éthyle des fleurs d'*A. radiata* et de la partie aérienne de *R. vesicarius* dans le Laboratoire des Plantes Extrêmophiles (LPE) du Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria (Tunisie), sous la direction de M^{me} BOURGOU Soumaya.

Le profil d'éluion des composés issus de ces deux fractions a été suivi à 280 nm, longueur d'onde caractéristique des composés phénoliques. En effet, tous les phénols sont détectés dans la région des ultra-violets avec un pic d'absorption maximum à 280 nm dû à la présence du cycle phénolique. Le cycle B présent dans les différentes classes de flavonoïdes est caractérisé généralement par un pic d'absorption qui se situe dans un intervalle de mesure compris entre 300 et 380 nm, exception faite pour les anthocyanes dont le cycle B présente un maximum d'absorption entre 460 et 560 nm. Le tableau 23 concilie les différentes longueurs d'onde généralement utilisées dans le cas de l'étude des composés phénoliques (Merken et Beecher, 2000 ; Stecher *et al.*, 2001 ; Robbins, 2003).

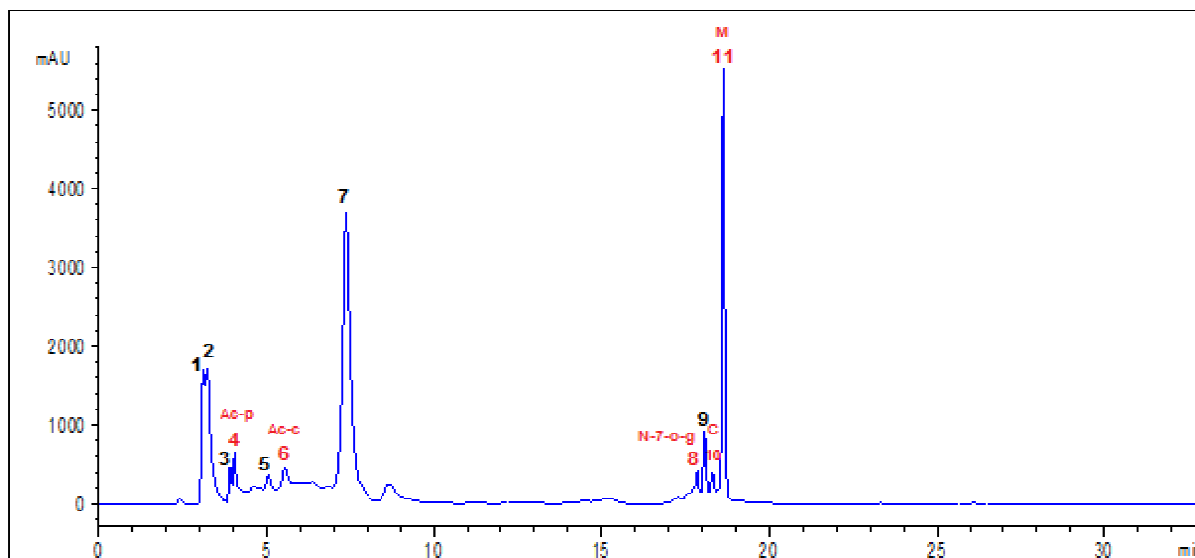
Tableau 23. Longueurs d'onde utilisées dans l'étude des composés phénoliques

Classes de composés phénoliques	λ_{\max} (nm)
Acide hydroxybenzoïque	280
Acide hydroxycinnamique	280, 320
Stilbène	280, 320
Flavanol	280
Dihydrochalcone	280
Flavonone	280
Flavone	280, 360
Isoflavone	280
Flavonol	280, 360
Isoflavone	280
Anthocyane	280, 520
Tanins	280

L'identification est basée sur la comparaison des temps de rétention des différents constituants des extraits avec ceux des différents standards analysés dans les mêmes conditions. Les données relatives aux temps de rétention sont présentées en annexe 3.

3.4.2.1. Analyse du profil chromatographique de la fraction acétate d'éthyle des fleurs d'*A. radiata*

Les essais réalisés sur la fraction acétate d'éthyle des fleurs d'*A. radiata* ont conduit à l'obtention de 11 pics (**Figure 58**). Cinq (05) composés phénoliques ont ainsi été identifiés, il s'agit de deux acides phénols (l'acide procatéchique (3.21%) et l'acide caféique (3.83%)), deux flavonoïdes (la naringénine-7-O-glucoside (1.46%) et la morine (27.09%)) et une coumarine (1.64%).



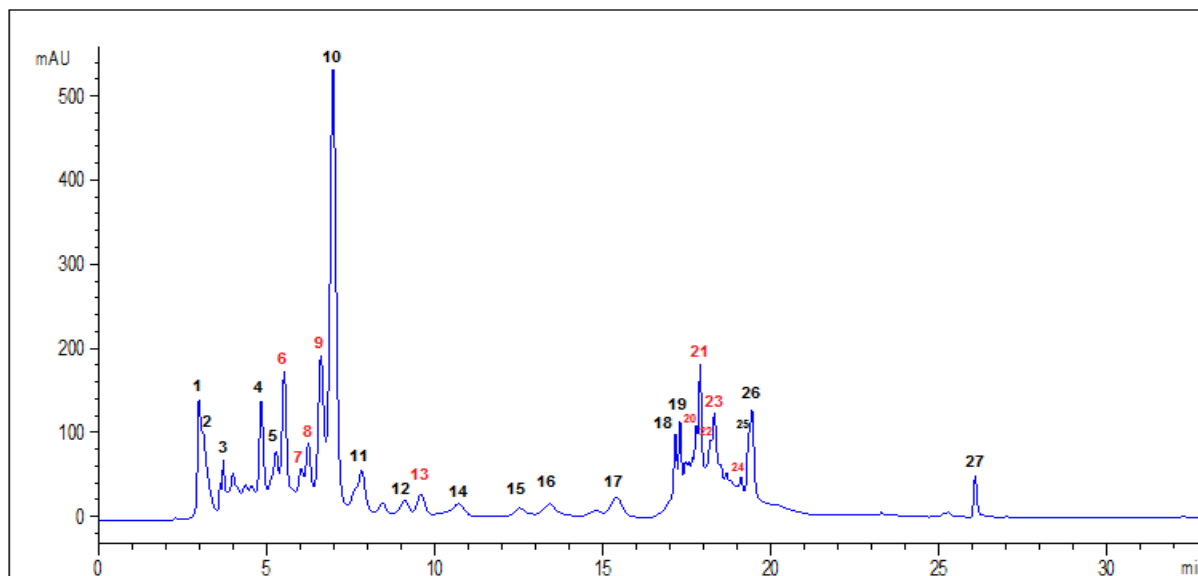
Ac-p : Acide procatéchique ; Ac-c : Acide caféique ; N-7-O-g : naringénine-7-O-glucoside ; C : coumarine ; M : morine

Figure 58 : Chromatogramme obtenu à 280 nm de la fraction FAE des fleurs d'*Anvillea radiata*

3.4.2.2. Analyse du profil chromatographique de la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne de *R. vesicarius*

Le chromatogramme obtenu (**Figure 59**) montre un massif assez peu résolu entre 2.5 - 7.5 min et entre 17 - 20 min. Le profil d'élution se caractérise par une augmentation de la ligne de base sur ces deux intervalles. Ce type de comportement traduit souvent la présence des tanins condensés, sous famille très hétérogène de polyphénols très présente dans le règne végétal. On parle alors de bosse des tanins (**Lantto et al., 2009**). Ainsi, la méthode d'identification par chromatographie confirme les premiers résultats obtenus par les dosages spectrophotométriques UV-Visible.

De plus, la présence de pics marqués tout au long de cette bosse suggère que d'autres polyphénols seraient par instant co-élus avec ces composés provoquant une augmentation de la densité optique. Ils nous permettent d'envisager la présence de différentes sous-familles polyphénoliques dans l'extrait.



3 : Acide tannique ; 6 : Acide génistique ; 7 : Acide vanillique ; 8 : Résorcinol ; 9 : Acide chlorogénique ; 13 : Acide syringique ; 20 : Naringénine ; 21 : Naringénine-7-O-glucoside ; 22 : Coumarine ; 23 : L'acide 3-(4-Méthoxyphényl) propinoïque ; 24 : Lutéoline.

Figure 59 : Chromatogramme obtenu à 280 nm de la fraction FAE de la partie aérienne de *R. vesicarius*

La comparaison des temps de rétention des composés extraits avec ceux des différents standards ne nous a permis que de suspecter la présence éventuelle de onze (11) composés phénoliques : l'acide tannique (un polyphénol de la famille des tanins : 0.65%), le résorcinol (2.93%), cinq acides phénols (l'acide génistique (6.54%), l'acide vanillique (1.40%), l'acide chlorogénique (9.13%), l'acide syringique (2.02%) et l'acide 3-(4-méthoxyphényl) propanoïque (2.20%)), une coumarine (1.06%) et trois composés flavoniques (la naringénine (1.05%), la naringénine-7-O-glucoside (2.91%) et la lutéoline (0.27%)).

4. Potentialités des plantes étudiées à la lumière des composés révélés

Contrairement aux métabolites dits primaires, les métabolites secondaires changent considérablement leur distribution parmi les espèces. Certains de ces composés sont produits seulement sporadiquement, tandis que d'autres sont largement distribués dans le règne végétal. Ils peuvent être spécifiques aux ordres, aux familles, aux espèces, et parfois même aux taxa (Laitinen *et al.*, 2000).

Les investigations phytochimiques menées sur les deux espèces : *Anvillea radiata* Coss. & Dur. et *Rumex vesicarius* L. ont permis de caractériser les principaux composés

phénoliques. Quatre grandes familles de composés ont été mises en évidence, il s'agit des acides phénols, des flavonoïdes, des tanins et des coumarines.

En raison de leur abondance dans le règne végétal et leurs bénéfices potentiels pour la santé humaine, les flavonoïdes sont l'objet d'une attention croissante. Présents en quantité notable dans les fruits et les légumes, mais aussi dans les boissons comme le thé, les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces de radicaux libres, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique permettant ainsi une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Ils sont également préconisés pour améliorer la stabilité des pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition des produits pharmaceutiques (pour un usage par voie orale) et cosmétiques (pour des applications locales) (**Moure et al., 2001**). De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que le cuivre et le fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production des radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (**Puppo, 1992 ; Van Acker et al., 1995**).

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une telle activité - l'activité antioxydante - ont été établis par plusieurs auteurs (**Van Acker et al., 1996 ; Aliaga et Lissi, 2004 ; Sroka, 2005**). Il s'agit de :

- la présence d'une fonction catéchol sur le cycle B ;
- la présence d'un motif énone dans le cycle C ;
- la présence de groupement hydroxyle en position 3.

En empêchant les ROS d'altérer l'ADN, les flavonoïdes limitent les mutations et les processus de carcinogénèses (**Merken et Beecher, 2000**). De ce fait, ils interviennent dans la prévention des cancers, des démences, de l'athérosclérose, de l'hypertension et des maladies cardio-vasculaires.

Outre leur pouvoir antioxydant, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de plusieurs types de microorganismes (**Diğrak et al., 1999 ; Babayi et al., 2004 ; Okigbo et al., 2005**). Bien que leur mécanisme d'action demeure encore imprécis, certaines études ont donné un début d'explication de leur potentiel antibactérien. En effet, selon les travaux réalisés par **Dadi et ses collaborateurs** en **2009**, la quercétine est capable d'inhiber la gyrase bactérienne par deux mécanismes :

- Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité ;

- Elle bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase.

Dans les deux cas, l'action de cette molécule se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement.

Ainsi, comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des études les plus importantes sur cette activité était celle d'**Ortuño et ses collaborateurs (2006)**, qui ont démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones extraites de *Cirtus paradisi* et de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. En effet, la naringinine, l'héspéridine, la nobilétine, la simensetine et la tangerétine extraites de ces deux espèces servent à protéger ces dernières contre les attaques de *Penicillium digitatum*.

Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (**Daglia, 2012**).

Certaines classes possèdent des potentialités oestrogéniques (isoflavones) et, plus généralement, les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses et diverses activités pharmacologiques : pour préserver l'intégrité vasculaire, pour leurs propriétés immunomodulatrices, anti-hépatotoxiques, anti-ostéoporotiques et contre les allergies (**Sannomiya et al., 2005 ; de Rijke et al., 2006**). Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents antiulcéreux, antispasmodiques, anti-sécréteurs et antidiarrhéiques (**Di Carlo et al., 1999**).

Les acides phénols, comme les flavonoïdes et d'autres polyphénols, jouent un rôle reconnu dans le maintien d'un bon état de santé et pourraient participer à la prévention de pathologies en partie liées à un excès de radicaux et au stress oxydatif (affections cardiovasculaires et dégénératives). L'acide chlorogénique, comme l'acide caféique, inhibe (*in vitro*) les réactions de nitrosation et certains processus d'altération des acides nucléiques (**Chen et Ho, 1997 ; Natella et al., 1999 ; Bruneton, 2009**).

De telles propriétés ont donc été exploitées, et trouvent des applications dans de nombreux domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique.

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail avait pour but l'étude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes : *Anvillea radiata* Coss. & Dur. de la famille des Asteraceae et *Rumex vesicarius* L. de la famille des Polygonaceae, choisies sur la base de leurs usages traditionnels.

Cette étude s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe « Etude des composés volatils (huiles essentielles) et des composés phénoliques (flavonoïdes) ». L'objectif était d'apporter des éléments pour la validation de certaines propriétés des plantes étudiées, l'identification de leurs principes actifs et la mise au point des méthodes de dosage et d'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne.

Pour ce faire, nous avons au préalable effectué un criblage préliminaire des différentes familles de métabolites secondaires contenues dans les deux espèces en question. La nature des principes chimiques mis en évidence laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes. Il s'agit essentiellement des flavonoïdes, des tanins et des saponosides. L'espèce *Anvillea radiata* renferme, en plus de ces molécules, des alcaloïdes. Ces derniers sont en majorité retrouvés dans les feuilles. Quant aux coumarines, elles sont présentes dans la partie aérienne de *Rumex vesicarius*.

L'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs. Elle dépend à la fois du solvant d'extraction et de la nature de l'organe étudié. Nous avons tenté, dans un premier temps, d'extraire les composés phénoliques totaux par extraction solide-liquide en utilisant trois solvants choisis de manière à solubiliser un maximum de composés. Les différents extraits obtenus ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en polyphénols, en flavonoïdes, en flavonols et en tanins. Considérant les organes, les fleurs d'*A. radiata* accusent les teneurs les plus élevées en ces composés. Par ailleurs, nous avons démontré que le méthanol aqueux est le meilleur extracteur des flavonoïdes contenant dans cette espèce (164.486 ± 0.843 mg EC/g de matière végétale sèche), tandis que l'acétone aqueux possède la capacité d'extraire plus de tanins. *Rumex vesicarius* s'est avérée riche en ces molécules présentant ainsi des valeurs allant de 2.283 ± 0.055 à 46.771 ± 0.398 mg EC/g MS.

La détermination de la teneur en pigments liposolubles révèle la richesse de *Rumex vesicarius* en β -carotène (116.893 ± 1.602 μ g/g MS), en lycopène (156.403 ± 1.592 μ g/g MS) et en chlorophylle a (271.447 ± 3.457 μ g/g MS). Ainsi, en comparant les différents organes d'*A. radiata*, nous remarquons que les fleurs contiennent une teneur élevée en β -carotène (38.831 ± 0.927 μ g/g MS) et en lycopène (48.911 ± 0.567 μ g/g MS). Par contre, les

feuilles sont riches en chlorophylle a ($131.844 \pm 1.267 \mu\text{g/g MS}$). Ces composés mineurs confèrent aux deux plantes des qualités nutritionnelles et thérapeutiques importantes.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à obtenir un extrait enrichi en métabolites d'intérêt – les flavonoïdes. Un protocole d'extraction a été optimisé afin de concentrer les composés dans un extrait adapté en réalisant des extractions successives avec des solvants de polarité croissante. Nous avons d'abord éliminé tous les composés apolaires (stéroïls, triterpènes, chlorophylles, ...). Cette première étape a permis de fragiliser les cellules végétales en laissant pénétrer le premier solvant d'extraction, puis de simplifier les extraits enrichis que nous avons obtenu avec le n-butanol et l'acétate d'éthyle. Ces derniers présentent des teneurs respectives de ($55.910 \pm 1.022 \text{ mg EC/g MS}$) et ($47.394 \pm 1.497 \text{ mg EC/g MS}$) pour les fleurs d'*A. radiata* et de ($5.597 \pm 0.038 \text{ mg EC/g MS}$) et ($4.648 \pm 0.068 \text{ mg EC/g MS}$) pour la partie aérienne de *R. vesicarius*.

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits/fractions a été réalisée par différentes méthodes, à savoir : le piégeage du radical libre DPPH•, la capacité antioxydante totale, le pouvoir réducteur des ions ferriques, le piégeage du radical-cation ABTS^{•+}, l'inhibition du blanchiment du bêta-carotène et la chélation des ions ferreux. Nous avons constaté que les différents extraits bruts et les différentes fractions testés présentent des activités antiradicalaires et antioxydantes intéressantes, dépendantes du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes et une relation linéaire a été établie ; les fractions les plus riches en flavonoïdes étant les plus actives. Cependant, l'intensité de l'activité antioxydante ne dépend pas uniquement de la teneur globale en flavonoïdes mais également de leur nature. Ainsi, la très forte inhibition de l'oxydation lipidique par la fraction hexanique des fleurs d'*A. radiata*, pourtant très peu concentrée en polyphénols, peut être attribuée à d'autres substances (cires, acides gras, stéroïls, triterpènes, caroténoïdes, flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, coumarines) qui peuvent agir indépendamment ou en synergie.

Les extraits de ces deux espèces végétales ont été également soumis à un criblage pour leur possible activité antimicrobienne *in vitro*, contre six souches de bactéries pathogènes, deux espèces de levures et trois moisissures, en employant la méthode de diffusion sur disque et la méthode de microdilution en milieu liquide. Nous avons constaté que seuls les extraits hydro-acétonique et hydro-méthanolique des feuilles d'*A. radiata* étaient actifs vis-à-vis de *B. cereus* avec des diamètres variant entre 8 et 13 mm. Par ailleurs, les fractions les moins polaires ont montré les activités les plus élevées et les CMI ont été déterminée à partir des fractions les plus actives en milieu gélosé. Les fractions chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique des feuilles d'*A. radiata* ont témoigné d'une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*, avec des CMI situées entre 0.156 -

0.625 mg/ml. Par contre les extraits de *Rumex vesicarius* se sont révélés inactifs vis-à-vis de toutes les souches microbiennes testées. De même, une tendance a été montrée, indiquant que les extraits les plus riches en flavonoïdes présentent des activités antibactériennes les plus élevées.

L'identification chromatographique menées sur les deux espèces a permis de caractériser les principaux composés phénoliques. Quatre grandes familles de composés ont été mises en évidence : il s'agit de deux acides phénols (l'acide procatéchique (3.21%) et l'acide caféique (3.83%)), deux flavonoïdes (la naringénine-7-O-glucoside (1.46%) et la morine (27.09%)) et une coumarine (1.64%) dans la FAE des fleurs d'*A. radiata* et de l'acide tannique (0.65%), le résorcinol (2.93%), cinq acides phénols (l'acide gentisique (6.54%), l'acide vanillique (1.40%), l'acide chlorogénique (9.13%), l'acide syringique (2.02%) et l'acide 3-(4-méthoxyphényl) propanoïque (2.20%)), une coumarine (1.06%) et trois composés flavoniques (la naringénine (1.05%), la naringénine-7-O-glucoside (2.91%) et la lutéoline (0.27%)) dans la FAE de la partie aérienne de *R. vesicarius*. Ces principes actifs majeurs possèdent diverses activités biologiques et jouent un rôle reconnu dans le maintien d'un bon état de santé.

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 d'étayer ce travail par :

- La purification et l'identification des principes actifs ;
- L'étude de la toxicité de ceux-ci sur différentes lignées cellulaires (*in vitro*) et sur des modèles utilisant les animaux (*in vivo*) afin de déterminer les doses thérapeutiques et les doses létales car les remèdes traditionnels souffrent beaucoup du problème de dosages ;
- Tester l'activité antidiabétique et anti-inflammatoire d'*Anvillea radiata* ; ces activités biologiques répondent aux usages majeurs de la plante selon les résultats de l'enquête ethnobotanique.
- Cette étude est en partie de l'usage traditionnel des plantes, mais aujourd'hui, avec la rapide dégradation de l'environnement suivie de la disparition de nombreuses espèces végétales, les études de pharmacognosie ne doivent plus se contenter uniquement des espèces qui font l'objet d'un usage traditionnel, mais de toutes les espèces disponibles au risque de laisser des molécules qui resteront à jamais inconnues.

Références bibliographiques

1. **Albericio, F.** De la conception du médicament à son développement : l'indispensable chimie. *In : Bach, J.-F., Blanchard-Desce, M., Couvreur, P., Darel, F.* La chimie et la santé, au service de l'homme. EDP Sciences, 2010, pp. 77-90.
2. **Alekshun, M. N., Levy, S. B.** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 2007, vol. 128, n° 6, pp. 1037-1050.
3. **Al-Farsi, M. A., Lee, C. Y.** Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, 2008, Vol. 108, n° 3, pp. 977-985.
4. **Alfawaz, M. A.** Chemical composition of hummayd (*Rumex vesicarius*) grown in Saudi Arabia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, vol. 19, pp. 552-555.
5. **Aliaga, C., Lissi, E. A.** Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin: An experimental and theoretical study. *Revue canadienne de chimie*, 2004, vol. 82, n° 12, pp. 1668-1673.
6. **Al-Rumaih, M. M., Al-Saad, F. A., Warsy, A. S.** Seasonal Variation in Mineral Content of Different Organs During Development of *Rumex vesicarius* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2002, vol. 9, n° 1, pp. 69-79.
7. **Amin, A. H., Subbaiah, T. V., Abbasi, K. M.** Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Canadian Journal of Microbiology*, 1969, vol. 15, n° 9, pp. 1067-1076.
8. **Ananthi, S., Raghavendran, H. R., Sunil, A. G., Gayathri, V., Ramakrishnan, G., Vasanthi, H. R.** In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food and Chemical Toxicology*, 2010, vol. 48, n° 1, pp. 187-192.
9. **Awah, F. M., Uzoegwu, P. N., Ifeonu, P., Oyugi, J. O., Rutherford, J., Yao, X. J., Fehrmann, F., Fowke, K. R., Eze, M. O.** Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 2012, vol. 131, n° 4, pp. 1279-1286.
10. **Babaamer, Z. Y., Sakhri, L., Al-Jaber, H. I., Al-Qudah, M. A., Abu Zarga, M. H.** Two new taraxasterol-type triterpenes from *Pergularia tomentosa* growing wild in Algeria. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2012, vol. 14, n° 2, pp. 1137-1143.
11. **Babayi, H., Kolo, I., Okogun, J. I., Ijah, U. J. J.** The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biokemistri*, 2004, vol. 16, n° 2, pp. 106-111.
12. **Babulka, P.** Les rumex, de l'ethnobotanique à la phytothérapie moderne (*Rumex* spp.). *Phytothérapie*, 2004, vol. 2, n° 5, pp. 153-156.
13. **Badiaga, M.** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith., une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de Doctorat. Mali : Université de Bamako, 2011.
14. **Baltz, R. H.** Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, vol. 8, n° 5, pp. 557-563.

- 15. Barkely, T. M., Brouillet, L., Strother, J. L.** Asteraceae. *In: Flora of North America Editorial Committee.* Flora of North America, North of Mexico. vol. 19. New York: Oxford University Press, 2006, pp. 3-69.
- 16. Barros, L., Cabrita, L., Boas, M. V., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R.** Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chemistry*, 2011, vol. 127, n° 4, pp. 1600-1608.
- 17. Bauer, W. D., Mathesius, U.** Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, vol. 7, n° 4, pp. 429-433.
- 18. Beaudeau, J. L., Durand, G.** Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives. 2^{ème} ed. Paris: Lavoisier, 2011.
- 19. Bekhechi, C., Atik Bekkara, F., Consiglio, D., Bighelli, A., Tomi, F.** Chemical variability of the essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, 2012, vol. 9, n° 12, pp. 2742-2753.
- 20. Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M. R., Rome, S.** Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil*, 1998, vol. 203, pp. 27-36.
- 21. Bélanger, J., Balakrishna, M., Latha, P., Katumalla, S., Johns, T.** Contribution of selected wild and cultivated leafy vegetables from South India to lutein and β -carotene intake. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 2010, vol. 19, n° 3, pp. 417-424.
- 22. Belkheiri, N.** Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat. Toulouse : Université Paul Sabatir, 2010.
- 23. Bendimerad, N., Taleb Bendiab, S. A., Benabadji, A. B., Fernandez, X., Valette, L., Lizzani-Cuvelier, L.** Composition and antibacterial activity of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) essential oil from Algeria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, n° 8, pp. 2947-2952.
- 24. Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Panovska, T. K.** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *Comptes Rendus Chimie*, 2009, vol. 12, n° 12, pp. 1259-1266.
- 25. Ben Mansour, H., Latrach Tlemcani, L.** Les colorants naturels sont-ils de bons additifs alimentaires ? *Phytothérapie*, 2009, vol. 7, pp. 202-210.
- 26. Bergogne-Bérézin E., Brogard J. M.** Bases biologiques de l'antibiothérapie. ed., Masson, 1999, p. 27.
- 27. Bhaskarachary, K., Sankar Rao, D. S., Deosthale, Y. G., Reddy, V.** Carotene content of some common and less familiar foods of plant origin. *Food Chemistry*, 1995, vol. 54, n° 2, pp. 189-193.
- 28. Billing, J., Sherman, P. W.** Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Quarterly Review of Biology*, 1998, vol. 73, n° 1, pp. 3-49.
- 29. Bock, B.** eFlore, la flore électronique de Tela Botanica : *Anvillea radiata* Coss. & Durieu. 2008. <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-85434-illustrations>
- 30. Bonnaille, C., Salacs, M., Vassiliova, E., Saykova, I.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, 2012, n° 7, pp. 35-45.

- 31. Borchers, A. T., Keen, C. L., Hannum, S. M., Gershwin, E. M.** Cocoa and chocolate: Composition, Bioavailability and Health implications. *Journal of Medicinal Food*, 2000, vol. 3, n° 2, pp. 77-105.
- 32. Botineau, M.** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Paris : Tec & Doc Lavoisier, 2010.
- 33. Bouchet, P., Hugon, J.-C., Maynadier, A.-M., Mortier, Y.** Les OGM en questions : Dossier pédagogique. Montpellier : Educagri, 2005.
- 34. Boullard, B.** Plantes médicinales du monde : réalités et croyances. Paris: ESTEM, 2001.
- 35. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, vol. 28, pp. 25-30.
- 36. Bruneton, J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 2009.
- 37. Cady, J. B., Morgan, W. S.** Treatment of chronic ulcers with chlorophyll: Review of a series of fifty cases. *The American Journal of Surgery*, 1984, vol. 75, n° 4, pp. 562-569.
- 38. Callery, E.** Le grand livre des herbes : Le guide pratique de la culture, du séchage et des vertus de plus de 50 herbes. Cologne : Könemann Verlag, 1998.
- 39. Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S., Vasson, M. P., Hasselmann, M., Lerverve, X.** Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Paris : Springer-Verlag, 2007.
- 40. Cardey, B.** Étude théorique des mécanismes d'oxydation de thiols en milieu d'intérêt biologique. Thèse de Doctorat. Besançon : Université de Franche-Comté, 2007.
- 41. Catier, O., Roux, D.** Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie : Cahiers du préparateur en pharmacie. 3^{ème} ed. France : Wolters Kluwer, 2007.
- 42. Chebil, L.** Acylation des flavonoïdes par lipases de *Candida antartica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de Doctorat. Lorraine : INPL, 2006.
- 43. Chehma, A.** Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Université d'Ouargla : Laboratoire de Protection des écosystèmes en zones arides et semi-arides, 2006, p.18.
- 44. Chen, J. H., Ho, C. T.** Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, vol. 45, n° 7, pp. 2374-2378.
- 45. Clément, R.-P.** Aux racines de la phytothérapie : entre tradition et modernité (1^{ère} partie). *Phytothérapie*, 2005, vol. 3, n° 4, pp. 171-175.
- 46. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Interrégion Paris-Nord.** Antiseptiques et désinfectants. Paris, 2000, pp. 7-8.
- 47. Collin, S., Cruzet, J.** Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Paris : Tec & Doc Lavoisier, 2011.
- 48. Corcoran, O., Spraul, M.** LC–NMR–MS in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2003, vol. 8, n° 14, pp. 624-631.

49. **Counet, C., Collin, S.** Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, n° 23, pp. 6816-6822.
50. **Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N.** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 2009, vol. 26, n° 8, pp. 1001-1043.
51. **Dadi, P. K., Ahmad, M., Ahmad, Z.** Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, vol. 45, n° 1, pp. 72-79.
52. **Daglia, M.** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, vol. 23, n° 2, pp. 174-181.
53. **Dashwood, R. H., Breinholt, V., Bailey, G.** Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B1 (AFB1)-DNA-binding in vivo and antimutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the Salmonella mutagenicity assay. *Carcinogenesis*, 1991, vol. 12, n° 5, pp. 939-942.
54. **da Silva, L. C., da Silva, C. A. Jr., de Souza, R. M., José Macedo, A., da Silva, M. V., dos Santos Correia, M. T.** Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, vol. 49, n° 9, pp. 2222-2228.
55. **Daum-Badouard, C.** Les lésions des acides nucléiques : détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de Doctorat. Grenoble : Université Joseph-Fourier, 2006.
56. **Dawson, R., Elliott, D., Elliott, W., Jones, K.** Dictionnaire de biochimiste. Moscou : Mir, 1991. In : **N'gaman Kohué, C. C., Békro, Y.-A., Mamyrbékova-Békro, J. A., Béné, A., Gooré, B. S.** Sur la Composition en Métabolites Secondaires et L'activité Anti-Oxydante D'extraits Bruts de *Gmelina Arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest : Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *European Journal of Scientific Research*, 2009, vol. 36, n° 2: 161-171.
57. **Dekker, M.** Coumarins: analysis by TLC. *Encyclopedia of chromatography*, 2002, pp. 1-3.
58. **Dendougui, H., Jay, M., Benayache, F., Benayache, S.** Flavonoids from *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2006, vol. 34, n° 9, pp. 718-720.
59. **de Oliveira, S., de Souza, G. A., Eckert, C. R., et al.** Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 2014, vol.37, n° 3. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140076>
60. **De-Reynal, B., Multon, J.-L.** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. 4^{ème} ed. Paris : Tec & Doc Lavoisier, 2009.
61. **de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. A.** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1112, n° (1-2), pp. 31-63.
62. **Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., Capasso, F.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 1999, vol. 65, n° 4, pp. 337-353.
63. **Dickinson, D. A., Forman, H. J.** Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 2002, vol. 64, n° 5-6, pp. 1019-1026.

- 64. Diğrak, M., İlçim, A., Alma, M. H., Şen, S.** Antimicrobial activities of the extracts of various plants (valex, mimosa bark, gallnut powders, *Salvia sp.* and *Phlomis sp.*). *Turkish Journal of Biology*, 1999, vol. 23, pp. 241-248.
- 65. Djellouli, M., Moussaoui, A., Benmehdi, H., Ziane, L., Belabbes, A., Badraoui, B., Slimani, N., Nourddine, H.** Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae family) from the region of south west algeria. *Asian Journal of Natural & Applied Sciences*, 2013, vol. 2, n° 2, pp. 59-65.
- 66. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 2006, vol. 97, n° 4, pp. 654-660.
- 67. Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L. M., Badoc, A., Gmira, N.** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroïdes*. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 2003, vol. 142, pp. 61-78.
- 68. El-Bakry, A. A., Mostafa, H. A. M., Alam, E. A.** Antibacterial and antioxidant activities of seedlings of *Rumex vesicarius* L. (Polygonaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 2013, vol. 7, n° 29, pp. 2158-2164.
- 69. El-Haci, I. A., Atik-Bekkara, F., Didi, A., Gherib, M., Didi M. A.** Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie*, 2012, vol. 10, n° 5, pp. 280-285.
- 70. El-Haci, I. A., Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., Mazari, W., Gherib, M., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F.** Antimicrobial activity of *Ammodaucus leucotrichus* fruit oil from Algerian Sahara. *Natural Product Communications*, 2014, vol. 9, n° 5, pp. 711-712.
- 71. El Hanbali, F., El Hakmaoui, A., Mellouki, F., El Rhaffari, L., Akssira, M.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Anvillea radiata* Coss. & Dur. *Natural Product Communications*, 2007, vol. 2, n° 5, pp. 595-597.
- 72. El Hassany, B., El Hanbali, F., Akssira, M., Mellouki, F., Haidour, A., Barrero, A. F.** Germacranolides from *Anvillea radiata*. *Fitoterapia*, 2004, vol. 75, n° 6, pp. 573-576.
- 73. El-Hawary, S. A., Sokkar, N. M., Ali, Z. Y., Yehia, M. M.** A Profile of Bioactive Compounds of *Rumex vesicarius* L. *Journal of Food Science*, 2011, vol. 76, n° 8, pp. C1195-C1202.
- 74. Elmastaş, M., Gülçin, İ., Işildak, Ö., Küfrevioğlu, Ö. İ., İbaoglu, K., Aboul-Enein, H. Y.** Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2006, vol. 3, n° 3, pp. 258-266.
- 75. Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E.** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 2008, vol. 110, pp. 76-82.
- 76. Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C.** Polyphenols extraction from foods. In: **Saltmarsh, M., Santos-Buelga, C., Williamson, G.** Methods in polyphenol analysis. Great Britain: Royal Society of Chemistry, 2003, pp. 1-16
- 77. Falconer, S. B., Brown, E. D.** New screens and targets in antibacterial drug discovery. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, vol. 12, n° 5, pp. 497-504.
- 78. Falleh, H., Ksouri, R., Abdelly, C.** Activité antioxydante et contenu en polyphénols dans les différents organes de l'artichaut sauvage, *Cynara cardunculus*. *Revue des Régions Arides*, 2007, vol. 1, pp. 341-344.

- 79. Favier, A.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 2003, pp. 108-115.
- 80. Ferreria, A., Proenca, C., Serralheiro, M. L. M., Araujo, M. E. M.** The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 2006, vol. 108, pp. 31-37.
- 81. Ferruzzi, M. G., Böhm, V., Courtney, P. D., Schwartz, S. J.** Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *Journal of Food Science*, 2002, vol. 67, n° 7, pp. 2589-2595.
- 82. Filho, J. M. B., Alencar, A. A., Nunes, X. P., et al.** Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta-, and epsilon carotenes: A twentieth century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2008, vol. 18, n° 1. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100023>
- 83. Foda, E. E., Ewais, E. A., Abaas, M. A.** Biochemical screening and pharmacological evaluations for the *Rumex vesicarius* extracts. *Report and Opinion*, 2013, vol. 5, n° 11, pp. 48-55.
- 84. Forkmann, G., Martens, S.** Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, vol. 12, n° 2, pp. 155-160.
- 85. Frankel, E. N., Meyer, A. S.** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, vol. 80, n° 13, pp. 1925-1940.
- 86. Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J. B., Bauer, W. D.** Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, vol. 16, n° 9, pp. 827-834.
- 87. Garait, B.** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. Thèse de Doctorat. Grenoble : Université Joseph-Fourier I, 2006.
- 88. Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A.** Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 2010, vol. 15, n° 12, pp. 8813-8826.
- 89. Gherib, M., Atik Bekkara, F., Bekhechi, C., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil from Algerian *Warionia saharae* Benth. & Hook. *Journal of Essential Oil Research*, 2014, vol. 26, n° 5, pp. 385-391.
- 90. Gibbons, S.** Phytochemicals for bacterial resistance - strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, 2008, vol. 74, n° 6, pp. 594-602.
- 91. Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A.** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol. 41, n° 4, pp. 1220-1234.
- 92. Goossens, H., Guillemot, D., Ferech, M., Schlemmer, B., Costers, M., van Breda, M., Baker, L. J., Cars, O., Davey, P. G.** National campaigns to improve antibiotic use. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2006, vol. 62, n° 5, pp. 373-379.
- 93. Graham, L. P., Depovere, P.** Chimie pharmaceutique. ed. De Boeck, 2002, p. 154.
- 94. Grayer, R. J., Chase, M. W., Simmonds, M. S. J.** A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of

Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". *Biochemical Systematics and Ecology*, 1999, vol. 27, n° 4, pp. 369-393.

95. Grubben, G. J. H., Denton, O. A. Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale 2. Légumes. Wageningen, Pays-Bas : Fondation PROTA, 2004.

96. Guignard, J. L., Dupont, F. Botanique : Systématique moléculaire. 14^{ème} ed. Paris : Masson, 2007, p. 188.

97. Guinoiseau, E. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat. Corse : Université de Corse-Pasquale Paoli, 2010.

98. Guy, B. K., Akhanovna, M.-B. J., Odette, D. D., Jonathan, G. S., Yves-Alain, B. Sur la Composition Phytochimique Qualitative des Extraits bruts Hydrométhanoliques des Feuilles de 6 Cultivars de *Manihot Esculenta* Crantz de Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*, 2010, vol. 45, n° 2, pp. 200-211.

99. Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Zaouali, Y., Ksouri, R., Attou, A., Benmansour, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, pp. 253-258.

100. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3^{ème} ed. Oxford University Press, 1999.

101. Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., Goodman, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 1998, vol. 5, n° 10, pp. R245-R249.

102. Hariprasad, D., Ramakrishnan, S. Antioxidant assay of *Rumex vesicarius* L. *International Journal of Current Research*, 2011, vol. 3, n° 11, pp. 074-076.

103. Hariprasad, D., Ramakrishnan, S. In vitro lipid peroxidation assay of *Rumex vesicarius* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012, vol. 4, n° 1, pp. 368-370.

104. Holevinsky, K. O., Nelson, D. J. Simultaneous detection of free radical release and membrane current during phagocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, vol. 270, n° 14, pp. 8328-8336.

105. Hopkins, W. G. Physiologie végétale. 1^{ère} ed. Bruxelles : De Boeck & Larcier s. a., 2003.

106. Hostettmann, K., Wolfender, J.-L. Applications of liquid chromatography/UV/MS and liquid chromatography/NMR for the on-line identification of plant metabolites. In: **Tringali, C.** Bioactive compounds from natural sources: isolation, characterization and biological properties. Londres: Taylor and Francis e-Library, 2004, pp. 31-68.

107. Huang, H. Y., Appel, L. J., Croft, K. D., Miller, E. R., Mori, T. A., Puddey, I. B. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2002, vol. 76, n° 3, pp. 549-555.

108. Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, n° 6, pp. 1841-1856.

109. Hubert, A. J. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de doctorat. Toulouse : INPT, 2006.

- 110. Isbell, J., Xu, R., Cai, Z., Kassel, D. B.** Realities of high-throughput liquid chromatography/mass spectrometry purification of large combinatorial libraries: a report on overall sample throughput using parallel purification. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 2002, vol. 4, n° 6, pp. 600-611.
- 111. Jalal, M. A. F., Collin, H. A.** Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of *Theobroma cacao*. *Phytochemistry*, 1977, vol. 16, n° 9, pp. 1377-1380.
- 112. Javanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M. J.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, vol. 116, n° 11, pp. 4846-4851.
- 113. Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S.** Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Czech Journal of Food Sciences*, 2010, vol. 28, n° 3, pp. 206-212.
- 114. Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P.** Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. 1^{ère} ed. Paris : De Boeck Supérieur, 2002.
- 115. Kabran, G. R., Ambeu, N. C., Mamyrbékova-Békro, J. A., Békro, Y.-A.** CCM D'extraits Sélectifs de 10 Plantes Utilisées Dans le Traitement Traditionnel du Cancer du Sein en Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*, 2011, vol. 63, n° 4, pp. 592-603.
- 116. Kamat, J. P. Bloor, K. K., Devasagayam, T. P.** Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, vol. 1487, n° (2-3), pp. 113-127.
- 117. Kar, A.** Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. 2nd ed. Daryaganj, New Delhi: New Age International (P) Limited, 2007, pp. 122-777.
- 118. Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S.** Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2009, vol. 2, n° 1, pp. 41-60.
- 119. Katoh, Y., Nemoto, N., Tanaka, M., Takayama, S.** Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. *Mutation Research*, 1983, vol. 121, n° 2, pp. 153-215.
- 120. Kaur, C., Kapoor, H.-C.** Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 2002, vol. 37, n° 2, pp. 153-161.
- 121. Kennedy, J. A.** Proanthocyanidins: Extraction, Purification and Determination of Subunit Composition by HPLC. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2002. doi: 10.1002/0471142913.fai0104s06
- 122. Kingston, D. G. I.** Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *Journal of Natural Products*, 2011, vol. 74, n° 3, pp. 496-511.
- 123. Koehn, F. E., Carter, G. T.** The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, vol. 4, n° 3, pp. 206-220.
- 124. Koffi, E., Sea, T., Dodehe, Y., Soro, S.** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2010, vol. 5, n° 3, pp. 550- 558.
- 125. Koleva, I. I., Teris, A. B., Jozef, P. H., Linssen, A. G., Lyuba, N. E.** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 2002, vol. 13, n° 1, pp. 8-17.

- 126. Krief, S.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : Surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat. Gif-sur-Yvette: MNHN, 2003.
- 127. Kumaran, A., Karunakaran, R. J.** In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 2007, vol. 40, n° 2, pp. 344-352.
- 128. Ladyguina, E. Y., Safronitch, L. N., Otriachenkova, V. E., Balandina, I. A., Grinkevitch, N. I.** Analyse chimique des plantes médicinales. Edition Moskva, Vischaya Chkola, 1983.
- 129. Lagnika, L.** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de Doctorat. Strasbourg : Université Louis Pasteur, 2005.
- 130. Laitinen, M.-L., Julkunen-Tiitto, R., Rousi, M.** Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *Journal of Chemical Ecology*, 2000, vol. 26, n° 7, pp. 1609-1622.
- 131. Lantto, T. A., Dorman, H. J. D., Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., Tikhonov, V. P., Hiltunen, R., Raasmaja, A.** Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry*, 2009, vol. 112, n° 4, pp. 936-943.
- 132. Le Houérou, H. N.** Biogeography of the arid steppeland north of the Sahara. *Journal of Arid Environments*, 2001, vol. 48, n° 2, pp. 103-128.
- 133. Leitaó, C.** Etude de composés à intérêt technologique et fonctionnel dans la bière. Thèse de Doctorat. Strasbourg : IPHC, 2011.
- 134. Levine, R. L.** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002, vol. 32, n° 1, pp. 790-796.
- 135. Lewis, K.** In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2001, vol. 3, n° 2, pp. 247-254.
- 136. Lewis, K., Ausubel, F. M.** Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature Biotechnology*, 2006, vol. 24, n° 12, pp. 1504-1507.
- 137. Lhuillier, A.** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* baker (Myrsinaceae). Thèse de Doctorat. Toulouse : Université Paul Sabatier, 2007.
- 138. Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H., Wang, R.** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol. 26, n° 3-4, pp. 285-294.
- 139. Linuma, M., Ito, T., Miyake, R., Tosa, H., Tanaka, T., Chelladurai, V.** A xanthone from *Garcinia cambogia*. *Phytochemistry*, 1998, vol. 47, n° 6, pp. 1169-1170.
- 140. Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F.** Antioxydant proprieties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivium* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, vol. 86, n° 3, pp. 477-485.
- 141. Londonkar, R., Asha Tukappa, N. K.** Pharmacognostical evaluation and comparative phytochemical screening of *Rumex vesicarius* L. *International Journal of Phytomedicine*, 2013, vol. 5, pp. 146-153.

- 142. Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C.** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 2005.
- 143. Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N.** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 2013, vol. 9, pp. 35-40.
- 144. Maiza, K., Brac de la Perrière, R. A., Hammiche, V.** Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. *In: Schröder, E., Balansard, G., Cabalion, P., Fleurentin, J., Mazars, G.* Médicaments et aliments : L'approche ethnopharmacologique. Actes du 2ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11^{ème} Conférence internationale d'Ethnomédecine. Heidelberg, 1993, pp. 169-171.
- 145. Mamrybekova-Bekro, J. A., Boua, B. B., Kouassi, K. C., Békro, Y.-A.** Sur l'analyse qualitative et pharmacologique de 2 plantes antihypertensives utilisées à N'gramanssabo en Côte d'Ivoire. *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 2013a, vol. 8, pp. 2-12.
- 146. Mamrybekova-Bekro, J. A., Boua, B. B., Diaby, A., Békro, Y.-A.** Screening phytochimique bio guidé et évaluation in vitro des propriétés purgatives de *Anchomanes difformis* (Blume) Engl., une plante utilisée en Côte d'Ivoire dans le traitement folklorique de la constipation. *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 2013b, vol. 9, pp. 20-26.
- 147. Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., Ismail, N.** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 2009, vol. 116, n° 1, pp. 306-312.
- 148. Markham, K. R.** Techniques of flavonoid identification: Biological techniques series. ed., Treherne J. E. et Rubery P. H. Academic Press, 1982.
- 149. Marston, A., Hostettmann, K.** Separation and Quantification of Flavonoids. *In: Andersen, O. M., Markham, K. R.* Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press: Taylors and Francis, 2006, pp. 1-36.
- 150. Marston, A.** Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 2011, vol. 1218, n° 19, pp. 2676-2683.
- 151. Mebarki, L., Kaid Harche, M., Benlarbi, L., Rahmani, A., Sarhani, A.** Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of *Anvillea Radiata*. *World Applied Sciences Journal*, 2013, vol. 26, n° 2, pp. 165-171.
- 152. Merken, H. M., Beecher G. R.** Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, vol. 48, n° 3, pp. 577-599.
- 153. Michel, T.** Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de Doctorat. Université d'Orléans, 2011.
- 154. Miller, N. J., Rice-Evans, C. A.** Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 1996, vol. 2, pp. 161-168.
- 155. Mišan, A. C., Mimica-Dukić, N. M., Mandić, A. I., Sakač, M. B., Milovanović, I. J., Sedej, I. J.** Developpement of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Central European Journal of Chemistry*, 2011, vol. 9, n° 1, pp. 133-142.

- 156. Mocali, S., Benedetti, A.** Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 2010, vol. 161, n° 6, pp. 497-505.
- 157. Molyneux, P.** The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2004, vol. 26, n° 2, pp. 211-219.
- 158. Montagnier, L., Olivier, R., Pasquier, C.** Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases. New York: Marcel Dekker, 1998.
- 159. Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Manuel Dominguez, J., Sineiro, J., Dominguez, H., Nuñez, M. J., Carlos Parajo, J.** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 2001, vol. 72, n° 2, pp. 145-171.
- 160. Moss, G. P.** Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, 2000, vol. 72, n° 8, pp. 1493-1523.
- 161. Mostafa, H. A. M., El-Bakry, A. A., Alam, E. A.** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of different plant parts of *Rumex vesicarius* L. (Polygonaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2011, vol. 3, n° 2, pp. 109-118.
- 162. Moussaoui, F., Zellagui, A., Segueni, N., Touil, A., Rhouati, S.** Flavonoid constituents from algerian *Launaea resedifolia* (O.K.) and their antimicrobial activity. *Records of Natural Products*, 2010, vol. 4, pp. 91-95.
- 163. Murthy, R.** Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. *Chest*, 2001, vol. 119, n° 2, pp. 405S-411S.
- 164. Naczk, M., Shahidi, F.** Extraction and analysis of phenolics in foods. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1054, n° 1-2, pp. 95-111.
- 165. Naczk, M., Shahidi, F.** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol. 41, n° 5, pp. 1523-1542.
- 166. Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., Scaccini, C.** Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, vol. 47, n° 4, pp. 1453-1459.
- 167. National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. NCCLS document M100- S11. USA: Villanova, vol. 21, n° 1, 2001.
- 168. National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. NCCLS document M44-A. USA: Wayne, vol. 24, n° 15, 2004.
- 169. N'gaman Kohué, C. C., Békro, Y.-A., Mamyrbékova-Békro, J. A., Bénié, A., Gooré, B. S.** Sur la Composition en Métabolites Secondaires et L'activité Anti-Oxydante D'extraits Bruts de *Gmelina Arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest : Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *European Journal of Scientific Research*, 2009, vol. 36, n° 2, pp. 161-171. <http://www.csr.ch/Pasres/documents/publication/Ngaman-chrsitelle.pdf>
- 170. N'Guessan, A. H. O., Dago Déliko, C. E., Mamyrbékova-Békro, J. A., Békro, Y.-A.** Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Revue de génie industriel*, 2011, vol. 6, pp. 55-61.

- 171. Nijveldt, R. J., van Nood, E. van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., van Leeuwen, P. A.** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, vol. 74, n° 4, pp. 418-425.
- 172. Noble, W. C., Virani, Z., Cree, R. G.** Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, vol. 72, n° 2, pp. 195-198.
- 173. Normak, H. B., Normak, S.** Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 2002, vol. 252, n° 2, pp. 91-106.
- 174. Nsimba, R. Y., Kikuzaki, H., Konishi, Y.** Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. Seeds. *Food Chemistry*, 2008, vol. 106, n° 2, pp. 760-766.
- 175. Okigbo, R. N., Mbajiuka, C. S., Njoku, C. O.** Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopiya aethopica* and *Occimum gratissimum* L. on some pathogens of man. *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences*, 2005, vol. 1, n° 4, pp. 392-397.
- 176. Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P.** Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, vol. 112, n° 3, pp. 476-481.
- 177. Ortuño, A., Báidez, A., Gómez, P., Arcas, M. C., Porras, I., García-Lidón, A., Del Río, J. A.** *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 2006, vol. 98, n° 2, pp. 351-358.
- 178. Oyaizu, M.** Studies on products of the browning reaction: antioxidative activities of products of browning prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986, vol. 44, pp. 307-316.
- 179. Ozenda, P.** Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} ed. Paris: CNRS, 1991.
- 180. Peng, J., Jones, G. L., Watson, K.** Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, vol. 28, n° 11, pp. 1598-1606.
- 181. Pfaller, M. A., Messer, S. A., Karlsson, Å., Bolmström, A.** Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol. 36, n° 9, pp. 2586-2589.
- 182. Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 1999, vol. 269, n° 2, pp. 337-341.
- 183. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, n° 10, pp. 4290-4302.
- 184. Puppo, A.** Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by fenton-type reactions; influence of the iron chelator. *Phytochemistry*, 1992, vol. 31, n° 1, pp. 85-88.
- 185. Quetin-Leclercq, J.** Le voyage insolite de la plante au médicament. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 2002, vol. 57, HS 2, pp. 11-20.
- 186. Quézel, P., Santa, S.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 1. Paris : CNRS, 1962, p. 270.

- 187. Quézel, P., Santa, S.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2. Paris : CNRS, 1963, p. 949.
- 188. Rakotomalala, R.** Analyse de corrélation : Étude des dépendances - Variables quantitatives. Université Lumière Lyon 2, 2012.
- 189. Rao, K. N. V., Sunitha, Ch., Banjii, D., Sandhya, S., Saikumar, P.** Pharmacognostic Studies on *Rumex vesicarius*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2011, vol. 1, n° 1, pp. 102-115.
- 190. Rathee, D., Rathee, P., Rathee, S., Rathee, D.** Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Picrorrhiza kurroa*, an Indian traditional plant used to treat chronic diarrhea. *Arabian Journal of Chemistry*, 2012, sous press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.02.009>
- 191. Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P.** Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, vol. 56, n° 1, pp. 3-12.
- 192. Rémésy C.** Que mangerons-nous demain ? Paris : Odile Jacob, 2005.
- 193. Ribéreau-Gayon, P.** Les composés phénoliques des végétaux. Paris : Dunod, 1968.
- 194. Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P.** Analyse et contrôle des vins. Tome 1. In : Sciences et techniques du vin : traité d'œnologie. Paris : Dunod, 1972.
- 195. Robbins, R. J.** Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, n° 10, pp. 2866-2887.
- 196. Roberts, M. F., Wink, M.** Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. New York: Plenum Press, 1998.
- 197. Rognon, P.** Biographie d'un désert : le Sahara. Paris: L'Harmattan, 1994.
- 198. Rosales, R. B.** Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. Thèse de doctorat. Royaume-Uni: The University of Reading, 1999.
- 199. Rüegg, T., Calderón, A. I., Queiroz, E. F., Solís, P. N., Marston, A., Rivas, F., Ortega-Barría, E., Hostettmann, K., Gupta, M. P.** 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid is a new anti *Helicobacter pylori* compound from *Piper multiplinervium*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, vol. 103, n° 3, pp.461-467.
- 200. Russell, A. D.** Principles of antimicrobial activity and resistance. Chapter 3. In: **Block, S. S.** Disinfection, sterilization and preservation. USA: Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp. 31-56.
- 201. Rustaiyan, A., Dabiri, M., Jakupovic, J.** Germacranolides from *Anvillea garcini*. *Phytochemistry*, 1986, vol. 25, n° 5, pp. 1229-1230.
- 202. Rybak, M. J.** Resistance to antimicrobial agents: an update. *Pharmacotherapy*, 2004, vol. 24, n° 12, pp. 203S-215S.
- 203. Saleh, N. A. M., El-Hadidi, M. N., Raafat, A.** Flavonoids and anthraquinones of some Egyptian *Rumex* species (Polygonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 1993, vol. 21, n° 2, pp. 301-303.

- 204. Sanchez-Moreno, C.** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Foods Science and Technology*, 2002, vol. 8, n° 3, pp. 121-137.
- 205. Sannomiya, M., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C., Brito, A. R., Vilegas, W.** Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, vol. 19, n° 16, pp. 2244-2250.
- 206. Santos-Buelga, C., Scalbert, A.** Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, vol. 80, n° 7, pp. 1094-1117.
- 207. Sattar, E. A., Galal, A. M., Mossa, G. S.** Antitumor germacranolides from *Anvillea garcinii*. *Journal of Natural Products*, 1996, vol. 59, n° 4, pp. 403-405.
- 208. Sattar, E. A., Mc Phail, A. T.** cis-parthenolid-9-one from *Anvillea garcinii*. *Journal of Natural Products*, 2000, vol. 63, n° 11, pp. 1587-1589.
- 209. Schempp, C. M., Pelz, K., Wittmer, A., Schöpf, E., Simon, J. C.** Antibacterial activity from St John's wort against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *The Lancet*, 1999, vol. 353, n° 9170, p. 2129.
- 210. Schmidt, F. R.** The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, vol. 63, n° 4, pp. 335-343.
- 211. Scimeca, D., Tétau, M.** Votre santé par les plantes : Le guide familial pour prévenir et guérir tous les maux quotidiens. Monaco : Alpen, 2005.
- 212. Scimeca, D.** Les plantes du bonheur : Retrouvez naturellement bien être et plaisir de vivre. Monaco : Alpen, 2006.
- 213. Seigler, D. S., Seilheimer, S., Keesy, J., Huang, H. F.** Tannins from four common *Acacia* species of Texas and Northeastern Mexico. *Economic botany*, 1986, vol. 40, n° 2, pp. 220-232.
- 214. Sekkoum, K., Belboukhari, N., Cheriti, A.** New flavonoids from bioactive extract of Algerian medicinal plant *Launea arborescens*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2014, vol. 4, pp. 267-271.
- 215. Shapiro, M. J., Gounarides, J. S.** NMR methods utilized in combinatorial chemistry research. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1999, vo. 35, n° 2, pp. 153-200.
- 216. Simonsen, G. S., Tapsall, J. W., Allegranzi, B., Talbot, E. A., Lazzari, S.** The antimicrobial resistance containment and surveillance approach - a public health tool. *Bulletin of World Health Organization*, 2004, vol. 82, n° 12, pp. 928-934.
- 217. Singh, P. P.** The oxalic acid content of Indian foods. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 1973 ; vol. 22, n° (3-4), pp. 335-347.
- 218. Small, E., Catling, P. M.** Les cultures médicinales canadiennes. Canada: Ottawa (Ontario), NRC Research Press, 2000.
- 219. Small, E., Deutsch, G.** Herbes culinaires pour nos jardins de pays froid. Canada: Ottawa (Ontario), NRC Research Press, 2001.

- 220. Sofowora, A.** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Académie suisse des sciences naturelles : Karthala, 2010.
- 221. Sohal, R. S., Mockett, R. J., Orr, W. C.** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002, vol. 33, n° 5, pp. 575-586.
- 222. Sroka, Z.** Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2005, vol. 60, n° (11-12), pp. 833-843.
- 223. Stalikas, C.D.** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 2007, vol. 30, n° 18, pp. 3268-3295.
- 224. Stecher, G., Huck, C. W., Popp, M., Bonn, G. K.** Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2001, vol. 371, n° 1, pp. 73-80.
- 225. Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Lauren, A., Zenewicz, L., Lewis, K.** Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2000, vol. 97, n° 4, pp. 1433-1437.
- 226. Stöckigt, J., Sheludk, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., Stöckigt, D.** High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 967, n° 1, pp. 85-113.
- 227. Sun, B. S., Ricardo-Da-Silva, J. M., Spranger, M. I.** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, vol. 46, n° 10, pp. 4267-4274.
- 228. Suresh-Kumar, K., Ganesan, K., Subba Rao, P. V.** Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - An edible seaweed. *Food Chemistry*, 2008, vol. 107, n° 1, pp. 289-295.
- 229. Tabart, J., Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Dommès, J.** Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and stability during storage. *Journal of Food Chemistry*, 2007, vol. 105, n° 3, pp. 1268-1275.
- 230. Tahiri, A., Amissa Adima, A., Adjé, F. A., Amusant, N.** Effet pesticide et screening des extraits de *Azadirachta indica* (A.) Juss. sur le termite *Macrotermes bellicosus* Rambur. *Bois et forêts des tropiques*, 2011, vol. 310, n° 4, pp. 79-88.
- 231. Tan, Y.-T., Tillet, D. J., McKay, I. A.** Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Molecular Medicine Today*, 2000, vol. 6, n° 8, pp. 309-314.
- 232. Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 2007, vol. 104, n° 4, pp. 1372-1378.
- 233. Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., Lewis, K.** Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, vol. 46, n° 10, pp. 3133-3141.
- 234. Tekwu, E. M., Pieme, A. C., Beng, V. P.** Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, vol. 142, n° 1, pp. 265-273.

- 235. Teplitzki, M., Robinson, J. B., Bauer, W. D.** Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, vol. 13, n° 6, pp. 637-648.
- 236. Tétau, M.** *Articulations : Votre ordonnance naturelle.* Monaco : Alpen, 2005.
- 237. The alpha tocopherol, betacarotene cancer prevention study group.** The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The New England Journal of Medicine*, 1994, vol. 330, n° 15, pp. 1029-1035.
- 238. Tian, F., Li, B., Zhang, G., Luo, Y.** Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT - Food Science and Technology*, 2009, vol. 42, n° 7, pp. 1289-1295.
- 239. Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E. E., Froehlich, J. E., Croteau, R.** Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology*, 1999, vol. 120, n° 3, pp. 879-886.
- 240. Tyson, R. L., Chang, C.-J., McLaughlin, J. L., Aynehchi, Y., Cassady, J. M.** 9- α -hydroxyparthenolide, a novel antitumor sesquiterpene lactone from *Anvillea garcini* (Burm.) DC. *Experientia*, 1981, vol. 37, n° 5, pp. 441-442.
- 241. Ulubelen, A., Mabry, T. J., Aynehchi, Y.** Flavonoids of *Anvillea garcini*. *Journal of Natural Products*, 1979, vol. 42, n° 6, pp. 624-626.
- 242. UNESCO.** Recherches sur la zone aride : Les plantes médicinales des régions arides. Paris 7^e : ONU, vol. 13, 1960. Disponible sur : <http://unesdoc.unesco.org/images/0006/000681/068198fo.pdf>
- 243. Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Haenen, G. R., van der Vijgh, W. J., Bast, A.** Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, vol. 214, n° 3, pp. 755-759.
- 244. Van Acker, S. A., van den Berg, D. J., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., van Bennekom, W. P., van der Vijgh, W. J., Bast, A.** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, vol. 20, n° 3, pp. 331-342.
- 245. Vaubourdolle, M.** *Infectiologie.* 3^{ème} édition. Paris : Wolters Kluwer, 2007.
- 246. Vercauteren, J.** Plan, formules et illustrations du cours de Pharmacognosie. 2^{ème} cycle des études de Pharmacie. Montpellier I, 2011.
- 247. Verpoorte, R., Choi, Y. H., Kim, H. K.** NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews*, 2007, vol. 6, n° 1, pp. 3-14.
- 248. Visioli, F., Hagen, T. M.** Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: Focus on micronutrients. *Pharmacological research*, 2007, vol. 55, n° 3, pp. 199-206.
- 249. Vivas de Gaulejac, N.** *Vin et santé. Les bases scientifiques du French Paradox.* Bordeaux : Féret, 2001.
- 250. Vivas de Gaulejac, N.** *Manuel de Tonnellerie.* Bordeaux : Féret, 2002.
- 251. Von Gunten, V.** Optimisation de l'utilisation des antibiotiques en milieu hospitalier : impact des services pharmaceutiques dans une approche interdisciplinaire. Thèse de Doctorat. Université de Genève, 2004.

- 252. Vuorela, S.** Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Dissertation: University of Helsinki, 2005.
- 253. Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, Z.** Plant drug analysis: A thin-layer chromatography atlas. 2nd ed., New York: Springer Verlag, 1996.
- 254. Warner, J. R., Nath, J., Ong, T. M.** Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the Salmonella arabinose-resistant assay system. *Mutation Research*, 1991, vol. 262, n° 1, pp. 25-30.
- 255. Wei, L., Gao, Y., Zhao, J., Wang, Q.** Phenolic, flavonoid, and lutein ester content and antioxidant activity of 11 cultivars of chinese marigold. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, vol. 55, n° 21, pp. 8478–8484.
- 256. Wichtl, M., Anton, R.** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 3^{ème} ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 1999.
- 257. Winkel-Shirley, B.** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, vol. 5, n° 3, pp. 218-223.
- 258. Wong, C.-C., Li, H.-B., Cheng, K.-W., Chen, F.** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 2006, vol. 97, n° 4, pp. 705-711.
- 259. Yagupsky, P.** Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2006, vol. 25, n° 10, pp. 974-976.
- 260. Yang, J., Guo, J., Yuan, J.** In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*, 2008, vol. 41, n° 6, pp. 1060-1066.
- 261. Yanishlieva, N. VI., Marinova, E. M.** Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry*, 1995, vol. 54, n° 4, pp. 337-382.
- 262. Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A.** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, n° 8, pp. 4083-4089.
- 263. Zenk, M. H., Juenger, M.** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 2007, vol. 68, n° (22-24), pp. 2757-2772.
- 264. Zhao, G.-R., Xiang, Z.-J., Ye, T.-X., Yuan, Y.-J., Guo, Z.-X.** Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chemistry*, 2006a, vol. 99, n° 4, pp. 767-774.
- 265. Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu, G.** Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006b, vol. 54, n° 19, pp. 7277-7286.

ANNEXES

Annexe 1 : Réactions générales de caractérisation (screening phytochimique)

1.1. Caractérisation des alcaloïdes

1 g du matériel végétal est mélangé avec 5 ml d'une solution de H₂SO₄ à 10%. Le mélange obtenu est mis sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Ce mélange est ensuite filtré et le volume complété avec de l'eau distillée à 5 ml.

1 ml du filtrat obtenu est placé dans deux tubes différents, puis 5 gouttes du réactif de Dragendorff sont ajoutées dans l'un des tubes et 5 gouttes de réactif de Mayer dans l'autre. L'apparition d'un précipité rouge orangé et blanc jaunâtre, respectivement, dans les tubes témoigne la présence des alcaloïdes.

- **Composition du réactif de Dragendorff :**

Iodure de potassium (KI, 60 g), nitrate de bismuth (BiNO₃, 0.85 g), acide acétique glacial (CH₃COOH, 15 ml), chlorure de mercure (Hg₂Cl₂, 13.55 g), ammoniac (NH₄OH, 20 ml) et dichlorométhane (CH₂Cl₂, 100 ml).

- **Composition du réactif de Mayer :**

Iodure de potassium (KI, 25 g), chlorure de mercure (Hg₂Cl₂, 6.8 g) et eau distillée (1 L).

1.2. Caractérisation des substances polyphénoliques

La solution à analyser est une infusion aqueuse à 5%. Nous avons introduit 5 g de poudre séchée dans 100 ml d'eau distillée bouillante. Nous avons laissé infusé pendant 30 minutes puis nous avons filtré la solution et rincé avec de l'eau chaude de manière à obtenir 100 ml de filtrat.

1.2.1. Caractérisation des flavonoïdes

Réaction à la cyanidine : Nous avons procédé à un mélange, à volume égal, de 5 ml d'infusé et d'alcool chlorhydrique (éthanol à 95°, eau distillée, acide chlorhydrique concentré (v/v/v)) dans un tube à essai. Nous avons ajouté au mélange 1 ml d'alcool isoamylique et quelques copeaux de magnésium. La présence de coloration rose-orangée (flavones), rose-violacée (flavonones) ou rouge cerise (flavonols) dans la couche surnageante du mélange indique la présence d'un flavonoïde libre (génine).

Nous avons ensuite effectué la réaction à la cyanidine sans ajouter les copeaux de magnésium puis nous avons chauffé le mélange au bain-marie pendant 15 minutes. Le développement d'une

coloration rouge cerise ou violacée et d'une teinte brune rouge indique respectivement la présence de leucoanthocyane et de catéchols.

1.2.2. Caractérisation des tanins

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 ml d'infusé à 5 % puis 200 µl de solution aqueuse de FeCl₃ à 1%. La présence des tanins galliques ou catéchiques se traduit par le développement d'une coloration verdâtre ou bleue noirâtre, respectivement.

1.2.3. Caractérisation des coumarines

A 0.5 g de poudre végétale, nous avons ajouté 20 ml d'éther diéthylique et nous avons laissé macéré le tout pendant 24 heures. Nous avons procédé ensuite à une filtration puis évaporation à sec au bain-marie de l'extrait. Le résidu ainsi obtenu a été repris par 2 ml d'eau chaude puis divisé entre deux tubes à essai, le premier sert de témoin. Dans le 2^{ème} tube, il a été introduit 0.5 ml de NH₄OH à 25 %. L'observation d'une fluorescence intense sous UV 366 nm dans le 2^{ème} tube indique la présence de coumarines.

1.2.4. Caractérisation des dérivés anthracéniques

1.2.4.1. Préparation de l'extrait chloroformique

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 g de poudre végétale et 10 ml de CHCl₃. Nous avons procédé à un chauffage au bain marie pendant 15 min, puis nous avons filtré et complété le volume à 10 ml avec du chloroforme.

1.2.4.2. Préparation de l'hydrolysat

Le résidu épuisé par le chloroforme est additionné de 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'HCl concentré. Après un chauffage au bain-marie bouillant pendant 15 min, nous avons refroidi la solution sous un courant d'eau et filtré. Le filtrat a été ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée.

A l'extrait chloroformique, nous avons ajouté une solution aqueuse de KOH à 10%. Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge. Si le test est positif, nous procédons à la recherche des composés suivants :

- **Les anthraquinones libres**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml de l'extrait chloroformique et 1 ml de NH₄OH dilué au demi. La coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

- **Les anthracéniques combinés**

- **Les O-hétérosides** : Prélever 5 ml d'hydrolysât et agiter avec 5 ml de CHCl_3 . Après décantation de la solution, soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai. Ajouter 1 ml de NH_4OH dilué. La présence des anthraquinones est révélée par une coloration rouge plus ou moins intense.

- **Les O-hétérosides à génine réduite** : Si la réaction précédente est négative ou faiblement positive, rechercher les O-hétérosides à génine réduite. Dans un tube à essai, introduire 5 ml d'hydrolysât et 3 à 4 gouttes d'une solution de FeCl_3 à 10%. Le tout est porté au bain-marie à 90°C pendant 5 min puis refroidit sous courant d'eau. Agiter la solution avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase chloroformique et l'introduire dans un tube à essai. Ajouter 1 ml de NH_4OH dilué au demi puis agiter. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou anthrones, la coloration rouge est plus intense que précédemment.

- **Les C-hétérosides** :

Reprenre la phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hétérosides par 10 ml d'eau distillée et ajouter 1 ml d'une solution de FeCl_3 à 10%. Maintenir le tube à essai dans un bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement sous courant d'eau, agiter la solution avec 5 ml de chloroforme. Soutirer la phase chloroformique et l'agiter avec 1 ml de NH_4OH dilué. L'existence des C-hétérosides est confirmée par la coloration rouge plus ou moins intense.

1.2.5. Caractérisation des stérols et des triterpènes

Solution à analyser : 0.5 g de poudre végétale est mise en agitation avec 10 ml d'éther éthylique pendant 24 heures. Le mélange est ensuite filtré et ajusté à 10 ml.

La mise en évidence des substances stéroliques est effectuée par la réaction de Liebermann Büchard. 1 ml de la solution étherique est évaporé à sec. Le résidu obtenu est repris par un mélange de 0.1 ml d'anhydride acétique et 0.1 ml de chloroforme. Cette solution est partagée entre deux tubes à essai ; le premier servira de référence alors que dans le 2^{ème} tube nous avons introduit (dans le fond du tube) 0.1 ml de H_2SO_4 concentré. La formation d'un anneau rouge-brunâtre ou violet dans la zone de contact des deux phases et d'une coloration verte ou violette de la couche surnageante indique la présence des stérols et des triterpènes.

1.2.6. Caractérisation des saponosides

Le principe consiste à déterminer l'indice de mousse persistante pendant 20 min d'une décoction aqueuse à 5%.

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire successivement 1, 2, 3, ..., 10 ml de décocté. Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Chaque tube est agité

horizontalement pendant 15 secondes puis laissé reposer pendant 15 min. On relève ensuite la hauteur de la mousse persistante en cm. Si celle-ci est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est moins de 100. La dilution dans le tube où la hauteur de la mousse est égale à 1 cm représente l'indice recherché.

Si elle est proche de 1 cm dans le X^{ème} tube, on calcule l'indice de mousse par la formule suivante :

$$I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le X}^{\text{ème}} \text{ tube} \times 5 / 0,0x$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100.

1.2.7. Caractérisation des composés réducteurs

Nous avons procédé à une évaporation à sec de 5 ml du décocté aqueux à 10% au bain-marie bouillant. L'obtention d'un précipité rouge-brique après addition au résidu de 1 ml de réactif de Fehling indique la présence des composés réducteurs.

Annexe 2 : Chromatographie sur couche mince (CCM)

2.1. Les systèmes de solvants utilisés pour les différentes fractions

- Les chromatogrammes de la fraction hexanique ont été obtenus avec un gradient n-hexane/AcOEt, (8/1.9 (v/v)) ;
- Le développant choisi pour faire migrer les composés contenus dans les fractions chloroformiques est un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (10/8, v/v) ;
- Les chromatogrammes des fractions acétate d'éthyle ont été obtenus avec un gradient AcOEt/chloroforme/acétone dans les proportions 8/7/0.5 ; (v/v/v) ;
- Les chromatogrammes des fractions butanoliques ont été obtenus avec le gradient : toluène/acétone/acide formique, (3/5/1 (v/v/v)).

2.2. Réactifs utilisés pour la révélation des composés recherchés

- **Réactif de Liebermann-Bürchard** (Réactif spécifique aux stérols, stéroïdes et triterpènes) : Préparer, à basse température et juste avant emploi, une solution de 5 ml d'anhydride acétique, 5 ml d'acide sulfurique concentré et q.s.p. 50 ml d'éthanol à 95%. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 10 minutes.
- **Réactif à la vanilline sulfurique** (Révélateur polyvalent) : Préparer une solution composée de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique et de l'éthanol à 95% q.s.p. 100 ml. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 minutes environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.
- **Réactif de Dragendorff** (Révélateur spécifique aux alcaloïdes) : Préparer une solution composée de 0,85 g de nitrate basique de bismuth et 10 g d'acide tartrique dans 40 ml d'eau (*solution A*) et une solution contenant 16 g de KI dans 40 ml d'eau (*solution B*). Mélanger extemporanément 5 ml de A, 5 ml de B, 100 ml d'eau et 20 g d'acide tartrique. Vaporiser le mélange sur la plaque. Les alcaloïdes apparaissent sous forme de tâches orange.
- Une solution méthanolique de KOH à 5%, une solution aqueuse d'acétate de plomb basique à 5% et l'ammoniac pour la révélation des coumarines ;
- Une solution méthanolique de chlorure d'aluminium pour la révélation des flavonoïdes ;
- Une solution aqueuse de FeCl₃ à 2% pour la révélation des tanins.

Annexe 3 : Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Tableau 1. Temps de rétention des standards utilisés dans l'analyse par CLHP

Standards	Temps de rétention (min)
Acide gallique	3,67
Acide tannique	3,69
Acide protocatéchique	4,16
Catéchine hydrate	4,24
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque	4,33
Acide gentisique	5,48
Acide caféique	5,56
Acide vanillique	6,02
Résorcinol	6,12
Epicatéchine	6,38
Acide chlorogénique	6,52
Gallate de méthyle	6,68
Acide 2-hydroxyphényl acétique	6,73
Acide syringique	9,65
Acide phlorétique	9,82
Acide rosmarinique	13,78
Myricétine	14,45
Acide paracoumarique	14,66
Taxifoline	14,8
Rutine hydrate	16,75
Acide férulique	16,87
Naringénine	17,68
Naringénine-7-O-glucoside	17,84
Coumarine	18,22
Acide 3-(4-Méthoxyphényl) propinoïque	18,37
Quercétine	18,46
Morine	18,62
Lutéoline	19,06
Naringénine	19,16
Trans-acide cinnamique	19,8
Hespéretine	19,81
Genisteine	19,91
Warfarine	22,39
Flavone	22,64
5,7 dihydroxyflavone (chrysin)	23,19
Flavonol	23,68
Flavonose	23,78
Chalcone	24,39
Acide carnosique	25,29

Valorisation des travaux de la thèse

Les travaux relatés dans ce manuscrit ont fait l'objet de deux publications scientifiques dans des journaux internationaux à comité de lecture. Ces travaux ont également été valorisés scientifiquement par des communications affichées.

➤ Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture

1. *Journal of Food Science and Technology*, 2014. doi: 10.1007/s13197-014-1420-9

Potential assessment of *Rumex vesicarius* L. as a source of natural antioxidants and bioactive compounds.

F. BEDDOU, C. BEKHECHI, R. KSOURI, D. CHABANE SARI, F. ATIK BEKKARA

2. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bioscience*, 2014, vol. 3, n° 1, pp. 172-187.

Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds from *Anvillea radiata* Coss. & Dur.

F. BEDDOU, C. BEKHECHI, D. CHABANE SARI, F. ATIK BEKKARA

➤ Communications par affiche

1. 1^{er} congrès international de biotechnologie d'Annaba : Challenges and perspectives (Annaba (Algérie), les 19 - 20 Novembre 2011).

Screening phytochimique et activité antimicrobienne d'une endémique saharienne: *Anvillea radiata* Coss. and Dur.

2. 7^{ème} Journées Scientifiques de Microbiologie (Hammamet (Tunisie), les 25 - 27 Novembre 2011).

Criblage phytochimique et activité antimicrobienne des différentes parties d'*Anvillea radiata* Coss. and Dur.

3. Journées internationales de Biotechnologie 2011 (Sousse (Tunisie), les 19 - 22 Décembre 2011).

Sur la composition en métabolites secondaires d'une endémique saharienne: *Anvillea radiata* Coss. and Dur. et recherche de son activité antimicrobienne.

4. 1^{ère} Journée Scientifique des Sciences de l'agriculture, Environnement et Santé (Tlemcen (Algérie), le 3 juin 2014).

Studies on the antioxidant activity of *Rumex vesicarius*: a preliminary assessment of crude extracts from aerial parts"

5. Journées internationales de Biotechnologie 2014 (Hammamet (Tunisie), les 20 - 24 Décembre 2014).

The potential of *Anvillea radiata* flowers as natural source of antioxidant phenolic compounds.

➤ Autres contributions

1. *Natural Product Research*, 2013, vol.27, n°23, pp. 2231-2234. doi: 10.1080/14786419.2013.811409

Antimicrobial activity and evolution of the composition of essential oil from Algerian *Anacyclus pyrethrum* L. through the vegetative cycle.

C. SELLES, MA. DIB, N. DJABOU, **F. BEDDOU**, A. MUSELLI, B. TABTI, J. COSTA, B. HAMMOUTI.

2. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2014, vol. 4, n° 2, pp. 012-016.

Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria.

M. SELADJI, C. BEKHECHI, **F. BEDDOU**, H. DIB, N. BENDIMERAD.

Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation des deux plantes médicinales sahariennes (*Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) et *Rumex vesicarius* L. (Polygonaceae)) en les caractérisant par un screening phytochimique, une évaluation des activités antimicrobienne et antioxydante et une identification de certains composés phénoliques par chromatographie.

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des différentes parties traitées a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques. Ceci a été confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des flavonols et des tanins condensés. Nous avons démontré que le méthanol aqueux est le meilleur extracteur des flavonoïdes, tandis que l'acétone possède la capacité d'extraire plus de tanins. Considérant les organes, les fleurs d'*A. radiata* accusent les teneurs les plus élevées en ces composés. Ainsi, afin d'obtenir un extrait enrichi en métabolites d'intérêt – les flavonoïdes, nous avons opté pour une extraction liquide-liquide en utilisant différents solvants de polarité croissante. La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'aluminium révèle que les fractions butanolique et acétate d'éthyle sont les plus riches avec des teneurs respectives de (55.910 ± 1.022 mg EC/g MS) et (47.394 ± 1.497 mg EC/g MS) pour les fleurs d'*A. radiata* et de (5.597 ± 0.038 mg EC/g MS) et (4.648 ± 0.068 mg EC/g MS) pour la partie aérienne de *R. vesicarius*. Par ailleurs, la détermination de la teneur en pigments liposolubles révèle la richesse de *Rumex vesicarius* en β -carotène (116.893 ± 1.602 μ g/g MS), en lycopène (156.403 ± 1.592 μ g/g MS) et en chlorophylle a (271.447 ± 3.457 μ g/g MS). Par contre, en comparant les différents organes d'*A. radiata*, nous remarquons que les fleurs contiennent une teneur élevée en β -carotène (38.831 ± 0.927 μ g/g MS) et en lycopène (48.911 ± 0.567 μ g/g MS), tandis que les feuilles sont riches en chlorophylle a (131.844 ± 1.267 μ g/g MS). Ces composés mineurs confèrent aux deux plantes des qualités nutritionnelles et thérapeutiques importantes.

L'évaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante des différents extraits et fractions a été réalisée par six méthodes, à savoir : la réduction du phosphomolybdate (ou capacité antioxydante totale (CAT)), le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), le piégeage du radical-cation ABTS^{•+} (l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), le blanchiment du β -carotène et le pouvoir chélateur des ions ferreux. Ainsi, ils présentent des activités antiradicalaires et antioxydantes intéressantes, dépendantes du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes. La meilleure activité, par rapport à l'antioxydant de synthèse (α -tocophérol), est obtenue avec les fractions acétate d'éthyle des deux espèces et cela en réduisant les ions du fer ferrique en fer ferreux avec des valeurs de CE₅₀ égales à 0.161 ± 0.005 mg/ml pour les fleurs d'*A. radiata* et 0.233 ± 0.001 mg/ml pour la partie aérienne de *R. vesicarius*. Une relation linéaire a été établie ; les fractions les plus riches en flavonoïdes étant les plus actives. Inversement, une très forte inhibition de l'oxydation lipidique a été obtenue par la fraction hexanique des fleurs d'*A. radiata* (Cl₅₀ < 0.094 mg/ml), pourtant très peu concentrée en polyphénols. Ceci est du au problème à la présence d'autres substances qui peuvent agir indépendamment ou en synergie.

Les différents extraits et fractions ont été également soumis à un criblage pour leur possible activité antimicrobienne. Les fractions chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique des feuilles d'*A. radiata* ont révélé une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*, avec des CMI situées entre 0.156 - 0.625 mg/ml. Par contre, les extraits obtenus à partir de la partie aérienne de *Rumex vesicarius* se sont révélés inactifs vis-à-vis de toutes les souches microbiennes testées. De même, une tendance a été montrée indiquant que les extraits les plus riches en flavonoïdes présentent des activités antibactériennes les plus élevées.

L'identification chromatographique menée sur les deux espèces a permis de caractériser les principaux composés phénoliques. Quatre grandes familles de composés ont été mises en évidence : il s'agit de deux acides phénols (l'acide procatechique (3.21%) et l'acide caféique (3.83%)), deux flavonoïdes (la naringénine-7-O-glucoside (1.46%) et la morine (27.09%)) et une coumarine (1.64%) dans la FAE des fleurs d'*A. radiata* et de l'acide tannique (0.65%), le résorcinol (2.93%), cinq acides phénols (l'acide gentisique (6.54%), l'acide vanillique (1.40%), l'acide chlorogénique (9.13%), l'acide syringique (2.02%) et l'acide 3-(4-méthoxyphényl) propanoïque (2.20%)), une coumarine (1.06%) et trois composés flavoniques (la naringénine (1.05%), la naringénine-7-O-glucoside (2.91%) et la lutéoline (0.27%)) dans la FAE de la partie aérienne de *R. vesicarius*. Ces principes actifs majeurs possèdent diverses activités biologiques et jouent un rôle reconnu dans le maintien d'un bon état de santé.

Mots clés : *Anvillea radiata*, *Rumex vesicarius*, Composés phénoliques, Activité antioxydante, Pouvoir antimicrobien, CCM, CLHP.

Abstract

The work presented in this thesis contributes in the valorization of both Saharan medicinal plants: *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) and *Rumex vesicarius* L. (Polygonaceae) by characterizing them with phytochemical screening, evaluating their antimicrobial and antioxidant activities and identifying some of their phenolic compounds by chromatography.

The preliminary evaluation of the phytochemical composition of the different treated parts highlighted the presence of some chemical groups. This was confirmed by a quantitative analysis based on the measurement of total phenolics, flavonoids, flavonols and condensed tannins content. We have shown that aqueous methanol is the best extractor of flavonoids, while acetone has the ability to extract more of tannins. Considering organs, flowers of *A. radiata* have the highest levels of these compounds. Thus, in order to obtain an extract enriched with metabolites of interest - flavonoids, we opted for a liquid-liquid extraction using different solvents with increasing polarity. The quantitative determination of total flavonoids by the aluminum trichloride method revealed that butanol and ethyl acetate fractions were the richest with respective holders of (55.910 ± 1.022 mg CE/g DW) and (47.394 ± 1.497 mg CE/g DW) for *A. radiata* flowers and (5.597 ± 0.038 mg CE/g DW) and (4.648 ± 0.068 mg CE/g DW) for the aerial part of *R. vesicarius*. Furthermore, the determination of the liposoluble pigments content revealed the richness of *Rumex vesicarius* in β -carotene (116.893 ± 1.602 μ g/g DW), in lycopene (156.403 ± 1.592 μ g/g DW) and in chlorophyll a (271.447 ± 3.457 μ g/g DW). However, by comparing the various organs of *A. radiata*, we noticed that the flowers have a high content of β -carotene (38.831 ± 0.927 μ g/g DW) and lycopene (48.911 ± 0.567 μ g/g DW), while the leaves are rich on chlorophyll a (131.844 ± 1.267 μ g/g DW). These minor compounds give to these plants important nutritional and therapeutic qualities.

The *in vitro* evaluation of the different extracts and fractions antioxidant activity was performed by six methods, namely: total antioxidant capacity by phosphomolybdenum assay, iron reducing power, DPPH radical-scavenging activity, ABTS radical-scavenging activity, β -carotene bleaching test and chelating effect on ferrous ions. Thus, they have interesting radical scavenging and antioxidant activities, dependent on the content of total phenolics and flavonoids. The greatest activity relative to the synthetic antioxidant (α -tocopherol) is obtained with ethyl acetate fractions by reducing power through the transformation of ferrous to ferric ions with EC₅₀ values of 0.161 ± 0.005 mg/ml for *A. radiata* flowers and 0.233 ± 0.001 mg/ml for the aerial part of *R. vesicarius*. A linear relationship has been established; the richest fractions in flavonoids being the most active. Conversely, a very high inhibition of lipid oxidation was obtained in the hexane fraction of *A. radiata* flowers (IC₅₀ < 0.094 mg/ml), yet very low concentrated on polyphenols. This is probably due to the presence of other substances which may act independently or synergistically.

The various extracts and fractions were also subjected to a screening for their potential antimicrobial activity. The chloroform, the ethyl acetate and the butanol fractions of *A. radiata* sheets showed a high antibacterial activity towards *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, with a MIC between 0.156 and 0.625 mg/ml. However, the extracts obtained from the aerial part of *Rumex vesicarius* were inactive towards all tested microbial strains. Similarly, a tendency was shown indicating that the richest extracts on flavonoids exhibit the higher antibacterial activities.

The chromatographic identification conducted on the two species allowed us to characterize the main phenolic compounds. Four major families of compounds have been identified: two phenolic acids (procatechic acid (3.21%) and caffeic acid (3.83%)), two flavonoids (naringenin-7-O-glucoside (1.46%) and morin (27.09%)) and coumarin (1.64%) in the EAF of *A. radiata* flowers and tannic acid (0.65%), resorcinol (2.93%), five phenolic acids (gentisic acid (6.54%), vanillic acid (1.40%), chlorogenic acid (9.13%), syringic acid (2.02%) and 3-(4-methoxyphenyl) propanoic acid (2.20%)), coumarin (1.06%) and three flavonoid compounds (naringenin (1.05%), naringenin-7-O-glucoside (2.91%) and luteolin (0.27%)) in the EAF of the aerial part of *R. vesicarius*. These major active ingredients possess various biological activities and play an important and acknowledged role in maintaining good health.

Keywords: *Anvillea radiata*, *Rumex vesicarius*, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial power, TLC, HPLC.

ملخص

يهدف العمل المقدم في هذه الأطروحة إلى الإسهام في إعطاء الأهمية لاثنتين من النباتات الطبية الصحراوية: *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) و *Rumex vesicarius* L. (Polygonaceae) وهذا من خلال الفصل الفيتو كيميائي، تقييم الأنشطة المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة وكذا تحديد بعض المركبات الفينولية بواسطة التحليل الكروماتوغرافي.

ساعد التقييم الأولي للتركيب الفيتوكيميائي لمختلف الأجزاء المعالجة على استنباط وجود بعض المجموعات الكيميائية. وهذا ما أكدته التحليل الكمي للفينولات الإجمالية، الفلافونويدات، الفلافونولات والتانينات. لقد أثبتنا، من خلال هذه الدراسة، أن الميثانول المائي هو أفضل مستخرج للفلافونويدات، في حين الأستيون لديه قدرة استخلاص أكبر لثاناناباغيتان أزهار *A. radiata* تحتوي على أكبر قيمة لهذه المركبات. وبالتالي، من أجل الحصول على مستخلص غني بهذه المركبات، الفلافونويدات، اخترنا طريقة الاستخلاص سائل-سائل وهذا باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة. التحديد الكمي للفلافونويدات الإجمالية باستخدام ثلاثي كلوريد الألومنيوم كشف لنا أن المستخلصات الجزئية للبروتول وأستينات الأينيل هما الأكثر غناء وهذا ب (55.910 ± 1.022 mg/ع) و (47.394 ± 1.497 mg/ع) معادل الكاتشين من المادة الجافة) و ب (5.597 ± 0.038 mg/ع) معادل الكاتشين من المادة الجافة) و ب (4.648 ± 0.068 mg/ع) معادل الكاتشين من المادة الجافة) وهذا الجزء الهوائي لـ *R. vesicarius*.

بالإضافة إلى ذلك، فإنه قد تم تحديد محتوى الأصبغة الزوابة في الزيت وقد أظهر ذلك ثراء *R. vesicarius* بـ β -كاروتان (116.893 ± 1.602 μ g/ع) وعلى الليكوبان (156.403 ± 1.592 μ g/ع) وعلى الكلوروفيل a (271.447 ± 3.457 μ g/ع). وعلى عكس ذلك، مقارنة بمختلف أعضاء *A. radiata*، لاحظنا إحتواء الأزهر على كميات مرتفعة من β -كاروتان (38.831 ± 0.927 μ g/ع) وعلى الليكوبان (48.911 ± 0.567 μ g/ع). في حين أن الأوراق كانت أكثر ثراء بالكلوروفيل a (131.844 ± 1.267 μ g/ع). هذه المركبات تعطي لكلا النبتتين قيمة غذائية وعلاجية مهمة.

لقد تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة ستة طرق، وهي: تقييم القدرة المضادة للأكسدة الإجمالية، قوة إرجاع الحديد، تثبيط الجذر الحر DPPH•، تثبيط الجذر الحر ABTS^{•+}، تثبيط أكسدة الـ β -كاروتان والقدرة على إحتجاز شوارد الحديد. من خلال هذا، تم ملاحظة قدرة مضادة للأكسدة مثيرة للاهتمام مرتبطة بمحتوى البوليفينولات والفلافونويدات، أفضل نشاط مقارنة بمضادات الأكسدة الاصطناعية، تم تسجيله من خلال مستخلص أستينات الأينيل لكلا النبتتين وهذا بإرجاع شوارد الحديد Fe²⁺ إلى Fe³⁺ بقيمة قدرت ب (0.161 ± 0.005 mg/ململ لأزهار *A. radiata* و ب (0.233 ± 0.001 mg/ململ للجزء الهوائي لـ *R. vesicarius*).

لقد تبين من خلال هذه الدراسة وجود علاقة خطية؛ حيث أن المستخلصات الأكثر إحتواء على الفلافونويدات هي الأكثر فعالية. وعلى العكس من ذلك، لاحظنا تثبيط قوي للأكسدة الدهون لمستخلص الهيكسان لأزهار *A. radiata* (Cl₅₀ < 0.094 mg/ململ) بالرغم من إحتوائه على تركيز ضعيف من البوليفينولات وقد يفسر هذا بوجود مكونات أخرى قادرة على التفاعل بشكل مستقل أو بالتآزر.

مختلف المستخلصات كانت أيضا محل دراسة النشاط المضاد للميكروبات، مستخلصات الكلوروفورم، أستينات الأينيل والبروتول لأوراق *A. radiata* كشفت لنا عن نشاط فعال مضاد للميكروبات وهذا ضد *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* بتركيز مثبط قدر ب (0.156 - 0.625 mg/ململ). على عكس ذلك، فإن مستخلصات الأجزاء الهوائية لـ *Rumex vesicarius* لم تظهر أي نتيجة وذلك ضد كل الميكروبات المختبرة. كذلك، تم إثبات أن المستخلصات الغنية بالفلافونويدات لها الأكثر قوة مضادة للميكروبات.

مكننا التحليل الكروماتوغرافي للنبتتين من تحديد المركبات الأساسية الفينولية. أربع عائلات كبرى تم معرفتها: اثنتين من أحماض الفينول (3.21% و 3.83%)، acid caféique، (3.83%)، acid procatechique (3.21%)، مركبان من الفلافونويدات (1.46% و 27.09%)، la naringénine-7-O-glucoside (1.46%) و la morine (27.09%) و coumarine (1.64%) وهذا في مستخلص أستينات الأينيل الأزهار *A. radiata* و (0.65%)، acid tannique، (2.93%)، réSORCINOL، (2.93%)، و خمس من أحماض الفينول (6.54%)، acid gentisique، (1.40%)، acid vanillique، (1.40%)، acid chlorogénique، (9.13%)، acid syringique، (2.02%)، حمض (2.20%)، 3-(4-méthoxyphényl) propanoïque، مركب كومارين (1.06%) و ثلاث فلافونويدات (1.05%)، naringénine-7-O-glucoside (2.91%) و lutéoline (0.27%)

في مستخلص أستينات الأينيل للجزء الهوائي لـ *R. vesicarius*. هذه المكونات الرئيسية النشطة تمتلك أنشطة بيولوجية مختلفة، وتلعب دورا هاما في الحفاظ على صحة جيدة.

الكلمات المفتاحية : *Anvillea radiata*, *Rumex vesicarius*, المركبات الفينولية، القدرة المضادة للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، CCM, CLHP