



Université Abou-Bakr-Belkaïd Tlemcen

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

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels

THÈSE

Présentée par M^r **CHAOUCHE Tarik Mohammed**

Pour obtenir le grade de **Doctorat En Biologie** Option : **Biochimie**

Thème

Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales

Soutenue le : 27-05-2014

Devant le jury composé de

Présidente	↘ Pr. BOUCHERIT-ATMANI Zahia	Université de Tlemcen
Directrice de thèse	↘ Pr. ATIK-BEKKARA Fawzia	Université de Tlemcen
Co-directeur	↘ Pr. KSOURI Riadh	Université de Tunis
Examineurs	↘ Pr. MAROUF Abderazek	Centre Univ. Naâma
	↘ Pr. YOUSFI Mohamed	Université de Laghouat
	↘ Pr. BENMANSOUR Abdelhafid	Université de Tlemcen

Année universitaire 2013-2014

Avant propos

Notre étude a été menée grâce à la contribution de quatre laboratoires. Laboratoire des Produits Naturels «**LAPRONA**», Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers (SNV-TU), Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, sous la direction de Monsieur le Professeur *Daoudi Chabane Sari*. Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique «**LAPSAB**», Faculté des SNV-STU, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, sous la direction de Madame le Professeur *Zahia Boucherit*. Laboratoire des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria «**CBBC**», de Tunis, sous la direction de Monsieur le Professeur *Chedly Abdelly*. Laboratoire Agronomie & Environnement UMR 1121 «Université de Lorraine-**INRA**», de Nancy, France, sous la direction de Monsieur le Professeur *Frédéric Bourgaud*.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux responsables de ces laboratoires pour m'avoir apporté les moyens humains et matériels me permettant de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.



Les dosages et l'étude de l'activité antioxydante sont réalisés au Laboratoire des Plantes Extrêmophiles (LPE), CBBC à Tunis.

L'activité antimicrobienne est réalisée au laboratoire LAPRONA, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen.

Le test d'hémolyse cellulaire est réalisé au laboratoire Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen.



L'analyse par HPLC Orbitrap-MSⁿ est réalisée au laboratoire d'Agronomie & Environnement (INRA), Université de Lorraine-Nancy, France.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement ma directrice de thèse M^{me} **Atik-Bekkara Fawzia.**, Professeur au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Je suis reconnaissant pour la confiance et le soutien permanent qu'elle m'a témoigné au cours de ce travail ainsi que pour la grande autonomie qu'elle m'a accordé.

Je remercie également M^r **Ksouri Riadh.**, Maître de Conférences au Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (Université de Tunis), qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, qui m'a soutenu dans la réalisation de ce travail et qui a toujours fait preuve d'une grande disponibilité et d'une gentillesse à tout moment. Je l'assure de ma profonde gratitude et de ma sincère reconnaissance pour l'honneur qu'il m'a fait d'être le co-directeur de cette thèse.

J'exprime ma vive reconnaissance à M^{me} **Boucherit-ATMANI Zahia.**, Professeur au département de Biologie, pour m'avoir apporté un appui constant au cours de ce travail. Je la remercie pour ses qualités humaines et de me faire l'honneur de présider ce jury.

Mes remerciements vont également à M^r **Marouf Abderazek.**, Professeur au Centre Universitaire de Naâma, et à M^r **Yousfi Mohamed.**, Professeur à l'Université Amar Telidji Laghouat, qui m'ont fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail en qualité de rapporteurs externes. Je leur suis particulièrement reconnaissant de m'accompagner dans cette dernière étape du travail.

De même, je remercie très sincèrement M^r **Benmansour Abdelhafid.**, Professeur au département de l'Ecologie et Environnement, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Mes remerciements vont vers M^r **Larbat Romain.**, chargé de recherche au laboratoire d'Agronomie & Environnement et enseignante à l'université de Nancy en France, pour tous ses conseils, ses encouragements et son enthousiasme. C'était un véritable plaisir de travailler ensemble.

Au terme de plusieurs mois de travaux, je remercie du fond du cœur M^{me} **Chaouche-Haddouchi Farah.**, enseignante au département de Biologie, pour son aide et pour les discussions enrichissantes qui ont contribué à ce travail. Mes remerciements vont également, à M^r **Azzi Rachid.**, enseignant au département de Biologie, pour son aide.

Je tiens à remercier, enfin, les personnes des différents laboratoires, qui m'ont aidé au cours des expérimentations.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien quotidien de ma famille qui a toujours été là pour moi.

Merci.

Résumé

Le but de ce travail est d'étudier les capacités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quatre plantes originaires de l'Algérie. Il s'agit d'*Echium pycnanthum* Pomel., *Prasium majus* L., *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* et *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce.

Les teneurs en polyphénols ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers les tests d'évaluation suivants: capacité antioxydante totale, DPPH[·], ABTS^{·+}, pouvoirs de réduction et de chélation du fer, inhibition de blanchiment du β -carotène, anion superoxyde, radical hydroxyle et oxygène singulet. En outre, la détermination de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé et celle des dilutions en milieu liquide. L'analyse des extraits actifs a été réalisée par CLHP Orbitrap-MSⁿ.

Les extraits hydro-méthanoliques des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* et celui de les parties aériennes *P. majus* sont les plus riches en composés phénoliques et ont une activité antioxydante très importante par comparaison avec les autres espèces. La meilleure activité, par rapport à l'antioxydant de synthèse (BHT), est obtenue en piégeant le radical DPPH[·] avec des valeurs de CI₅₀ de 2.9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les écorces de racines et de 10.95 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les aiguilles. De même, ces extraits sont les plus actifs contre *Candida albicans* et quelques bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*). Cependant, tous les extraits ne montrent aucune activité vis-à-vis de toutes les souches de moisissures.

Des extractions successives par des solvants de polarité croissante (hexane, dichlorométhane, méthanol et aqueux), ont été réalisées à partir des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus*. Ce sont les extraits méthanoliques et aqueux, qui se sont montrés les plus riches en composés phénoliques et qui ont été les plus actifs pour leur potentiel antioxydant. La valeur de CI₅₀ de l'extrait méthanolique des écorces de racines, en piégeant le radical DPPH[·], est de 1.07 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Cependant, pour le test de chélation du fer, tous les extraits ont montré une activité plus faible à celles d'antioxydant de synthèse (EDTA). En outre, les extraits méthanoliques ont montré l'efficacité antibactérienne la plus importante contre *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, avec une valeur de CMI de 0.78 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Les extraits aqueux sont totalement inactifs, alors que ceux préparés à partir de l'hexane et du dichlorométhane ont montré une activité modérée contre *C. albicans* par rapport aux autres extraits, avec des valeurs respectives de CMI de 0.39 et 0.78 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pour tous les extraits méthanoliques et aqueux, les pourcentages d'hémolyse sont inférieurs à 5%, ce qui caractérise une hémolyse mineure.

L'analyse des extraits actifs par CLHP Orbitrap-MSⁿ a permis de mettre en évidence la présence de la proanthocyanine dimère, de la myricétine 3-*O*-glucoside, de la quercétine, de la rutine et de l'amentoflavone dans les aiguilles et de la proanthocyanine dimère, trimère et tetramère, de la catechine, de la quercétine hexose et de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside dans les écorces de racines de *J. oxycedrus*.

Mots clés : *plantes médicinales, composés phénoliques, activité antioxydante, capacité antimicrobienne, hémolyse, CLHP Orbitrap-MSⁿ.*

الغرض من هذا البحث هو دراسة تقدير النشاطات المضادة للأوكسدة والمضادة للميكروبات لمستخلصات لبعض النباتات في الجزائر *Juniperus oxycedrus* subsp *oxycedrus*، و *Echium pycnanthum* Pomel، و

Prasium majus L و *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce.

تم تحديد المحتوى الكمي للمركبات الفينولية بواسطة تقنيات طيفية، وكذا تم تحديد أنشطة مضادة للأوكسدة، من خلال الطرق التالية: القدرة الإجمالية لمضادة للأوكسدة، و تثبيط جذر DPPH[•] و ABTS^{•+}، و تثبيط تبيض β كاروتين، و قوة إرجاع و تثبيط الحديد، و تثبيط O₂¹ و O₂⁻ و OH[•]. تم إجراء تحديد نشاط مضادات الميكروبات، من خلال طريقة نشر الأقراص في وسط جامد، والتخفيفات في وسط السائل على السلالات البكتيرية والفطرية، لمعرفة قيمة الحد الأدنى للتركيز المثبط. تم فحص المستخلصات بواسطة تقنية HPLC Orbitrap-MSⁿ.

تحتوي مستخلصات الميثانول المائية للإبر ولحاء الجذور *J. oxycedrus*، على أعلى تركيزات المركبات الفينولية وأهم نشاطات مضادة للأوكسدة مقارنة بالنباتات الأخرى، و مضاد الأوكسدة النموذجي (BHT)، وهذا من خلال تثبيط جذر DPPH (قيم IC₅₀ للإبر 2.9 μغ/مل ولحاء الجذور 10.95 μغ/مل). هذه المستخلصات هي أكثر نشاطا ضد بعض أنواع البكتيريا والخميرة *Candida albicans*، ومع ذلك لم يتبين أي نشاط ضد السلالات الفطرية بعد إختبار جميع المستخلصات.

بعض المستخلصات أعدت من الإبر ولحاء الجذور *J. oxycedrus* عن طريق الإستخلاص المتعاقب بمذيبات مختلفة (الهكسان، ثنائي كلوروميثان، الميثانول والماء). تبين أن المستخلصات القطبية (الميثانول والماء) كانت الأكثر تركيزا بالمركبات الفينولية، و الأكثر نشاطا مع قيمة IC₅₀ لتثبيط جذر DPPH مقدر ب 1.07 μغ/مل لمستخلص الميثانول للحاء الجذور. فيما يخص إختبار قوة تثبيط الحديد، كل المستخلصات كانت ضعيفة مقارنة بمضاد الأوكسدة النموذجي (EDTA).

أظهرت نتائج مستخلصات الميثانول نشاطا ضد البكتيريا (*Acinetobacter baumannii*، و *Proteus mirabilis*، و *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus*)، حيث أن قيمة الحد الأدنى للتركيز المثبط هي 0.78 ملغ/مل. المستخلصات المائية غير فعالة تماما، في حين أن المستخلصان الهكسان وثنائي كلوروميثان لهما نشاط ضد *C. albicans* حيث تركيز المثبطين مقدرين ب 0.39 و 0.78 ملغ/مل، على التوالي. أما النسب المئوية للإنحلال الدم لمستخلصات الميثانول والماء كانت أقل من 5%، مما يميز بتسمم خلوي ضعيف.

ساعدت تحاليل مستخلصات الميثانول بواسطة تقنية HPLC Orbitrap-MSⁿ على وجود العفص الثنائي، الميريستين-3-O-جلوكوسيد، الكيرسيتين، الروتين وامينتوفلافون في الإبر. وايضا وجود العفص الثنائي، الثلاثي و الرباعي، كاتشين، كيرسيتين هيكسوز، إزرومنتين -3-O-غلوكوزونيد في لحاء الجذور *J. oxycedrus*.

الكلمات المفتاحية: النباتات الطبية، المركبات الفينولية، نشاط مضاد للأوكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، انحلال الدم،

HPLC Orbitrap-MSⁿ.

Abstract

The purpose of this study is to investigate the antioxidant and antimicrobial effects of extracts of some plants from Algeria. This is *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus*, *Prasium majus* L, *Echium pycnanthum* Pomel and *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce.

The phenolic contents were determined by spectrophotometric techniques. The antioxidant activities were determined *in vitro*, through the following methods: total antioxidant capacity, DPPH[·], ABTS^{·+}, inhibition of bleaching β -carotene, singlet oxygen, superoxide anion, hydroxyl radical, reducing power and iron chelation. The determination of the antimicrobial activity was performed by the method of diffusion in agar discs and the dilutions in liquid media. Analysis of active extracts was performed by HPLC Orbitrap-MSⁿ.

The hydro-methanolic extracts of the needles and bark of the roots of *J. oxycedrus* are rich in phenolic compounds and have a very interesting antioxidant activity. The best activity, compared to the synthesis antioxidant (BHT), is by DPPH[·] radical scavenging, with IC₅₀ values of 2.9 $\mu\text{g. ml}^{-1}$, for the root bark and 10.95 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, for needles. Also, these extracts are more active against some *Candida albicans* and bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*). Though, all the extracts showed no activity on all strains of fungi.

The extracts of needles and root bark of *J. Oxycedrus* were prepared by successive extractions with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, methanol and aqueous). The methanolic and aqueous extracts are the richest in phenolic compounds and the most active. The IC₅₀ value of the DPPH test in the methanolic extract of the root bark is 1.07 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. However, for the test of iron chelation, no extracts has shown comparable to those of the synthesis antioxidant (EDTA). The methanol extracts showed the greatest antibacterial activity with a MIC which value 0.78 mg.ml^{-1} , against *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. The aqueous extracts were completely inactive, while the hexane and dichloromethane extracts showed activity against *C. albicans* with MIC values of 0.39 and 0.78 mg.ml^{-1} , respectively. The percentages of haemolysis, are less than 5%, for all extracts, so are characterized by cytotoxicity minor.

The analysis of active extracts by HPLC Orbitrap-MSⁿ characterized the presence of proanthocyanin dimer, myricetin 3-*O*-glucoside, quercetin, rutin and amentoflavone in the needles and dimer, trimer and tetramer proanthocyanin, catechin, quercétin hexose and isorhamnetin-3-*O*-glucoside in the roots bark of *J. oxycedrus*.

Keywords: medicinal plants, compounds phenolics, antioxidant activity, antimicrobial activity, haemolysis assay, HPLC Orbitrap-MSⁿ.

Table des matières

Table des illustrations

Liste des tableaux

Liste des photos

Liste des figures

Introduction générale 01

1^{ère} Partie: Synthèse bibliographique

Chapitre 1.

Description, composition et activités des plantes étudiées

Résumé	03
I. Introduction.....	03
II. Généralités sur les plantes.....	03
1. <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	03
1.1. Étude botanique.....	03
1.2. Composition, activités biologiques et utilisations médicinales.....	04
2. <i>Echium pycnanthum</i> Pomel.....	05
2.1. Étude botanique.	05
2.2. Composition, activités biologiques et utilisations	05
3. <i>Prasium majus</i> L.	06
3.1. Étude botanique.....	06
3.2. Composition, activités biologiques et utilisations médicinales.....	06
4. <i>Solenostemma oleifolium</i> Bull. & Bruce	07
4.1. Étude botanique.....	07
4.2. Composition, activités biologiques et utilisations médicinales.....	07

Chapitre 2.

Les composés phénoliques, classification, activités antioxydante et antimicrobienne

Résumé.....	08
I. Introduction	08
II. Classification des composés phénoliques	10
1. Les acides phénoliques.....	10
1.1. Acides hydroxybenzoïques.....	10
1.2. Acides hydroxycinnamiques.....	10
2. Phénylpropanoïdes.....	10
2.1. Coumarines.....	10
2.2. Phénylpropènes.....	11
2.3. Lignanes.....	11
2.4. Lignines.....	11
3. Xanthones.....	11
4. Stilbènes.....	11
5. Flavonoïdes.....	12
5.1. Flavonoïdes au sens strict.....	12

5.1.1. <i>Chalcones et aurones</i>	12
5.1.2. <i>Flavones et flavonols</i>	13
5.1.3. <i>Flavanones et flavanonols</i>	13
5.2. Flavonoïdes au sens large.....	14
5.2.1. <i>Flavanols</i>	14
5.2.2. <i>Anthocyanes</i>	14
5.3. Isoflavonoïdes.....	15
6. Quinones et émodoles.....	15
7. Tanins.....	16
7.1. Tanins hydrolysables.....	16
7.2. Tanins condensés.....	16
III. Biosynthèse des polyphénols.....	17
1. Voie de l'acide shikimique.....	17
2. Voie de l'acide malonique.....	17
IV. Rôle et intérêt des composés phénoliques.....	19
V. Oxydants et antioxydants.....	20
1. Oxydants.....	20
1.1 Classes des radicaux libres.....	21
1.1.1. <i>Radicaux libres primaires</i>	21
1.1.2. <i>Radicaux libres secondaires</i>	21
1.2. Production des espèces réactives de l'oxygène.....	21
1.2.1. <i>Production endogène</i>	22
1.2.2. <i>Production exogène</i>	23
1.3. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques.....	23
1.3.1. <i>Lipides</i>	23
1.3.2. <i>Protéines</i>	23
1.3.3. <i>Acides nucléiques</i>	24
2. Antioxydants.....	24
2.1. Moyens de défense.....	24
2.1.1. <i>Défense endogènes</i>	24
2.1.2. <i>Défense exogènes</i>	24
2.2. Avantages et inconvénients des antioxydants.....	25
3. Polyphénols comme antioxydants.....	25
3.1. Inhibition enzymatique.....	25
3.2. Chélation des ions métalliques.....	26
3.3. Piégeage des radicaux libres.....	27
VI. Principaux groupes de composés phénoliques antimicrobiens.....	27
1. Phénols simples et les acides phénoliques.....	28
2. Flavonoïdes.....	28
3. Tanins.....	28
4. Quinones.....	28
5. Coumarines.....	29

2^{ème} Partie: Matériel et méthodes

I. Matériel végétal.....	30
1. Choix des plantes.....	30
2. Collecte du matériel végétal.....	30
II. Les extractions.....	31
1. Préparation des extraits hydro-méthanoliques.....	31
2. Extraction par des solvants organiques de polarité croissante.....	31
3. Calcul des rendements en extraits secs.....	32
III. Dosage des composés phénoliques.....	32
1. Polyphénols totaux.....	32
2. Flavonoïdes totaux.....	32
3. Tanins condensés.....	33
IV. Estimation des activités biologiques.....	33
1. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante.....	33
1.1. Capacité antioxydante totale	34
1.2. Piégeage du radical DPPH [•]	34
1.3. Pouvoir réducteur du fer.....	35
1.4. Piégeage du radical ABTS ^{•+}	36
1.5. Inhibition de blanchiment du β -carotène	37
1.6. Piégeage du radical hydroxyle.....	37
1.7. Piégeage de l'anion superoxyde.....	38
1.8. Piégeage de l'oxygène singulet.....	38
1.9. Pouvoir chélateur du fer	39
2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	39
2.1. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en disque.....	40
2.2. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	41
3. Test d'hémolyse.....	41
V. Analyse par CLHP Orbitrap-MS ⁿ	42
VI. Analyses statistiques.....	43

3^{ème} Partie: Résultats et discussion

Chapitre 1.

Étude phytochimique, activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits hydro-méthanoliques de quatre plantes

Résumé.....	44
I. Introduction	45
II. Résultats.....	46
1. Rendements en extraits hydro-méthanoliques.....	46
2. Teneurs en composés phénoliques.....	46
2.1. Courbes d'étalonnages.....	46
2.1.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux	46
2.1.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.....	47
2.1.3. Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés.....	47
2.2. Analyses spectrophotométriques des extraits hydro-méthanoliques.....	48

3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-méthanoliques.....	49
3.1. Détermination de l'activité antioxydante.....	49
3.1.1. Capacité antioxydante totale.....	49
3.1.2. Piégeage du radical DPPH [·]	50
3.1.3. Pouvoir réducteur du fer.....	51
3.1.4. Piégeage du radical ABTS ^{·+}	52
3.1.5. Inhibition de blanchiment du β-carotène.....	54
3.1.6. Pouvoir chélateur du fer.....	56
3.2. Influence des teneurs en composés phénoliques sur les activités antioxydantes des différents extraits.....	57
4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits hydro-méthanoliques.....	58
III. Discussion.....	60
IV. Conclusion.....	63

Chapitre 2.

Étude phytochimique, activités antioxydantes, antimicrobiennes et hémolytiques des extraits de Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus

Résumé.....	64
I. Introduction.....	65
II. Résultats.....	67
1. Rendement des extraits de polarité croissante.....	67
2. Teneurs en composés phénoliques.....	67
3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de polarité croissante.....	68
3.1. Détermination de l'activité antioxydante.....	68
3.1.1. Selection des extraits les plus actifs par trois méthodes.....	68
a. Capacité antioxydante totale.....	68
b. Piégeage du radical DPPH [·]	69
c. Pouvoir réducteur du fer.....	70
3.1.2. Evaluation de de l'activité antioxydante des extraits actifs par d'autres méthodes.....	72
a. Piégeage du radical ABTS ^{·+}	72
b. Inhibition de blanchiment du β-carotène.....	73
c. Pouvoir chélateur du fer.....	74
d. Piégeage du radical hydroxyle.....	75
e. Piégeage de l'anion superoxyde.....	76
f. Piégeage de l'oxygène singulet.....	77
3.2. L'influence des composés phénoliques sur les activités antioxydantes.....	78
4. Etude de l'activité antimicrobienne.....	79
4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	79
4.1.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide.....	79
4.1.2. Détermination des CMI.....	80
4.2. Evaluation de l'activité antifongique.....	81
4.2.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide.....	81
4.2.2. Détermination des CMI.....	81
5. Tests d'hémolyse <i>in vitro</i>	82
III. Discussion.....	84
IV. Conclusion.....	87

Chapitre 3.

Analyse par CLHP Orbitrap-MSn des extraits méthanoliques des aiguilles et des écorces de racines de *Juniperus oxycedrus subsp oxycedrus*

Résumé.....	88
I. Introduction	88
II. Résultats.....	88
1. Identification des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique des aiguilles.....	89
1.1. Flavanols.....	91
1.2. Flavonols.....	92
1.3. Biflavones.....	96
2. Identification des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique des écorces de racines.....	97
2.1. Flavanols.....	100
2.2. Biflavones.....	101
2.3. Flavonols.....	101
III. Discussion.....	103
Conclusion Générale	105
Références bibliographiques	107
Valorisation des travaux de recherche	119

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1: Structure des dérivés de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique.....	10
Figure 2: Structure des dérivés de coumarines	10
Figure 3: Structure de lignane (matairesinol)	11
Figure 4: Structure de base de xanthone.....	11
Figure 5: Structure de stilbène.....	11
Figure 6: Structure générale de flavonoïde.....	12
Figure 7: Structures chimiques des chalcones et de saurones.....	13
Figure 8: Structures chimiques des flavones et des flavonols.....	13
Figure 9: Structures chimiques des flavanones et des flavanonol.....	14
Figure 10: Structures chimiques des flavanols et des flavan-3,4-diols.....	14
Figure 11: Structures chimiques des anthocyanes.....	15
Figure 12: Structure de base des isoflavanes et des isoflavones.....	15
Figure 13: Structure de l'emodole et l'antraquinone.....	16
Figure 14: Structure de tanin hydrolysable et tanin condensé.....	16
Figure 15: Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols.....	18
Figure 16: Déséquilibre de la balance entre oxydant et antioxydant (stress oxydant).....	20
Figure 17: Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène.....	22
Figure 18: Sites de chélation de métal (Me^{n+}) pour les flavonoïdes	26
Figure 19: Propriétés réductrices des polyphénols.....	27
Figure 20: Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	27
Figure 21: Forme réduite du radical DPPH.....	35
Figure 22: Structure de quelques antioxydants synthétiques (témoins positifs).....	36
Figure 23: Génération de l'ABTS ^{•+} par un oxydant.....	36
Figure 24: Structure du β -carotène.....	37
Figure 25: Structure chimique de la ferrozine.....	39
Figure 26: Etapes de la réalisation de l'étude phytochimique, activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits hydro-méthanoliques.....	45
Figure 27: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	47
Figure 28: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	47
Figure 29: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.....	48
Figure 30: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la CAT.....	49
Figure 31: Capacité antioxydante totale des extraits hydro-méthanoliques.....	50
Figure 32: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits hydro-méthanoliques et du BHT.....	51
Figure 33: Valeurs de CI_{50} des extraits hydro-méthanoliques et du BHT par la méthode du DPPH.....	51
Figure 34: Pouvoirs réducteurs des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse	52
Figure 35: pouvoir réducteur exprimé par les valeurs de CE_{50} des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse.....	53
Figure 36: Pourcentages d'inhibition du radical ABTS ^{•+} en fonction des différentes concentrations des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse	53
Figure 37: Valeurs de CI_{50} des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse par la méthode de piégeage du radical ABTS ^{•+}	54
Figure 38: Pourcentages d'inhibition de blanchiment du β -carotène en fonction des différentes	

concentrations des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse.....	55
Figure 39: Valeurs de CI_{50} des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse par la méthode de blanchiment du β -carotène.	56
Figure 40: Pourcentages d'inhibition du pouvoir chélateur en fonction des différentes concentrations des extraits hydro-méthanoliques.....	56
Figure 41: Valeurs de CI_{50} des extraits hydro-méthanoliques et d'EDTA par la méthode du p. chélateur.....	57
Figure 42: Etapes de la réalisation de l'étude phytochimique, activités antioxydantes, antimicrobiennes et hémolytiques de quelque extrait de <i>Juniperus oxycedrus</i>	66
Figure 43: Capacité antioxydante totale des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i>	69
Figure 44: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH' en fonction des différentes concentrations des extraits de <i>J. oxycedrus</i> et des antioxydants de synthèse	69
Figure 45: Valeurs de CI_{50} des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et des antioxydants de synthèse par la méthode du piégeage du radical libre DPPH'.....	70
Figure 46: Pouvoirs réducteurs en fonction des différentes concentrations des extraits de <i>J. oxycedrus</i> et des antioxydants de synthèse	70
Figure 47: Valeurs de CE_{50} des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et des antioxydants de synthèse par la méthode de la réduction du fer.	71
Figure 48: Pourcentages d'inhibition du radical $ABTS^{\cdot+}$ en fonction des différentes concentrations des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et des antioxydants de synthèse	72
Figure 49: Valeurs de CI_{50} des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et des antioxydants de synthèse par la méthode de piégeage du radical $ABTS^{\cdot+}$	73
Figure 50: Pourcentages d'inhibition de blanchiment du β -carotène en fonction des différentes concentrations des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et des antioxydants de synthèse	73
Figure 51: Valeurs de CI_{50} des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et des antioxydants de synthèse par la méthode d'inhibition de blanchiment du β -carotène.	74
Figure 52: Pourcentages d'inhibition du pouvoir chélateur en fonction des différentes concentrations de <i>J. oxycedrus</i>	74
Figure 53: Pourcentages d'inhibition de piégeage du radical hydroxyle en fonction des différentes concentrations des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et d'antioxydants de synthèse	75
Figure 54: Valeurs de CI_{50} des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et d'antioxydants de synthèse par la méthode de piégeage du radical hydroxyle.	76
Figure 55: Pourcentages d'inhibition du radical superoxyde en fonction des différentes concentrations des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et d'antioxydants de synthèse	76
Figure 56: Valeurs de CI_{50} des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et d'antioxydants de synthèse par la méthode de piégeage du radical superoxyde.	77
Figure 57: Pourcentages d'inhibition de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et d'antioxydants de synthèse	78
Figure 58: Valeurs de CI_{50} des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> et d'antioxydants de synthèse par la méthode de l'oxygène singulet.	78
Figure 59: Activité hémolytique des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i> , exprimées en pourcentage, à des différentes concentrations et en fonction du temps.....	83
Figure 60: Chromatogramme d'une analyse par CLHP de l'extrait méthanolique des aiguilles de <i>J. oxycedrus</i> , enregistré à la longueur d'onde $\lambda=280$ nm.....	89
Figure 61: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la proanthocyanidine dimère B2 et de sa fragmentation.....	91
Figure 62: Spectre de masse SM en mode positif de la proanthocyanidine dimère et de sa fragmentation	91
Figure 63: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la myricétine-3-glucoside et de sa fragmentation.....	92

Figure 64: Spectre de masse SM en mode positif de la myricétine-3-glucoside et de sa fragmentation.....	92
Figure 65: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la quercétine hexose et de sa fragmentation.....	93
Figure 66: Spectre de masse SM en mode positif de la quercétine hexose et de sa fragmentation.....	93
Figure 67: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la rutine et de sa fragmentation.....	94
Figure 68: Spectre de masse SM en mode positif de la rutine et de sa fragmentation.....	94
Figure 69 : Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la quercétine-deoxyhexose et de sa fragmentation.....	95
Figure 70: Spectre de masse SM en mode positif de la quercétine-deoxyhexose et de sa fragmentation....	95
Figure 71: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de l'amentoflavone et de sa fragmentation.	96
Figure 72: Spectre de masse SM en mode positif de l'amentoflavone et de sa fragmentation.....	96
Figure 73: Chromatogramme d'une analyse par CLHP de l'extrait méthanolique des écorces de racines de <i>J. oxycedrus</i> , enregistré à la longueur d'onde $\lambda=280$ nm.....	97
Figure 74: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la proanthocyanidines et de sa fragmentation.	100
Figure 75: Spectre de masse SM en mode positif de la proanthocyanidines et de sa fragmentation.....	100
Figure 76: Spectre UV et Spectre de masse SM en mode négatif de l'isorhamnétine-3-O-glucoside et de sa fragmentation.....	102

Liste des photos

Photo 1: <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	4
Photo 2: <i>Echium pycnanthum</i> Pomel.....	5
Photo 3: <i>Prasium majus</i> L.....	6
Photo 4: <i>Solenostemma oleifolium</i> Bull. & Bruce.	7
Photo 5: Situation géographique des stations de collecte.....	31

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés biologiques des quelques composés phénoliques dans l'organisme.....	19
Tableau 2: Principales substances antioxydantes.....	25
Tableau 3: Avantages et inconvénients des antioxydants.....	25
Tableau 4: Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations d'études.....	30
Tableau 5: Description et pouvoir pathogène des souches testées.....	40
Tableau 6: Rendements massiques des extraits hydro-méthanoliques.	46
Tableau 7: Contenus en composés phénoliques des extraits hydro-méthanoliques des plantes.....	48
Tableau 8: Corrélations linéaires entre les tests antioxydants et les teneurs en composés phénoliques des extraits hydro-méthanoliques.	57
Tableau 09: Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits hydro-méthanoliques et des contrôles, positif et négatif.....	59
Tableau 10: Aspects, couleurs et rendements massique des extraits obtenus par extraction au soxhlet....	67
Tableau 11: Contenus en composés phénoliques des différents extraits.....	68
Tableau 12: Corrélations linéaires entre les tests antioxydants et les composés phénoliques des extraits M et Aq de <i>J. oxycedrus</i>	79
Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits de polarité croissante et des contrôles, positif et négatif.	80

Tableau 14: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits.	80
Tableau 15: Diamètre des zones d'inhibition	81
Tableau 16: Concentrations minimales inhibitrices des extraits et de l'amphotéricine vis-à-vis de la souche de <i>Candida albicans</i>	81
Tableau 17: Composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-MS ⁿ dans l'extrait méthanolique des aiguilles de <i>J. oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	90
Tableau 18: Composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-MS ⁿ dans l'extrait méthanolique des écorces de racines de <i>J. oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	98

Introduction générale

L'Algérie dispose d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition d'utilisation des plantes. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de cette biodiversité végétale en se servant de données ethno-pharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux principes actifs, qui pourraient aider à résoudre le problème croissant de la résistance microbienne et la cancérogénicité des additifs alimentaires synthétiques actuellement disponibles dans le commerce.

Actuellement, les scientifiques favorisent le développement d'une nouvelle génération de substances antimicrobiennes et/ou antioxydantes d'origine végétale pour remplacer celles de synthèse. De même, un certain nombre de secteurs industriels se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules aux caractéristiques biologiques intéressantes dans leurs formulations (Taviano et al., 2013). A cet effet, des études scientifiques s'intéressent à la phytochimie et aux activités des extraits de plantes, dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des produits naturels (Atik et al., 2008; Ksouri et al., 2012; Larbat et al., 2012; Haddouchi et al., 2013; Taviano et al., 2013).

Dans ce contexte, ce travail est consacré à l'étude phytochimique et à l'évaluation du potentiel antioxydant et antimicrobien des extraits de quelques plantes, *Echium pycnanthum* Pomel., *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*., *Prasium majus* L. et *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce., issues du screening de plantes traditionnellement utilisées en Algérie. Le manque d'information de nature chimique et/ou biologique, sur ces espèces spontanées, justifie le choix de ces plantes.

Cette étude comporte trois parties :

- ❖ La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur les plantes étudiées, la classification et l'intérêt des composés phénoliques, les composés antimicrobiens, les oxydants et les antioxydants;
- ❖ La seconde décrit la partie expérimentale, avec une présentation des techniques d'extraction, des dosages spectrophotométriques, des tests antioxydants, antimicrobiens, hémolytique et de la technique d'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP Orbitrap-MSⁿ);
- ❖ La troisième est consacrée aux résultats et à la discussion. Elle est répartie en trois chapitres:

- Le premier sur l'étude des teneurs en composés phénoliques, les activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits hydro-méthanoliques de plusieurs parties des 4 plantes afin de sélectionner la plante la plus prometteuse.
- Le deuxième est consacré à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de l'espèce la plus prometteuse, obtenus par des épuisements successifs avec des solvants de polarité croissante. En outre, un test d'hémolyse a été réalisé.
- Dans le dernier chapitre, les extraits méthanoliques, qui se sont montrés les plus actifs, ont été analysés par CLHP Orbitrap-MSⁿ.

Ce travail s'achève par une conclusion générale et des perspectives.

1^{ère} Partie: Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Description, composition et activités des plantes étudiées

Résumé : Malgré l'enquête approfondie de la littérature, peu de références ont été trouvées sur les plantes étudiées. *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce., (Asclepiadaceae) est surtout présente dans le Sahara algérien. Cette espèce est fréquemment utilisée dans la médecine traditionnelle comme purgatif, antipyrétique, expectorant et antispasmodique. *Echium pycnanthum* Pomel (Boraginaceae) est une plante endémique de la région aride, elle est utilisée pour traiter l'hépatite. *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Cupressaceae) est un arbuste à l'état sauvage dans les endroits pierreux des pays méditerranéens. Cette espèce est fréquemment utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies, telles que l'hyperglycémie, l'obésité et la pneumonie. *Prasium majus* L (Lamiacées) est une plante méditerranéenne. Elle est utilisée pour traiter les maladies gastro-intestinales.

I. Introduction

Dans le but de la recherche de plantes dotées de propriétés biologiques intéressantes, il est préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de les circonscrire selon divers critères fiables. Parmi ces derniers, le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones. Pour cela, quatre plantes, à savoir *Echium pycnanthum* Pomel, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Prasium majus* L et *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce., ont été choisies.

II. Généralités sur les plantes

1. *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*

1.1. Etude botanique

La famille des cupressacées comprend de 135 espèces appartenant à 29 genres, parmi lesquels le genre *Juniperus* avec environ 70 espèces (Akkol et al., 2009).

Juniperus oxycedrus un arbrisseau ou arbuste dressé de 1-8 mètres, à bourgeons écaillés et à ramules obtusément triangulaires. Feuilles très étalées, verticillées, toutes linéaires en alène à pointe fine et piquante, articulées, non décurrentes, marquées de 2 sillons blanchâtres séparées par la nervure médiane en dessus et à carène obtuse et non sillonnées en dessous. Fleurs dioïques. Fruits rouges et luisants à la maturité, assez gros (8-10 millimètre) (Photo 1).

Il pousse dans les forêts des régions côtières méditerranéennes (du Maroc à l’Iran) et favorise les endroits pierreux (Mansouri et al., 2010). Klimko et al. (2007) ont considéré que cette espèce regroupe 4 sous-espèces: subsp. *macrocarpa*, subsp. *badia*, subsp. *transtagana* et subsp. *oxycedrus*. Cette dernière est la plus abondante dans notre région.

Noms communs (Trabut, 2006):

En français: Cade, Cèdre piquant, Genévrier cade, Genévrier oxycèdre

Nom vernaculaire: Tamerbut-Tagga-Teka-Tiqqi-Titkit

Classification botanique (Dupont et Guiguard, 2007):

Embranchement: Spermaphytes

Sous-embranchement: Gymnospermes

Classe: Conifères

Ordre: Coniférales

Famille: Cupressacées

Genre: *Juniperus*

Espèce: *oxycedrus*



Photo 1: *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*.

1.2. Composition, activités biologiques et utilisations médicinales

Les plantes appartenant au genre *Juniperus* contiennent divers composés tels que les composés phénoliques (flavonoïdes, tanins et biflavonoïdes) (Innocenti et al., 2007; Miceli et al., 2009; Taviano et al., 2013) et les terpénoïdes (huiles essentielles, sesquiterpénoïdes, diterpénoïdes, lignanes et d’autres terpènes) (Loizzo et al., 2007; Seca et al., 2008; Orav et al., 2010; Marija et al., 2011).

Les plantes de ce genre ont des activités biologiques: antioxydante (Taviano et al., 2013), antiseptique (Miceli et al., 2009; Taviano et al., 2013), antivirale (Sassi et al., 2008), anti-inflammatoire (Akkol et al., 2009; Lesjak et al., 2013), nociceptif (Akkol et al., 2009), anticancéreux (Kusari et al., 2010), antidiabétique (Orhan et al., 2012) et neuroprotecteur (Tavares et al., 2012). Ce genre a toujours été considéré comme un bon remède traditionnel en raison de leur propriétés thérapeutiques nombreuses, telles que: l’hyperglycémie, la tuberculose, la bronchite et la pneumonie (OMS, 1980). Ce genre est aussi utile dans le traitement du psoriasis (Koerfgen, 1964) et la névrose neurasthénique (Jonkov et Naidenov, 1974). *Juniperus oxycedrus* est utilisé pour préparer une huile empyreumatique par la distillation du bois de l’arbre, qui est largement utilisé en dermatologie humaine et vétérinaire pour traiter l’eczéma chronique et autres maladies de la peau (Bouhlal et al., 1988; Tavares et al., 2012).

2. *Echium pycnanthum* Pomel

2.1. Etude botanique

La famille des Boraginacées comprend 2000 espèces en 120 genres (Watson et Dallwitz, 1991), parmi lesquels le genre *Echium* qui comprend environ 60 espèces, originaires d'Europe, d'Afrique et d'Asie occidentale. Elles poussent abondamment dans les lieux secs, plus ou moins rocailleux, dans les friches et au bord des chemins. Elles fleurissent à partir de mai à août.

Echium pycnanthum est une plante spontanée connue sous le nom vernaculaire : *Hemimech*. (Photo 2). Les tiges ont un aspect blanchâtre, des racines rouges et une corolle purpurine ou bleu violacée. Elle pousse dans des pâturages arides et désertiques (Quezel et Santa, 1963).

Classification botanique (Dupont et Guiguard, 2007)

Embranchement: Spermatophytes

Sous Embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Boraginales

Famille: Boraginacées

Genre: *Echium*

Espèce : *pycnanthum*



Photo 2: *Echium pycnanthum* Pomel.

2.2. Composition, activités biologiques et utilisations médicinales

Le genre *Echium* est riche en mucilage à fructosanes, en allantoinne cicatrisante et adoucissante, et aussi en alcaloïdes hépatotoxiques. Les racines de ce genre sont riches en shikonine (Albrecht et al., 2009 ; Chaouche et al., 2012). On utilise les sommités fleuries de ce genre pour bénéficier de leurs propriétés astringentes, émollientes, expectorantes, sudorifères. Elle est dotée de pouvoirs antigonadotrophique et antitumoral (Bernard, 2001).

E. pycnanthum est bien connue chez les tradithérapeutes. Elle est utilisée traditionnellement pour soigner l'hépatite. Ce sont surtout les racines qui sont utilisées et vendues sur les marchés.

3. *Prasium majus* L

3.1. Etude botanique

La famille des Lamiacées comprend environ 6900 espèces et près de 233 genres. Ils sont répartis dans le monde entier (Chia-Jung et al., 2011).

Prasium majus L. est une plante vivace annuelle. Les feuilles de cette plante sont pétiolées, ovales, vert foncé brillant, dentées. Les tiges sont très ramifiées, glabres ou peu poilues, à écorce vert grisâtre avec le temps. Les fleurs sont blanches (Photo 3). Les fruits sont noirs brillant à maturité. Elle pousse dans la région méditerranéenne de façon sauvage sur les lieux pierreux, les rochers, les vieux murs, les lieux rocaillieux calcaires et les sols sableux côtiers.

Classification botanique (Quezel et Santa, 1963).

Embranchement: Spermatophytes

Sous Embranchement: Magnoliophyta

Classe: Eudicots

Ordre: Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Prasium*

Espèce : *majus*



Photo 3: *Prasium majus* L.

3.2. Composition, activités biologiques et utilisations médicinales

Aucun travail de nature chimique et/ou biologique n'a été trouvé sur cette espèce. Cependant, il est connu que les feuilles, en infusion, agissent contre les maux de la vésicule biliaire. En décoction, elles sont réputées comme digestives et calmantes (Bamm et Douira, 2002).

4. *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce.

4.1. Etude botanique

La famille des Asclepiadacées regroupe 2000 espèces de plantes réparties en près de 250 genres. Il s'agit d'une famille composée en majorité de plantes herbacées, de lianes, d'arbustes, mais aussi de quelques arbres. On trouve ces espèces dans les régions subtropicales à tropicales avec quelques rares plantes en régions tempérées.

Solenostemma oleifolium est un arbrisseau (photo 4) qui peut atteindre 60 centimètres de haut, connue sous le nom vernaculaire : *Ardjel*. Les feuilles sont opposées, ovales un peu épaisses, coriaces, de couleur vert amande, les inflorescences blanches en ombelles denses. À maturité, il se couvre de gros follicules violet foncé. Les tiges brisées laissent échapper un suc visqueux. Cette espèce pousse dans des conditions extrêmement sèches. Elle est très répandue au pied des falaises, dans les zones rocailleuses. Elle est localisée dans le Sahara central algérien, le Tassili n'Ajjer et les montagnes du Hoggar (Benchelah et al., 2004; Hammiche et Maiza, 2006).

Classification botanique (Dupont et Guiguard, 2007)

Embranchement: Spermatophytes

Sous Embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Gentianales

Famille: Asclepiadacées

Genre: *Solenostemma*

Espèce: *oleifolium*



Photo 4: *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce.

4.2. Composition, activités biologiques et utilisations médicinales

Des travaux ont révélé la présence de glycosides phénoliques acylés, à savoir argeline et l'argeloside, la choline, les flavonoïdes, le glucoside monoterpène, le sitostérol et la saponine triterpénoïde (Hassan et al., 2000; Hassan et al., 2001; Kamel, 2003).

En médecine traditionnelle, cette plante est utilisée pour le traitement du diabète, des troubles respiratoires (la pleurésie et la toux), des rhumatismes, des douleurs d'estomac, des infections urinaires et comme fébrifuge (Hammiche et Maiza, 2006). La sève amère de la tige est utilisée pour le traitement du rhume, une goutte de cette sève aide à dégager les sinus (Benchelah et al., 2004). Des études pharmacologiques montrent qu'elle a des activités anti-inflammatoires, antimicrobienne (Hegazi et al., 1994) et larvicide (El-Kamali, 2001).

Chapitre 2. Les composés phénoliques, classification, activités antioxydante et antimicrobienne

Résumé : Les composés phénoliques sont considérés comme des composés quasi universels des végétaux. Structurellement, ils se répartissent en plusieurs classes allant de composés présentant un simple noyau phénolique comme l'acide gallique à des composés polymériques complexes comme les tanins.

On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes. *In vitro*, les composés phénoliques présentent des activités antioxydante, antimicrobienne, antivirale, anti-inflammatoire et anticancéreuse. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) et les superoxydes ($\cdot\text{O}_2^-$) et aussi à leur affinité pour une grande variété de protéines dont certains enzymes et récepteurs.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les différentes classes des composés phénoliques. On fera suivre par un rappel bibliographique sur les oxydants, les antioxydantes et les antimicrobienne.

I. Introduction

Il y a actuellement un regain d'intérêt pour les composés phytochimiques comme source potentielle d'antioxydants naturels. L'objectif est de les utiliser dans les aliments et préparations pharmaceutiques pour remplacer des antioxydants synthétiques (BHA, BHT, etc.). La plupart des antioxydants isolés à partir de plantes, ce sont des composés phénoliques. Toutefois, les informations scientifiques sur les propriétés antioxydantes de diverses plantes sauvages, en particulier celles qui sont moins répandues en raison de leurs caractères endémiques, sont encore assez rares (Oueslati et al., 2012). Nous connaissons actuellement plus de 250000 espèces végétales. Celles-ci produisent un large éventail de substances chimiques de structures variées comme les métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont des produits issus directement des photoassimilats, qui participent à la structure de la cellule végétale ainsi qu'à son fonctionnement de base (Hopkins, 2003). Ces composés sont classés en quatre principaux groupes, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Par opposition, les métabolites secondaires ne sont pas produits

directement lors de la photosynthèse mais sont synthétisés à partir des métabolites primaires et résultent de réactions chimiques ultérieures. Leurs rôles dans la physiologie de la plante ne sont pas encore tous élucidés.

Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale. Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple et sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique.

On trouve ces métabolites dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes sont:

- Les alcaloïdes, des molécules renferment un atome d'azote dans la structure. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine et la lupinine.

-Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène (C_5H_8) et ont pour formule de base des multiples de celle-ci $(C_5H_8)_n$. En fonction du nombre n , on peut distinguer les monoterpènes ($n = 2$), les sesquiterpènes ($n = 3$), les diterpènes ($n = 4$), les sesterpènes ($n = 5$), les triterpènes ($n = 6$) et les tétraterpènes ($n = 8$). Parmi les terpènes les plus importants, on trouve: l' α -pinène, le β -pinène, le δ -3-carène, le limonène, le carotène (Bruneton, 2009).

- Les composés phénoliques regroupent plusieurs classes chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Il existe de nombreuses classes de ces composés : acides phénols, flavonoïdes, coumarines et tanins. Ces structures peuvent également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures. D'un point de vue biosynthèse, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques : la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, des flavonoïdes et des lignanes; et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (Bruneton, 2009).

Dans cette étude, on s'intéresse plus particulièrement aux composés phénoliques dont on présente quelques exemples ainsi que leur biosynthèse.

II. Classification des composés phénoliques

1. Acides phénoliques

Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués (figure 1) (Andersen et Markham, 2006; Bruneton, 2009):

1.1. Acides hydroxybenzoïques

Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C₆-C₁), dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique.

1.2. Acides hydroxycinnamiques

Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C₆-C₃), dont les plus abondants sont les acides caféique et coumarique. Ils sont à l'origine des voies de biosynthèse de nombreuses substances telles que les lignines, les flavonoïdes et les stilbènes.

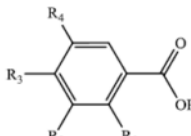
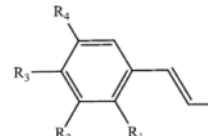
									
Les acides benzoïques	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Les acides cinnamiques	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ac. benzoïque	H	H	H	H	Ac. cinnamique	H	H	H	H
Ac. salicylique	OH	H	H	H	Ac. <i>o</i> -coumarique	OH	H	H	H
Ac. <i>p</i> -hydroxy- benzoïque	H	H	OH	H	Ac. <i>m</i> -coumarique	H	OH	H	H
Ac. gallique	H	OH	OH	OH	Ac. <i>p</i> -coumarique	H	H	OH	H
Ac. protocatéchique	H	OH	OH	H	Ac. caféique	H	OH	OH	H

Figure 1: Structure des dérivés de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique

2. Phénylpropanoïdes

Ils dérivent de l'acide aminé phénylalanine et peuvent contenir un ou plusieurs résidus en C₆-C₃. Parmi les phénylpropanoïdes, on trouve (Cseke et al., 2006; Bruneton, 2009):

2.1. Coumarines

Ce sont des lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques (C₆-C₃) (figure 2). Elles possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette. On les divise en coumarines simples et complexes (furocoumarines, pyranocoumarines).

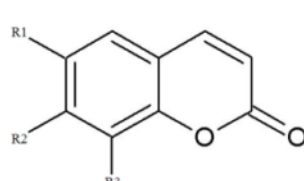
	R ₁	R ₂	R ₃
			
Umbelliférol	H	OH	H
Aescultol	OH	OH	H
Scopolétole	OCH ₃	OH	H
Fraxétole	OCH ₃	OH	OH
Daphnétole	H	OH	OH

Figure 2: Structure des dérivés de coumarines

2.2. Phénylpropènes

Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C₆-C₃). Ils contribuent à la saveur parfumée et l'odeur des plantes.

2.3. Lignanes

Ces composés répondent à une représentation structurale du type (C₆-C₃)₂ (figure 3). Ce sont des molécules qui résultent, le plus souvent, de l'établissement d'une liaison entre deux carbones de la chaîne latérale de deux acides hydroxycinnamiques. Ils interviennent dans les mécanismes de défense de la plante (Stalikas et al., 2007). Les lignanes se trouvent essentiellement dans les graines d'oléagineux.

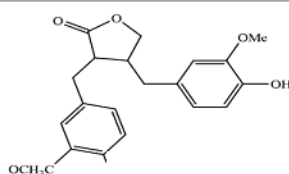


Figure 3: Structure de lignane (matairesinol)

2.4. Lignines

Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C₆-C₃)_n. Ces composés de haut poids moléculaire contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation de trois alcools phénylpropéniques.

3. Xanthones

C'est une famille constituée des composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures répondant à une structure de base en C₆-C₁-C₆ (figure 4) (Bruneton, 2009).

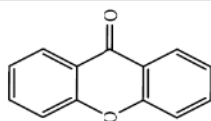


Figure 4: Structure de base de xanthone

4. Stilbènes

Les stilbènes répondent à une représentation structurale de type (C₆-C₂-C₆) (figure 5). Ils se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine. Parmi ces composés, on trouve le résveratrol qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales (Andersen et Markham, 2006; Bruneton, 2009).

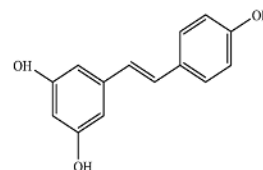


Figure 5: Structure de stilbène

5. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane C₆-C₃-C₆ (figure 6), les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C. Deux types de structures ont été relevés : celui des flavonoïdes au sens strict dont la structure porte le noyau aromatique B en position 2 sur la chaîne C₂ et celui des isoflavonoïdes dont le noyau aromatique B est en position 3 sur la chaîne C₂. Les flavonoïdes se distinguent par le degré d'oxydation du noyau central (qui peut être ouvert ou fermé), le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C (Harborne, 1988). Dans la plante, ils sont très souvent liés aux sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre (Macheix et al., 2005; Bruneton, 2009).

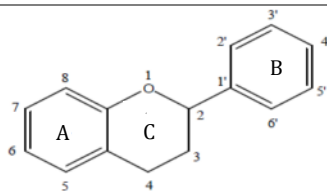


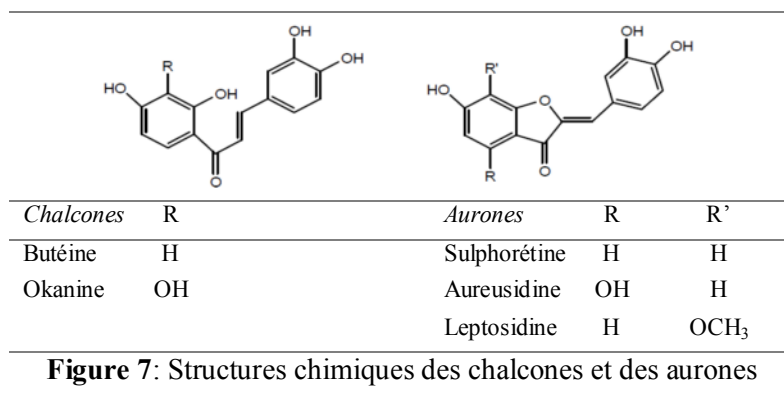
Figure 6 : Structure générale de flavonoïde

5.1. Flavonoïdes au sens strict

Dans ce groupe, on distingue les chalcones, les aurones, les flavones, les flavanes, les flavanones, les flavanols, les flavonols et les flavanonols.

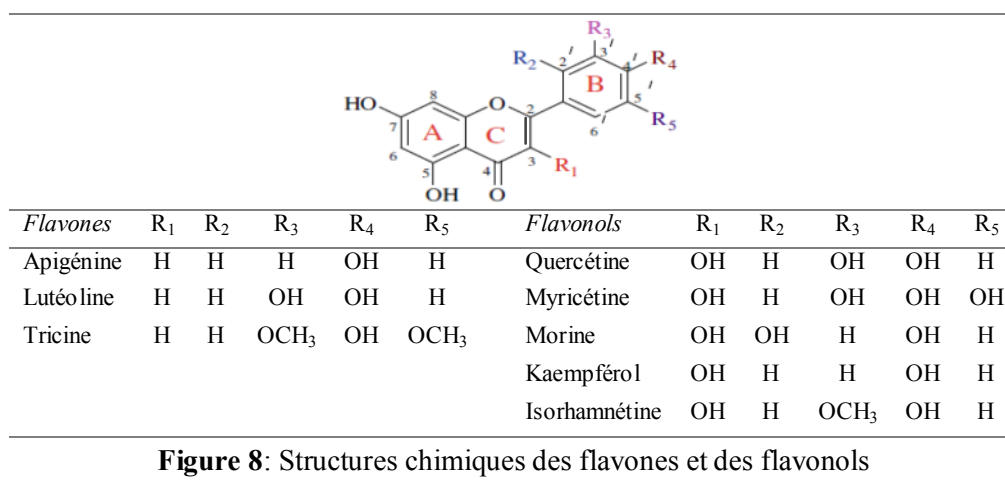
5.1.1. Chalcones et aurones

Les chalcones sont des flavanoïdes ne comportant pas d'hétérocycle C (figure 7). Elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique. Le noyau B reste peu ou pas substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones ont une structure proche mais différente de la plupart des autres flavonoïdes. En effet, même si ces molécules dérivent aussi de la chalcone (qui se ferme pour former un second cycle), dans les cas des aurones, la chalcone se ferme en formant un cycle à 5 atomes, alors qu'elle forme un cycle de 6 atomes pour les autres flavonoïdes (Andersen et Markham, 2006). Ces composés sont extrêmement fréquents dans les fleurs sous forme de pigments contribuant à la couleur jaune.



5.1.2. Flavones et flavonols

Ces flavonoïdes possèdent généralement trois hydroxyles phénoliques en C₅, C₇ et C'₄ et une double liaison C₂-C₃ (figure 8). Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C₃. Ces composés peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses : D-glucose, D-galactose, L-rhamnose et L-arabinose (Andersen et Markham, 2006).



5.1.3. Flavanones et flavanonols

Les flavanones et les flavanonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C₂-C₃ et par la présence d'un carbone asymétrique en C₂, voire en C₃. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et flavonols.

Les flavanonols (encore appelés dihydroflavonols) se distinguent des flavanones par la présence d'un groupement OH en position C₃. Sur la figure 9 sont représentés des exemples de molécules appartenant à ce groupe de flavonoïdes (Andersen et Markham, 2006).

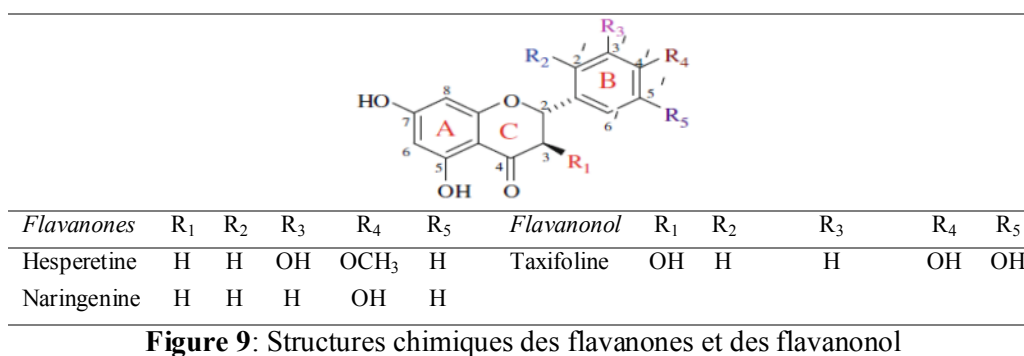


Figure 9: Structures chimiques des flavanones et des flavanonol

5.2. Flavonoïdes au sens large

5.2.1. Flavanols

Ce groupe est toujours hydroxylé en position 3 et se caractérise par l'absence du groupe carbonyle en C₄ (figure 10). Les flavan-3-ols (appelés aussi les catéchines) possèdent deux atomes asymétriques en C₂ et C₃. Chaque composé peut alors exister sous forme de quatre stéréoisomères optiquement actifs: (+)-catéchine, (+)-épicatéchine, (-)-catéchine, (-)-épicatéchine. Le premier et le quatrième sont les formes les plus répandues.

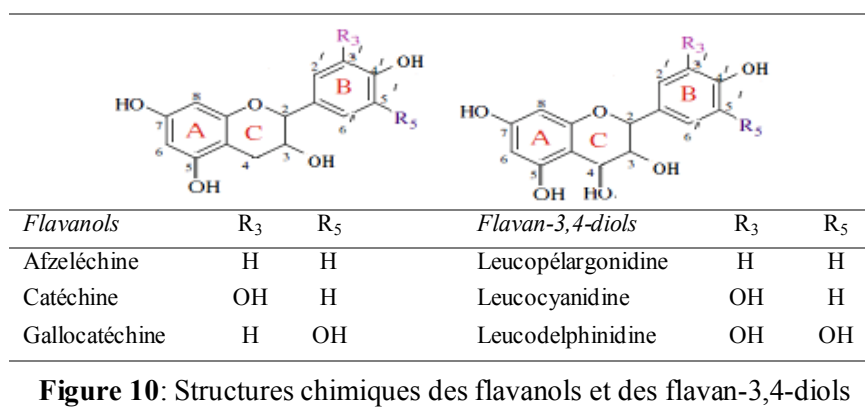


Figure 10: Structures chimiques des flavanols et des flavan-3,4-diols

Les flavan-3,4-diols se distinguent des catéchines par la présence du OH en position 4. Ils possèdent trois atomes de carbones asymétriques, et peuvent, théoriquement, exister sous forme de huit stéréoisomères optiquement actifs, mais ces entités n'ont pu être isolées à l'état individuel stable. Ces composés réactifs sont les précurseurs des proanthocyanidines oligomériques (Andersen et Markham, 2006).

5.2.2. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium (flavylium) porteur de 3 cycles aromatiques conjugués (figure 11) (Andersen et Markham, 2006). Ce sont des

pigments, très répandus dans les fleurs et les fruits. Dans la nature, ces pigments n'existent pas sous forme aglycone, mais sous forme d'hétérosides.

	R	R'
Pélagonidine	H	H
Cyanidine	OH	H
Péonidine	OCH ₃	H
Délphinidine	H	OH
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃
Malvidine	OH	OCH ₃

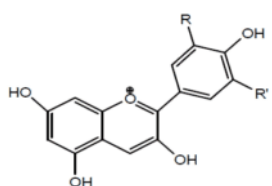


Figure 11: Structures chimiques des anthocyanes

5.3. Isoflavonoïdes

Ce sont des composés presque spécifiques de la famille des Fabacées. Cette spécificité est probablement due à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) au 3-phénylchromone (isoflavone). Ils peuvent être classés en une douzaine de catégories structurales: 3-arylcoumarines, coumaronochromones, coumestanes, isoflavanes, isoflavènes, isoflavones, roténoïdes, ptérocarpanes (figure 12). Ces catégories diffèrent entre elles, par le degré d'oxydation et l'existence ou non, d'hétérocycles supplémentaires (Andersen et Markham, 2006).

<i>Isoflavane</i>	<i>Isoflavones</i>	R ₅	R ₇	R ₄
	Génistéine	OH	OH	OH
	Génistine	OH	Oglc	OH
	Daïdzéine	H	OH	OH
	Daïdzine	H	Oglc	OH
	Biochanine A	OH	OH	OCH ₃
	Formononetine	H	OH	OCH ₃

Figure12: Structure de base des isoflavanes et des isoflavones

6. Quinones et émodoles

Les quinones sont des pigments naturels, la plupart sont jaunes pâles, rouges et bruns. Ces couleurs sont masquées par les autres pigments. On distingue 4 groupes (Harborne, 1998): Benzoquinones (arthropodes), Naphtoquinones (angiospermes), Quinones isopréniques (photosynthèse et respiration) et Anthraquinones. Ces derniers, les plus repondus sont colorés en orangé rouge et combinés à des sucres. Les émodoles sont des dérivés hydroxy-anthracéniques (figure13).

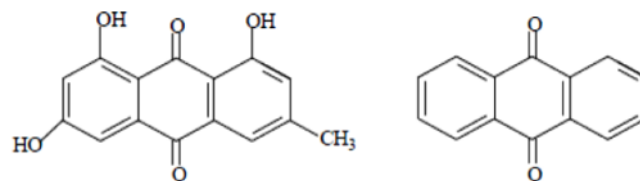


Figure 13: Structure de l'emodole et l'antraquinone

7. Tanins

Ils représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse car il n'y a pas de structure chimique de base. Ils sont des molécules de haut poids moléculaire, fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives. Les tanins sont divisés en deux groupes principaux d'après leurs structures et leurs propriétés, les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

7.1. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysés, essentiellement localisés dans les dicotylédones des angiospermes, sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre qui est très généralement le glucose et d'un nombre variable de molécules d'acide phénol qui est soit l'acide gallique dans le cas des *tanins galliques*, soit l'acide hexahydroxy diphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation dans le cas des *tanins éllagiques* (Harborne, 1998). Comme leur nom l'indique, ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.

7.2. Tanins condensés

Les tanins condensés ou proanthocyanidine, forment le groupe le plus important. Ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes (Paris et al., 1981). Ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines) (Vermerris et al., 2006) (figure 14).

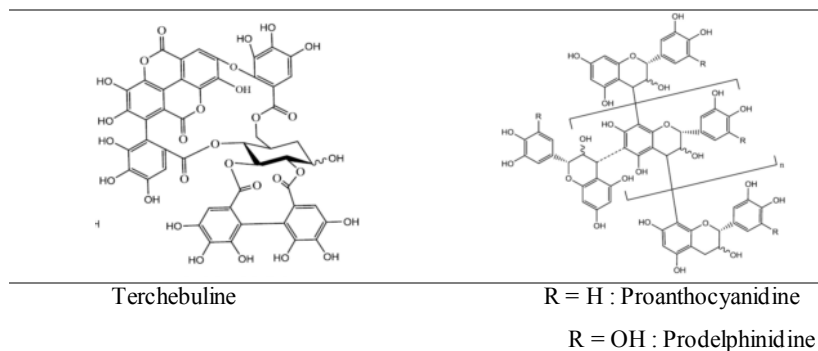


Figure 14: Structure de tannin hydrolysable et tannin condensé

III. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques constituent un groupe important de métabolites secondaires. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques, tyrosine et phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façons variables suivant les végétaux, à partir de la voie de l'acide shikimique (Macheix et al., 2005). La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont:

1. Voie de l'acide shikimique

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont respectivement produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques (C₆-C₁) formant les tanins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tanins condensés (Dewick, 1995). Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. Ce sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique.

2. Voie de l'acide malonique

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Richter, 1993) (figure 15).

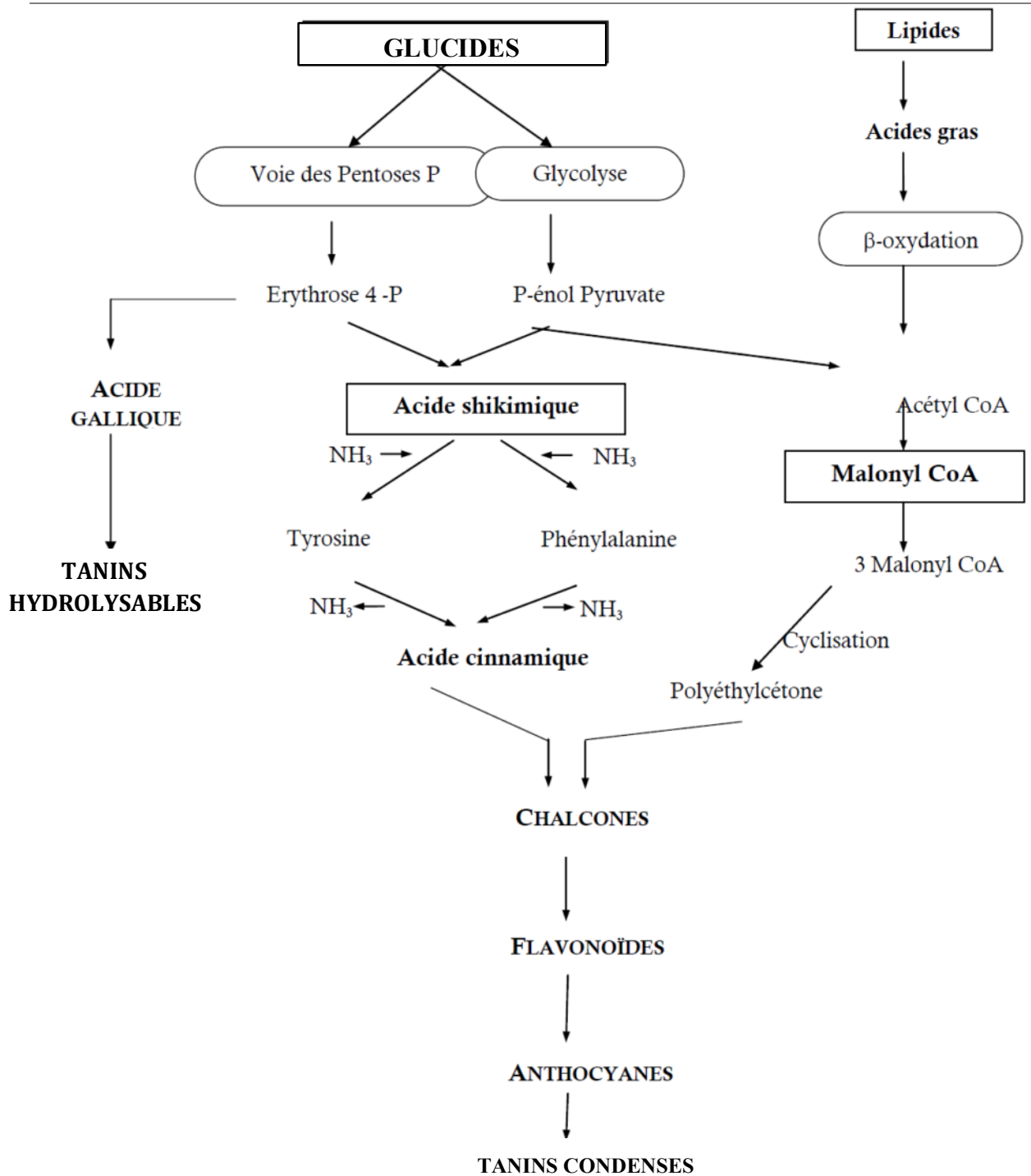


Figure 15 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols

IV. Rôle et intérêt des composés phénoliques

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et aussi vis-à-vis de leurs propriétés antioxydantes. Spécifiquement, on attribue aux flavonoïdes des propriétés variées : antibactériennes, antiradicalaires, anti-inflammatoires, antiestrogéniques, antispasmodiques, antiallergiques, antitumorales, hépatoprotectrices, estrogéniques, veinotoniques et analgésique. Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont consignés dans le tableau 1.

Tableau 1: Propriétés biologiques des quelques composés phénoliques dans l'organisme

C. phénoliques	Activités biologiques	Références
Acides phénols	Antiparasitaires, antifongiques, antioxydantes, antibactériennes, anti-ulcéreuses,	Flores et al., 2009; Kim et al., 2010
Coumarines	Analgésiques, anti-inflammatoires Protectrices vasculaires, antiparasitaires, antioedémateuses, anti-tumoral, Soins des hémorroïdes et des varices.	Ito et al., 2005; Smyth et al., 2009
Flavonoïdes	Antitumorales, anticarcinogènes, antiparasitaires, antivirales, antibactériennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergique, antithrombotique, antiatherogéniques, hypotenseurs, analgésiques, ostéogène, diurétiques,	Friedman et al., 2006; Cushnie et al., 2007; Batovska et al., 2009
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, antioxydant	Bruneton et al., 2009
Tanins condensés	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydantes, antitumorales, antifongiques, anti-inflammatoires	Masquelier et al., 1979; Zhou et al., 2011
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes, antimicrobiens, antiviraux, anti-inflammatoire, hypoglycémiants.	Okamura et al., 1993; Kubata et al., 2005
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques	kim et al., 2009

V. Oxydants et antioxydants

Certaines recherches scientifiques récentes ont mis en évidence l'existence des facteurs communs responsables aussi bien du vieillissement que de maladies liées au stress oxydant comme le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives (Parkinson et Alzheimer), et aussi certaines allergies et autres maladies chroniques. Ces diverses maladies auraient, entre autres, la même composante qui permet au bois de brûler, à l'huile de rancir, à l'aliment d'altérer ou au fer de rouiller. L'un des principaux acteurs de tout cela est l'oxydation de l'oxygène (Le Cren, 2004).

Quand la cellule utilise de l'oxygène, il se passe, un grand nombre de réactions d'oxydation. Le résultat est la production d'énergie, mais aussi de différents sous-produits appelés espèces réactives de l'oxygène « ERO » (Pokorny et al., 2001). L'organisme est équipé pour lutter contre ces ERO par un énorme système de défense constitué de système antioxydant enzymatique. Cependant, ce système de défense est parfois dépassé, surtout quand les agressions sont multipliées sous l'effet des radicaux libres endogènes et exogènes. C'est là où il y a des dégâts appelé « Stress oxydatif » (figure 16) (Le Cren, 2004). De ce fait, il fait appel aux plantes qui possèdent en plus un système non enzymatique de régénération comme l'acide ascorbique (vitamine C), les polyphénols ou les caroténoïdes, ce sont des composés antioxydants exclusivement végétaux.

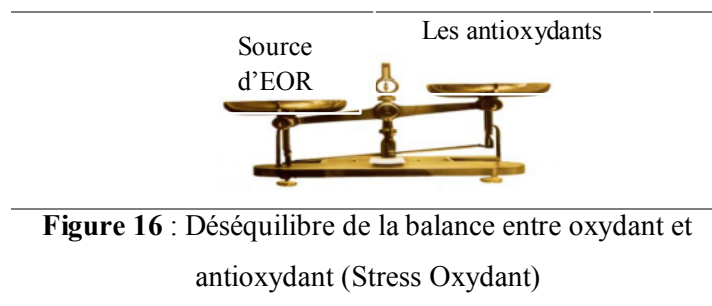


Figure 16 : Déséquilibre de la balance entre oxydant et antioxydant (Stress Oxydant)

1. Oxydants

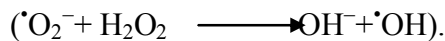
L'appellation «dérivés réactifs de l'oxygène» n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyl ($\cdot OH$), monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), etc, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est moins importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxydinitrite ($ONOO^{\cdot}$) (Novelli, 1997). Un radical libre est une entité chimique contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé, soit par l'acceptation d'un électron, soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule.

1.1 Classes des radicaux libres

1.1.1. Radicaux libres primaires

Les radicaux libres primaires (RL), sont directement formés à partir de l'oxygène. Les principaux RL sont représentés ci-dessous (Oldham et al., 1998; Le Cren, 2004):

- Ion superoxyde (O_2^-): Il est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus. Il est dangereux surtout par le fait qu'il participe à la formation du radical hydroxyle (OH). L'ion superoxyde est neutralisé par la SOD (superoxyde-dismutase) qui se trouve sous trois formes (Mn-SOD, Fe-SOD, Cu-SOD).
- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2): Il provient d'une réaction entre deux ions superoxyde (O_2^-). Il endommage les membranes cellulaires et est neutralisé par la GPX (glutathion peroxydase), le sélénium et la L-cystéine.
- Radical hydroxyle (OH): C'est un radical libre extrêmement réactif, formé dans les systèmes biologiques à partir d'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques comme le fer et le cuivre suivant la réaction de Haber Weiss.



Il est très puissant et attaque toutes les cibles cellulaires (acides nucléiques, acides gras et protéines) et crée des dégâts très importants. Le radical hydroxyle est neutralisé par la GPX (Glutathion Peroxydase), le sélénium, les vitamines B1 et B2 (Castro et Freeman, 2001).

- Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$): C'est une forme excitée de l'oxygène. Il est formé par action de rayonnement UV sur l'oxygène ou par les leucocytes ou encore au cours de la peroxydation lipidique.

1.1.2. Radicaux libres secondaires

Ils ne sont pas formés spontanément mais par l'action d'un RL sur une composante cellulaire (acides nucléiques, lipides membranaires, protéines). Par exemple, le radical peroxyde (R-OO) est formé après réaction de O_2^- ou OH sur un acide gras insaturé (peroxydation lipidique). Le radical superoxyde peut réagir aussi avec l'oxyde d'azote (NO), et produire le peroxynitrite (ONOO^-) qui peut inhiber la chaîne respiratoire et endommager différents composants mitochondriaux (Oldham et al., 1998).

1.2. Production des espèces réactives de l'oxygène

Les ERO ne sont pas uniquement produits en réponse à un stress, mais sont également produits naturellement par l'organisme au cours de processus biologiques comme la réponse

immunitaire et au cours de la respiration cellulaire (Marvin, 2005). On distingue deux types de production des radicaux libres :

1.2.1. Production endogène

Les ERO peuvent apparaître au cours de six types de réaction biochimique (figure 17) (Oldham et al., 1998):

- La respiration : Au niveau des mitochondries, au cours du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, le radical superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$) est produit.
- Les cellules phagocytaires, polynucléaires et macrophages, possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la fabrication du radical superoxyde, pour tuer les bactéries ou les virus.
- La xanthine oxydase est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP. Elle est impliquée dans la production du radical superoxyde.
- Les ions métalliques comme le fer et le cuivre, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaires. Ils transforment H_2O_2 en radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), encore plus toxique,
- Des radicaux libres sont produits au cours de la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes ainsi que durant le catabolisme de certains xénobiotiques.
- Des cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$) à partir de l'arginine et l'oxygène, dans une réaction catalysée par la NO-synthase. À forte concentration, le monoxyde d'azote réagit avec un radical superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$) pour former un puissant oxydant, le peroxynitrite (ONOO^-). En outre, le peroxynitrite peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants ($\text{NO}_2\cdot$, $\cdot\text{OH}$, etc.).

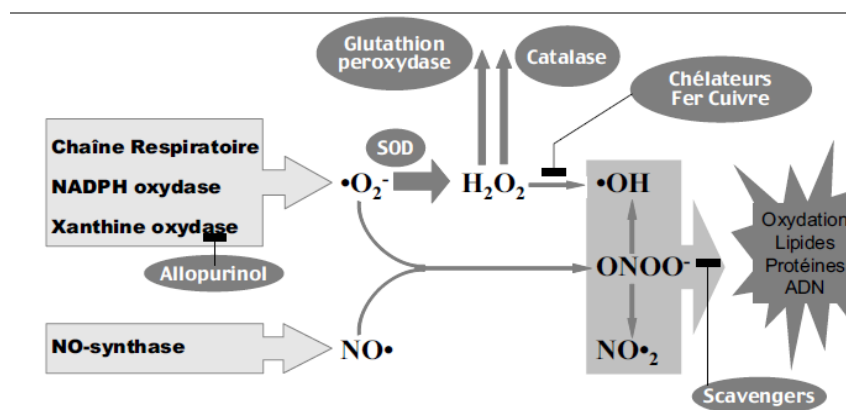


Figure 17: Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène.

1.2.2. Production exogène

Les ERO sont également générées sous l'effet d'oxydants environnementaux, tels que, le tabac, la pollution, le soleil, les rayons ultra-violet, les radiations ionisantes, un effort physique intense, le stress, une mauvaise alimentation, l'ingestion d'alcool, fibres d'amiante, pesticides, etc. (Afonso et al., 2007).

1.3. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques

Les radicaux libres attaquent différents endroits du corps, mais ils ont trois grandes cibles privilégiées :

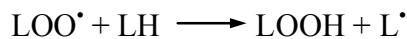
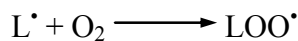
1.3.1. Lipides

Les peroxydations lipidiques vont altérer la structure des cellules animale ou végétale, et sont responsables de la dégradation organoleptique des aliments. Cette peroxydation lipidique se déroule en trois phases (Penfield, 1990):

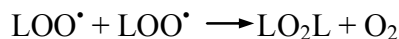
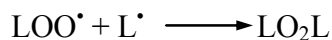
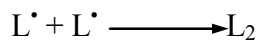
- *L'initiation* où se forme un premier radical libre «L•». L'arrachement du proton «H⁺» de la chaîne d'un acide gras «LH», qui est un composé radicalaire très réactif vis-à-vis de l'oxygène.



- *La propagation* où l'oxygène fixé donne un radical peroxyde «LOO•» qui réagit avec une autre molécule d'acide gras «LH» et conduit à un hydroperoxyde «LOOH» et un néo radical libre qui va à son tour s'oxyder.



- *La terminaison*, entraînée par la réaction de deux radicaux pour donner une espèce moléculaire ou par intervention d'un composé antioxydant, dit «briseur de chaîne».



1.3.2. Protéines

Les dommages oxydatifs induits sur les protéines par les radicaux libres peuvent conduire à des modifications structurales (fragmentation, modification des acides aminés) et fonctionnelles (perte d'activité enzymatique, altération du processus de protéolyse). Cette modification est un facteur de risque de plusieurs maladies liées au vieillissement telles que la maladie d'alzheimer (Inoue et al., 2006), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Gritz et al., 2006), la cataracte (Vinson, 2006) et la maladie de parkinson (Ahmad, 2006).

1.3.3. Acides nucléiques

Les modifications induites par des processus oxydatifs dans le matériel génétique appartiennent à quatre catégories, modifications des bases, cassures simples, doubles de la chaîne d'ADN et pontages avec des protéines. Ces lésions sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (léthalité cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) et aussi dans le vieillissement cellulaire (Hochberg et al., 2006).

2. Antioxydants

Les antioxydants peuvent être définis comme étant des substances qui, présentes à de faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat par la libération d'un ou plusieurs électrons. Certains antioxydants sont fabriqués par le corps comme les enzymes, d'autres proviennent de l'alimentation qui a une plus grande hétérogénéité comme les vitamines, les minéraux et les métabolites secondaires (les composés phénoliques). D'autres sont à la fois synthétisés en faible quantité par l'organisme et apportés par l'alimentation. C'est le cas par exemple de la cystéine et la Coenzyme Q10 (Pokorny et al., 2001). Il y a actuellement, un regain d'intérêt pour les composés phytochimiques comme sources d'antioxydants naturels. L'objectif est de les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques afin de remplacer les antioxydants de synthèse, qui sont la cause de risques potentiels pour la santé vu leurs effets carcinogènes ou mutagènes (Le Cren, 2004). De plus, ils sont moins bien absorbés par notre corps que ceux de sources naturelles. Ce qui est le cas par exemple de la vitamine E. Des études ont montré que la vitamine E de synthèse, bloque l'activité de cette vitamine naturelle au niveau cellulaire (Pelli et al., 2003).

2.1. Moyens de défense

2.1.1. Défenses endogènes (Les antioxydants primaires : la détoxification active)

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces pour l'élimination des radicaux libres primaires de façon permanente (Avissar et al., 1989).

2.1.2. Défenses exogènes (Les antioxydants secondaires : la détoxification passive)

Cette deuxième ligne de défense complémentaire, consiste en un ensemble de composés susceptibles de ralentir considérablement les effets des radicaux libres qui n'ont pas été piégés par les systèmes de défense précédents. Ce sont des molécules exogènes, c'est à dire qu'on ne les trouve pas spontanément dans l'organisme, mais qu'elles sont apportées par l'alimentation

comme par exemple les vitamines, les minéraux et les polyphénols. Le tableau (2) ci-dessous est récapitulatif des principales substances utilisées pour lutter contre toute forme d'oxydation (Pokorny et al., 2001; Le Cren, 2004).

Tableau 2: Principales substances antioxydantes (Pokorny et al., 2001; Le Cren, 2004)

Antioxydants primaires		Antioxydants secondaires naturelles		Antioxydants de synthèse
<i>Enzymes Cytosoliques</i>	<i>Vitamines</i>	<i>Minéraux</i>	<i>Phytochimiques</i>	
- GPX (Glutathion Peroxydase)	-Vit C	-Sélénium		-BHT (3,5-ditertobutyl-4-hydroxytoluène)
-GRD (Glutathion réductase)	-vit E (Tocophérols)	-Zinc		-BHA (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole)
-GRT (Glutathion ransférase)	-Vit Q (Ubiquinone)	-Manganèse	-Terpènes	-TBHQ (tertiobutylhydro-xyquinone)
-SOD (Superoxyde Dismutase)	-Vit A (Rétinol)	-Cuivre	-Polyphénols	-Trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique)
-Catalase	-Vit B5 (A. pantothénique)	-Magnésium		-Gallate de propyle (E310)
		-Anhydride sulfureux (SO ₂)		-Gallate d'octyle (E311)
				-Gallate de dodécyle (E312)

2.2. Avantages et inconvénients des antioxydants

Les avantages et les inconvénients des antioxydants naturels et synthétiques, couramment utilisés pour la protection des denrées alimentaires et pharmaceutiques, sont présentés dans le tableau 3 (Valenzuela et Nieto, 1996).

Tableau 3: Avantages et inconvénients des antioxydants (Valenzuela et Nieto, 1996)

Antioxydants synthétiques	Antioxydants naturels
Peu coûteux	Coûteux
Largement appliqué	limités
Moyenne à forte activité antioxydante	Moyenne à forte activité antioxydante
Substances toxiques	Perçus comme des substances inoffensives
Utilisation de certains d'entre eux interdit	Augmentation de l'utilisation
Faible solubilité dans l'eau	Large gamme de solubilité
Intérêt décroissant	Intérêt croissant
Certains d'entre eux stockés dans le tissu adipeux	Complètement métabolisé

3. Polyphénols comme antioxydants

Les polyphénols peuvent agir selon divers mécanismes d'activité antioxydante (Halliwell, 1994):

3.1. Inhibition enzymatique

Les polyphénols inhibent une grande variété d'enzymes. Cos et al. (1998) ont établi les relations entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité d'inhiber la formation du

superoxyde par inhibition de la xanthine oxydase (formation de complexes enzyme-inhibiteur). Les résultats de cette étude sont les suivants:

- Seulement les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols ne sont pas des inhibiteurs de la xanthine oxydase.
- L'absence du groupe hydroxyle en C₃ augmente légèrement l'activité inhibitrice.
- Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés. Par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine.
- Les flavonoïdes présentant un cycle B de type catéchol (*ortho*-diphénol ou 1,2-dihydroxybenzène) sont des bons piègeurs du superoxyde.

3.2. Chélation des ions métalliques

Les ions fer et cuivre sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant. Ainsi, les ions fer sont nécessaires pour la biosynthèse de la catalase, et ceux cuivrique pour la formation du superoxyde dismutase. Mais l'autoxydation en présence des ions Fe⁺² et Cu⁺² comme catalyseurs favorisent la production du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène. Divers polyphénols abondants dans les plantes et dans l'alimentation sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques (Hider et al., 2001). La complexation des ions métalliques par les polyphénols induit typiquement un déplacement bathochrome de leur bande d'absorption dans le domaine UV-Visible. Les études menées par Van Acker et al. (1996), sur la chélation des ions par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques qui sont les suivants (figure 18): (i) les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B, (ii) les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C, (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxy. Ainsi, la quercétine qui combine tous ces substituants est un complexant métallique particulièrement efficace.

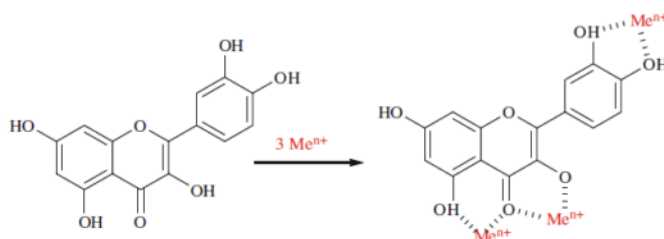
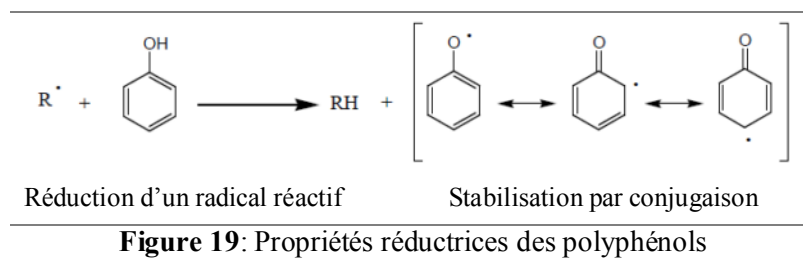


Figure 18: Sites de chélation de métal (Meⁿ⁺) pour les flavonoïdes

3.3. Piégeage des radicaux libres

Les antioxydants de type phénolique, réagissent selon le mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin par un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un intermédiaire radical stabilisé de par ses structures mésomères conjuguées (figure 19).



Plusieurs travaux ont établi des relations entre la structure chimique des polyphénols, notamment les flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (figure 20). Les critères sont les suivants : (i) la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol), (ii) la double liaison C₂-C₃ en conjugaison avec la fonction 4-oxo, (iii) la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C₂-C₃, (iv) un troisième OH sur le cycle renforce également le caractère antioxydant (ex: acide gallique), (v) l'effet de la glycosylation diminue l'activité des flavones et flavanones.

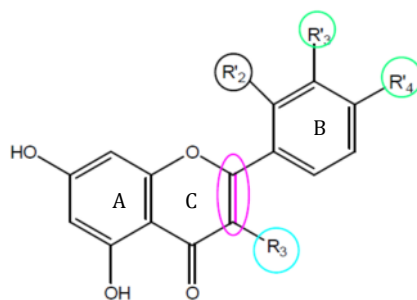


Figure 20: Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes

VI. Principaux groupes de composés phénoliques antimicrobiens

La recherche scientifique de nouveaux principes actifs, a déjà permis d'expliquer certaines utilisations traditionnelles des plantes. Ces travaux font ressortir une grande diversité de structures chimiques, ayant des activités antimicrobiennes potentielles, pour lutter contre le phénomène d'apparition de résistances à l'usage fréquent des antibiotiques (Daglia, 2012; Haddouchi et al., 2013).

1. Phénols simples et acides phénoliques

Les phénols simples et les acides phénoliques possèdent des activités antivirale, antibactérienne et antifongique (Daglia, 2012). L'acide caféique et le catéchol, contenus dans le thym, sont responsables des propriétés antimicrobiennes de cette plante. Leur mécanisme d'action n'est pas bien connu, mais, il pourrait inclure une inhibition enzymatique, probablement à travers une réaction avec les groupes sulfhydryles ou des interactions non-spécifiques avec les protéines. De plus, le nombre et la position des groupements hydroxyles sur le noyau aromatique pourraient être en relation avec leur toxicité relative sur les microorganismes (Cowan, 1999).

2. Flavonoïdes

Étant donné que les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes suite à une infection microbienne, il n'est donc pas surprenant qu'ils possèdent des propriétés antimicrobiennes (Cowan, 1999). La catéchine par exemple est douée de propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales (Friedman et al., 2006; Cushnie et al., 2007). Les flavanones et les chalcones ont montré une activité antimicrobienne (Batovska et al., 2009). Les flavonoïdes à caractère lipophile peuvent détruire les membranes microbiennes en augmentant la fluidité des lipides membranaires (Daglia, 2012).

Rajendra-Prasad et al. (2004), ont décrit la 4'-méthoxyflavone extraite de *Psoralea corylifolia* comme possédant des propriétés antidermatophytiques contre *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum gypseum* et *Epidermophyton floccum*. Leur activité est probablement due à leur capacité de se complexer aux protéines extracellulaires avec inhibition de la croissance microbienne.

3. Tanins

Les tanins possèdent une activité toxique contre les champignons filamenteux, les levures et les bactéries (Dixon et al., 2005; Engels et al., 2011). Ils exercent une activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie, en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des adhésines (Gescher et al., 2011).

4. Quinones

Les quinones sont ubiquitaires et possèdent généralement des propriétés antimicrobiennes. Leurs principales cibles dans la cellule microbienne sont les adhésines, les polypeptides et les

enzymes membranaires (Cowan, 1999). Aljabre et al. (2005) ont décrit le thymoquinone isolé de l'extrait de *Nigella sativa* comme responsable des propriétés antidermatophytiques de cette plante vis-à-vis de *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccum* et *Microsporum canis*. L'hypéricine, une anthraquinone isolée d'*Hypericum perforatum*, possède également des propriétés antifongiques (Cowan, 1999).

5. Coumarines

Des études ont montré que les coumarines exercent plusieurs activités antimicrobiennes et antifongiques. Elles inhibent la croissance de *Saccaromyces cerevisiae* et la germination des spores d'*Aspergillus niger*. Pour l'activité antibactérienne, on note qu'ils sont plus efficaces contre les Gram positifs (Cowan, 1999).

2^{ème} Partie: Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

1. Choix des plantes

Les plantes étudiées ont été choisies essentiellement sur la base de leur intérêt et leur fréquence d'emploi grâce à l'enquête ethnobotanique effectuée au cours de cette étude auprès des tradithérapeutes, des herboristes et des personnes utilisant ou vendant les plantes médicinales. Les plantes choisies sont *Echium pycnanthum* Pomel., *Prasium majus* L., *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*., et *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce

2. Collecte du matériel végétal

Ces plantes de différentes provenances ont été collectées dans leurs habitats naturels, durant les mois de Mars-Avril en 2012. Les parties des plantes étudiées et les stations de récoltes sont représentées dans le tableau 4 et la photo 5. L'identification botanique des espèces a été faite par M^{elle} Sekkal fatema zohra (Enseignante, Chercheur à l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem).

Le matériel végétal fraîchement collecté a été lavé à l'eau, séché à l'ombre pendant 2 à 3 semaines. Les parties de plantes ont été concassées séparément par un mortier traditionnel et pulvérisées ensuite au broyeur. Les poudres végétales ainsi récupérées, sont placées dans des sacs en papier, sur lesquels le nom et la partie de l'espèce sont mentionnés. Ces poudres vont être soumises à différentes extractions.

Tableau 4: Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations d'études

Plantes	stations	Période de récolte	Parties étudiée	Longitude	Latitude	Altitude (m)	Etage bioclimatique
<i>P. majus</i>	Nedroma (Tlemcen)	Mars 2012	- Parties aériennes*	1°45'46" O	34°58'6" N	650	Subhumide froid
<i>E. pycnanthum</i>	Naâma	Mars 2012	- Racines	0°19' 52" O	33°16'44" N	720	Semi-aride froid
<i>J. oxycedrus</i>	Térni (Tlemcen)	Avril 2012	- Aiguilles - Baies - Racines	1°22'1" O	34°46'58" N	806	Subhumide froid
<i>S. oleifolium</i>	Tamanrasset	Mars 2012	- Feuilles - Fleurs	5°31' 38" E	22°47'13" N	1378	Aride

Parties aériennes* : Tige, feuille et fleur. N: Nord, O: Ouest, E: Est

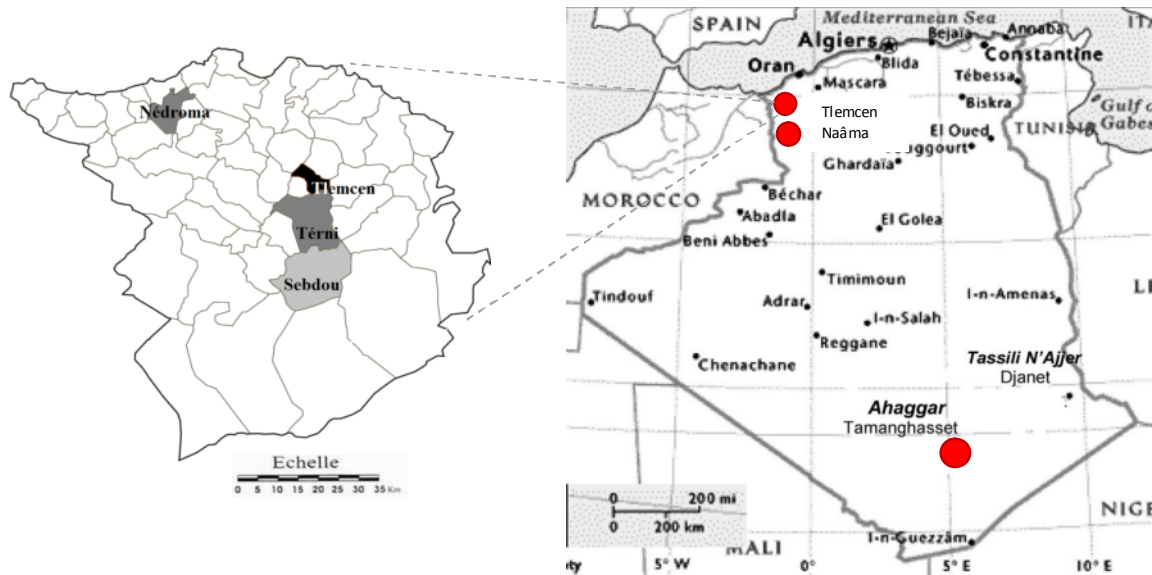


Photo 5: Situation géographique des stations de collecte (Hammiche et Maiza, 2006)

II. Les extractions

1. Préparation des extraits hydro-méthanoliques

Il existe différentes méthodes d'extraction qui sont particulièrement adaptées à l'extraction des composés naturels. Parmi celles-ci, la macération, technique simple et facile. Une quantité de 2 g de poudre végétale est mise à macérer dans 20 ml d'un mélange méthanol/eau à 80/20 (v/v), pendant 24 heures sous agitation. Après filtration, les solutions hydro-méthanoliques sont concentrées à sec sous pression réduite et à une température 60°C, puis conservées à 4°C (Harborne, 1998).

2. Extraction par des solvants organiques de polarité croissante

L'extraction au Soxhlet a été retenue comme technique d'extraction, car elle favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale (Romanik et al., 2007). L'extraction a été effectuée par épuisement successif du matériel végétal par un système soxhlet sous agitation continue durant 24 heures, en utilisant quatre solvants de polarité croissante: hexane (Hx), dichlorométhane (Dich), méthanol (M) et eau (aq) (Oueslati et al., 2012). La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale dont on dispose, c'est-à-dire, 200 ml de solvant pour 50 g de poudre. Après le passage de chaque solvant, les extraits sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif à la température appliquée à l'évaporation de chaque solvant. L'extrait aqueux est, pour sa part, lyophilisé grâce à un lyophilisateur de marque Thermo.

3. Calcul des rendements en extraits secs

On a déterminé le rendement (Rdt) des plantes en extrait sec en calculant le rapport suivant: $Rdt \% = [P_1 - P_2 / P_3] \times 100$

P₁: Poids du ballon après évaporation.

P₂: Poids du ballon vide.

P₃: Poids de la matière végétale sèche de départ.

Les extraits secs sont repris, soit dans quelques millilitres de méthanol pour les dosages et les évaluations de l'activité antioxydante, soit dans quelques millilitres de DMSO pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

III. Dosage des composés phénoliques

1. Polyphénols totaux

Le réactif utilisé est le Folin-Ciocalteu, qui est un mélange de complexes de l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 760 nm. Le dosage de Polyphénols totaux (PT) est effectué par la comparaison de la densité optique (D.O) observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (Vermerris *et al.*, 2006). Ce dosage est réalisé selon la méthode décrite par Dewanto *et al.* (2002).

Une prise de 125 µl d'extrait convenablement dilué est mise dans un tube en présence de 500 µl d'eau distillée et de 125 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après agitation vigoureuse et repos du mélange pendant 6 mn, 1250 µl d'une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7% sont ajoutés et le mélange est ajusté à 3 ml avec de l'eau distillée. Le tube est placé au repos pendant 90 mn à température ambiante et à l'obscurité, ensuite l'absorbance est mesurée à 760 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à des concentrations de 0 à 400 µg.ml⁻¹. Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG.g⁻¹ MS).

2. Flavonoïdes totaux

Les réactifs utilisés sont les solutions incolores de nitrite de sodium (NaNO₂) et de chlorure d'aluminium (AlCl₃). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs. Elle entraîne la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm. La

comparaison de la D.O observée par rapport à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes (Flv). La quantification des flavonoïdes est faite selon une méthode spectrophotométrique décrite par Dewanto et al. (2002).

Une prise de 250 µl d'extrait diluée est additionnée de 75 µl d'une solution de NaNO₂ à 7%. Après 6 mn d'incubation à température ambiante, 150 µl d'une solution fraîchement préparée d'AlCl₃ à 10% sont ajoutés au mélange. Après 5 mn de repos à température ambiante, 500 µl de soude (NaOH, 1M) sont apportés au mélange, le volume final est porté à 2500 µl avec de l'eau distillée. L'absorbance de cette préparation est mesurée à 510 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à des concentrations de 0 à 400 µg.ml⁻¹. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC.g⁻¹ MS).

3. Tanins condensés

En présence d'acide sulfurique, les tanins condensés se dépolymérisent et, par réaction avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurables par spectrophotométrie à 500 nm (Sun et al., 1998).

Une prise de 50 µl d'extrait convenablement dilué est ajoutée à 3 ml de vanilline à 4% et 1.5 ml d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄). Après homogénéisation. Le mélange est mis en incubation à température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance de cette préparation est mesurée à 500 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à des concentrations de 0 à 400 µg.ml⁻¹. Les teneurs en tanins condensés sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC.g⁻¹ MS).

IV. Estimation des activités biologiques

1. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faibles concentrations par rapport aux substrats oxydables, retardent ou stoppent le processus d'oxydation. La capacité antioxydante de 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*, des extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces

oxydantes, tels que des radicaux libres ou des 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, par transfert d'atome d'hydrogène ou par transfert d'électron. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des molécules, il est recommandé d'utiliser plusieurs tests pour confirmer une activité antioxydante (Prior et al., 2005). C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de neuf tests chimiques : la capacité antioxydante totale (CAT), le pouvoir réducteur du fer, le piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH[·]), le piégeage du radical l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS^{·+}), le piégeage du radical hydroxyle ([·]OH), le piégeage de l'anion superoxyde ([·]O₂⁻), le piégeage d'oxygène singulet (¹O₂), le blanchiment du β-carotène et le pouvoir chélateur des ions ferriques.

1.1. Capacité antioxydante totale

Ce test est basé sur la réduction du molybdène (Mo⁶⁺) en molybdène (Mo⁵⁺) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo⁵⁺ de couleur verte (Prieto et al., 1999).

Une prise de 0.1 ml d'extrait convenablement dilué est combinée dans un tube avec 1ml de solution composée d'acide sulfurique (0.6 N), de phosphate de sodium (Na₃PO₄, 28 mM) et de molybdate d'ammonium ((NH₄)₆ Mo₇O₂₄. 4H₂O, 4 mM). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 mn. Après un repos de 6 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait. Comme pour les polyphénols totaux, l'activité antioxydante totale est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG.g⁻¹ MS).

1.2. Piégeage du radical DPPH[·]

Le DPPH[·] est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. A température ambiante, le radical DPPH[·] présente, en solution alcoolique, une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons (figure 21). Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (Masuda et al., 1999).

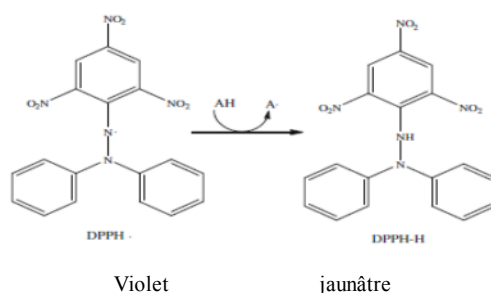


Figure 21: Forme réduite du radical DPPH

Pour la mesure de l'activité, une prise d'essai de 1 ml d'extrait à différentes concentrations est mise en présence de 250 μ l d'une solution de DPPH \cdot (0.2 mM, préparée dans le méthanol). Le mélange est placé pendant 30 mn à l'obscurité pour réagir et l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin négatif (sans extrait). L'antioxydant de synthèse utilisé est le BHT. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule :

$$PI = (D.O_{\text{témoin}} - D.O_{\text{extrait}} / D.O_{\text{témoin}}) \times 100$$

PI: pourcentage d'inhibition.

D.O_{témoin}: absorbance du témoin négatif.

D.O_{extrait}: absorbance de l'extrait.

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). Une faible valeur de CI₅₀ correspondant à une grande efficacité de l'extrait.

1.3. Pouvoir réducteur du fer

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydo-réduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ fournit des ions Ferriques (Fe³⁺) qui seront réduits en Ferreux (Fe²⁺) par les antioxydants présents dans l'extrait végétal. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986).

Cette méthode consiste à mélanger 1 ml de l'extrait à différentes concentrations avec 2,5 ml de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 2.5 ml d'une solution de K₃Fe(CN)₆ à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 minutes à 50°C, puis 2.5 ml d'acide trichloracétique (CCl₃COOH) à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange est centrifugé à 650 g pendant 10 mn à température ambiante et 2.5 ml du surnageant sont additionnés de 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de chlorure de fer (FeCl₃) à 0.1%. La lecture de l'absorbance se fait à

700 nm contre un blanc où l'extrait est remplacé par le tampon d'extraction. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace (CE_{50}), concentration de l'extrait correspondant à une absorbance égale à 0.5, obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire ou logarithmique. L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle des antioxydants de synthèse (témoins positifs), butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA) (figure 22).

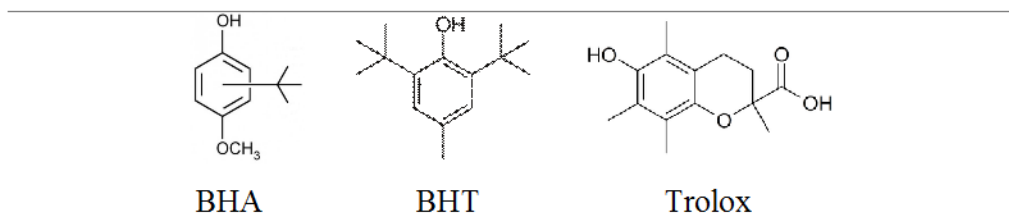


Figure 22: Structure de quelques antioxydants synthétiques (témoins positifs)

1.4. Piégeage du radical $ABTS^{\cdot+}$

Le radical $ABTS^{\cdot+}$ préformé est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium (Re et al., 1999). Cette formation se traduit par l'apparition d'une coloration vert bleu intense. En présence d'un donneur d'hydrogène (agent antioxydant), le passage du radical $ABTS^{\cdot+}$ à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée à une longueur d'onde de 734 nm.

Le radical $ABTS^{\cdot+}$ est produit par réaction entre une solution aqueuse d'ABTS (14 mM) et une solution de persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$, 4.9 mM), utilisé comme oxydant (figure 23). Ce mélange est agité pendant 16 h à l'obscurité puis dilué par l'éthanol jusqu'à obtenir une absorbance à 734 nm de 0.700 ± 0.02 . Une prise (950 μ l) de cette solution d' $ABTS^{\cdot+}$ est ensuite mélangée avec 50 μ l d'extrait à différentes concentrations. Après 6 mn d'incubation à température ambiante, l'absorbance du mélange est mesurée à 734 nm contre un blanc (témoin négatif) et comparée à celle des antioxydants de synthèse: BHT, BHA et TROLOX (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthyl-chroman-2-carboxylique). Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer cette activité antiradicalaire en CI_{50} comme décrit précédemment pour le DPPH \cdot (Re et al., 1999).

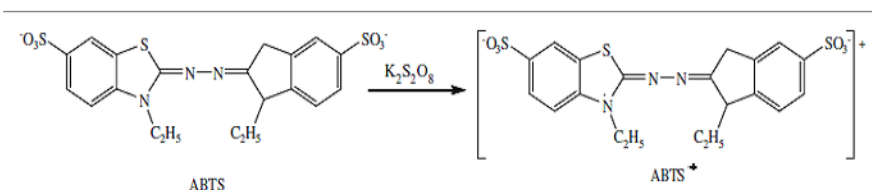


Figure 23: Génération de l' $ABTS^{\cdot+}$ par un oxydant

1.5. Inhibition de blanchiment du β -carotène

Dans ce test la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β -carotène (figure 24), par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Koleva (2002).

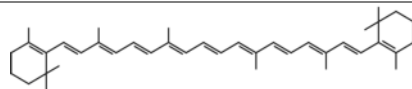


Figure 24: Structure du β -carotène

Une quantité de 2 mg de β -carotène est dissous dans 20 ml de chloroforme (CHCl_3), puis 4 ml de cette solution sont mises dans un ballon à fond plat avec 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 40. Après évaporation sous vide du chloroforme, le mélange est repris dans l'eau distillée aérée. Dans une microplaque à 96 puits, 150 μl de cette émulsion sont additionnés de 10 μl d'extrait végétal de concentration connue. Les microplaques sont alors mises en incubation à 50°C pendant 120 mn (pour catalysé l'oxydation de l'acide linoléique) et la D.O est mesurée (à $T = 0$ et $T = 120$ mn) à 470 nm grâce à un lecteur de microplaques. L'activité de l'extrait est calculée par rapport à celles du témoin négatif (sans extrait). Les résultats sont comparés à ceux des antioxydants de synthèse (BHT, BHA). Le pourcentage d'inhibition (PI) est obtenu comme suit :

$$\text{PI} = [(\text{D.O } E_{120} - \text{D.O } T_{120}) / (\text{D.O } T_0 - \text{D.O } T_{120})] \times 100$$

D.O E_{120} : absorbance de l'extrait à $T = 120$ mn

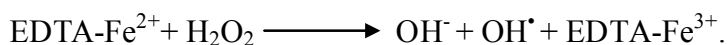
D.O T_{120} : absorbance du témoin négatif à $T = 120$ mn

D.O T_0 : absorbance du témoin négatif à $T = 0$ mn

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

1.6. Piégeage du radical hydroxyle

Ce test consiste à évaluer la capacité, de l'extrait de plante, à piéger les groupements hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) formés par la réaction de Fenton:



Les $\text{OH}\cdot$ générés, qui ne sont pas piégés, attaquent et dégradent le désoxyribose et les produits de dégradation sont révélés par l'acide thiobarbiturique. L'activité de piégeage des radicaux hydroxyles est étudiée en mesurant leurs capacités à prévenir la dégradation oxydative du désoxyribose, selon un test développé par Lopes et al. (1999).

Une prise d'essai de 25 μL d'extrait à différentes concentrations est mise en présence d'un mélange réactionnel contenant les réactifs suivants: 100 μL de sulfate ferreux ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

10 mM), 100 µL d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA, 10 mM), 500 µL de désoxyribose (C₅H₁₀O₄, 10 mM), 900 µL de solution tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) et 200 µL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 10 mM) à 37°C pendant 60 min. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de 2.8% d'acide trichloracétique (TCA) et de 1ml de 1% d'acide thiobarbutirique (TBA), suivi d'un chauffage dans un bain d'eau bouillante pendant 15 min. Après refroidissement de l'échantillon, l'absorbance est mesurée à 532 nm. Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer cette activité antiradicalaire en CI₅₀ comme décrit précédemment pour le DPPH[·]. Les résultats sont comparés à celui de BHT.

1.7. Piégeage de l'anion superoxyde

Le système PMS/NADH (Méthosulfate de Phénazine / Nicotinamide Adenine Dinucleotide) utilisé permet la formation, de l'anion superoxyde (O₂⁻). Ce dernier réduit le nitro-blue-tetrazolium (NBT) en Formazan qui absorbe à 560 nm. L'activité est basée sur la méthode décrite par Liu et al. (1997). Les extraits et les réactifs sont dissous dans un tampon phosphate de sodium à 45 mM (pH 7.4).

Les anions sont générés dans un mélange de 200 µl d'une solution de β-NADH à 0.677 mM, 200 µl d'une solution de NBT à 0.144 mM et 200 µl de l'extrait à différentes concentrations. La réaction est initiée par l'addition de 200 µl d'une solution de PMS à 60 µM au mélange réactionnel et après 5 min d'incubation à 25°C, l'absorbance est mesurée à 560 nm contre un blanc ne contenant pas de PMS. Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition de la formation du formazan et d'exprimer cette activité en CI₅₀ comme décrit précédemment pour le DPPH[·]. L'activité des extraits testés est comparée à celle de BHT.

1.8. Piégeage de l'oxygène singulet

L'oxygène singulet (¹O₂) est un état métastable de la molécule de dioxygène. Il se forme au cours de la réaction de l'eau oxygénée dans l'eau de javel par action des ions hypochlorite ClO⁻ sur le peroxyde : $H_2O_2 + ClO^- \rightarrow H_2O + Cl^- + {}^1O_2$

La capacité d'échantillons pour piéger l'oxygène singulet est mesurée comme décrit par Chandrasekara et Shahidi (2011). Pour la mesure de cette activité, les extraits et les réactifs sont dissous dans un tampon phosphate de sodium à 45 mM (pH 7.4).

On mélange 200 µl de l'extrait à différentes concentrations avec 200 µl d'une solution de DPN (N,N-diméthyl p-nitrosoaniline) à 0.2 mM, 100 µl d'histidine à 100 mM, 100 µl d'hypochlorite de sodium (NaOCl, 200 µM) et 250 µl de la solution tampon à 45 mM. La

réaction est initiée par addition de 100 µl de H₂O₂ à 200 mM. Après 40 mn d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 440 nm contre un blanc pour chaque échantillon, en remplaçant DPN, l'histidine et le NaOCl par une solution tampon. Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer cette activité en CI₅₀ comme décrit précédemment pour le DPPH[·]. L'activité est comparée à celle de BHT.

1.9. Pouvoir chélateur du fer

Pour évaluer le pouvoir chélateur d'un extrait donné, le composé stabilisant le plus utilisé est la ferrozine (figure 25) (Zhao et al., 2006). En effet, la ferrozine forme avec le fer libre, présent dans un milieu réactionnel, un complexe ferrozine-Fe²⁺ de couleur violette intense. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration connue en fer, renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité des extraits à chélater cet élément. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

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 minutes, 100 µl de ferrozine (5 mM) sont ajoutés, suivis de 2.75 ml d'eau distillée. Le mélange est laissé au repos pendant 10 minutes à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 562 nm contre un blanc (sans ferrozine). Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer cette activité en CI₅₀ comme décrit précédemment pour le DPPH[·]. Les résultats sont comparés à celui d'antioxydant de synthèse (EDTA).

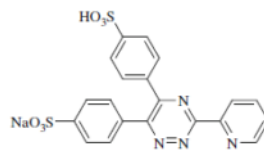


Figure 25: Structure chimique de la ferrozine

2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les différents extraits de plantes ont été testés sur un panel de micro-organismes comprenant des bactéries, des champignons et une levure (tableau 5).

Les souches ont été revifiées et la turbidité a été ajusté à 0.5 McFarland, ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml pour les bactéries (D.O = 0.08 à 0.1 / λ = 625nm), $1-5 \times 10^6$ UFC/ml pour la levure *C. albicans* (D.O = 0.12 à 0.15 / λ = 530 nm) (NCCLS, 2001) et 10^6 spores/ml (D.O = 0.09 à 0.17 / λ = 530 nm), pour les champignons filamenteux (Pfalter et al., 1998). Les

cultures ont été diluées avec bouillon Mueller-Hinton pour les bactéries, bouillon Sabouraud pour *C. albicans* et une solution saline stérile pour les souches fongiques, afin d'atteindre des densités optiques (D.O) correspondantes pour chaque test.

Tableau 5: Description et pouvoir pathogène des souches testées (bactéries, levure et champignons)

Type de microorganisme	Espèces	Références	Pouvoir pathogène
Bactéries <i>Bacille Gram –</i>	<i>Enterobacter cloacea</i>	ATCC 13047	Infection nosocomiale
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gastro-entérite et infection urinaire
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	Infections nosocomiale et pulmonaire
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Infection nosocomiale
	<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 13311	Fièvre paratyphoïde et toxi-infection alimentaire
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	Infections respiratoires, intestinales et urinaires
	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	Infections urinaires et de plaies
	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659	Infections urinaires et de plaies
<i>Bacille Gram +</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	listériose
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Infection alimentaire
<i>Cocci Gram +</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Intoxication alimentaire
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452	Infections nosocomiale et urinaire
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790	Infections fongiques (digestive et gynécologique)
Moisissures	<i>Cladosporium herbarum</i>	MNHN 3369	Infection fongique (peau et ongle)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	MNHN 963917	Parasite de plantes
	<i>Alternaria alternata</i>	MNHN 843390	Infection respiratoire, taches noires sur la plante
	<i>Aspergillus flavus</i>	MNHN 994294	Producteur d'aflatoxines B1
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MNHN 566	Aspergillose bronchopulmonaire et aspergillome.

ATCC: American Type Culture Collection. MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la détermination de l'activité antimicrobienne, *in vitro* : une méthode de diffusion de disque dans un milieu gélosé et la méthode de dilution (méthode de micro-dilution en bouillon pour les bactéries et *C. albicans*, la méthode de dilution en milieu gélosé pour les champignons). Les zones d'inhibition et les concentrations minimales inhibitrices (CMI), de la gentamicine et de l'amphotéricine B ont été également déterminées dans des expériences parallèles afin de contrôler la sensibilité des micro-organismes d'essai. Tous les tests ont été effectués en triple.

2.1. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en disque

Les extraits ont été testés pour leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en disques, selon le Comité national des normes du laboratoire Clinique (NCCLS, 2001) en utilisant 100 µl de suspension des microorganismes testés, contenant 2×10^8 UFC/ml pour les bactéries, $1-5 \times 10^6$ UFC/ml pour *C. albicans* et 2×10^5 spores/ml pour les souches fongiques. Les milieux Mueller-Hinton et Sabouraud gélosés, stériles et refroidi à 45-50°C, ont été versés dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre (15 ml). Les disques de papier

filtre (6 mm de diamètre), ont été individuellement imprégné avec 3 µl de l'extrait et ensuite placés sur la surface du milieu gélosé déjà inoculés avec les microorganismes testés. Les boîtes de pétri ont été conservées à 4°C pendant 2 h et ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 24 et 48 h pour *C. albicans* et les souches de champignons, respectivement. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) sont mesurés, y compris le diamètre des disques. La gentamicine (15 µg/disque) et l'amphotéricine B (20 µg/disque) ont servi de témoins positifs.

2.2. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour les bactéries et *C. albicans*, la méthode de micro-dilution en bouillon a été utilisée pour déterminer la CMI selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (NCCLS, 2001). Tous les tests ont été effectués dans le milieu Mueller Hinton en bouillon. Les extraits étudiés ont été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 1%. Des dilutions en série ont été préparées dans une microplaque de microtitration de 96 puits dans la gamme de concentration choisie. Les souches, dont la concentration finale a été ajusté à 5×10^5 UFC/ml pour les bactéries et à 2.5×10^6 UFC/ml pour *C. albicans*, sont ajoutées dans chaque puits. Les bactéries et *C. albicans* ont été incubées respectivement pendant 24 heures à 37°C et à 30°C. La CMI est définie comme la plus faible concentration de l'extrait à laquelle le micro-organisme ne démontre pas une croissance visible. La croissance des microorganismes a été indiquée par la turbidité.

Pour les champignons filamenteux, les CMI ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu gélosé (Soliman et Badaea, 2002). Les souches testées ont été cultivées dans l'agar de dextrose de pomme de terre (PDA), dans des boîtes de Pétri, pendant 5-7 jours. Les extraits testés, dissous dans du DMSO à 1%, ont été utilisés à différentes concentrations. Chaque concentration a été mélangée avec le milieu PDA semi-solide et stérile, ensuite versée dans des boîtes de Pétri stériles (15 ml dans chaque plaque). Un disque de 6 mm de diamètre de la gélose recouverte de mycélium est placé sur la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées pendant 5-7 jours à 28°C.

La gentamicine et l'amphotéricine B ont été utilisées comme des témoins positifs.

3. Test d'hémolyse

Préparation de la suspension érythrocytaire: Du sang fraîchement prélevé sur tube hépariné est centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec une solution de lavage glacée: chlorure de magnésium

(MgCl₂, 2 mM) et chlorure de sodium (NaCl, 150 mM), puis repris à nouveau dans le tampon phosphate de sodium salé (PBS) à 10 mM, pH 7.4.

Mesure de la fuite de l'hémoglobine : Les globules rouges sont suspendus dans le PBS à raison de 4000 cellules/ml (0.5 ml sont mis en contact avec 9.5 ml de PBS). La suspension érythrocytaire à 2% est incubée à 37°C pendant 90 min avec différentes concentrations des extraits testés. Des prélèvements de 0.5 ml sont réalisés chaque 15 min pour être repris dans 2.5 ml d'une solution de lavage glacée MgCl₂ (2 mM). Les tubes sont centrifugés à 4000 tours/min pendant 5 min. Le surnageant est utilisé pour suivre la fuite de l'hémoglobine intracellulaire par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 548 nm. Pour le contrôle positif, l'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec l'eau distillée à une concentration de 1% (V/V). Le tampon seul est utilisé comme contrôle négatif. Pour chaque échantillon le pourcentage de l'activité hémolytique maximale est déterminé par l'équation (Lee, 2002):

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = [(D.O_{\text{Extrait}} - D.O_{\text{Contrôle négatif}}) / D.O_{\text{Contrôle positif}}] \times 100$$

V. Analyse par CLHP Orbitrap-MSⁿ

L'analyse qualitative des composés phénoliques a été réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse (SM), système munie d'une pompe de distribution de solvant binaire (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) relié à un détecteur à barrette de diodes (PDA) et un spectromètre de masse hybride LTQ Orbitrap équipé d'une pression atmosphérique d'ionisation d'interface fonctionnant en mode électrospray (ESI), mode d'ions négatifs et positifs (Larbat et al., 2012).

Vingt microlitres d'extrait ont été séparés sur une colonne LiChroCART C18 (250 mm x 4.6 mm, Merck, Allemagne), avec un débit de 700 µl.min⁻¹. Les phases mobiles sont composées de 0.1% d'acide formique dans de l'eau ultra-pure (A) et 0.1% d'acide formique dans du méthanol ultra-pure (B). Les composés phénoliques sont éluées en utilisant un gradient d'élution, à l'aide d'une première étape isocratique à 1% de B pendant 2 min, puis un gradient linéaire de 1% à 50% de B pendant 50 min, et enfin un gradient linéaire allant de 50% à 90% de B pendant 60 min.

La détection est réalisée par un détecteur à barrette de diodes (200-800 nanomètre). Les aires de pics des extraits sont mesurées à la longueur d'onde de 280 nm. L'analyse par spectrométrie de masse est effectuée en deux modes d'ionisation, positif (ESI+), et négatif (ESI-), dans les conditions suivantes:

pour le mode ESI+: tension électrospray à 5 kV; sources de gaz fixées à 40 (le gaz de nébulisation), 10 (gaz d'auxiliaire) et 10 (gaz rideau) unités arbitraires min⁻¹; température du capillaire fixée à 300°C; tension du capillaire à 48 V; tensions de la lentille «tube lens» (138 V), de la lentille «split lens» (- 38 V) et de la lentille «front lens» (- 4.25 V).

Pour le mode ESI-: les conditions sont les mêmes sauf celles des paramètres optiques des ions qui ont été automatiquement adaptées comme suit: tension capillaire à - 48 V; tensions de la lentille «tube lens» (-138 V), de la lentille «split lens» (38V) et de la lentille «front lens» (4.25 V).

Les paramètres optiques ioniques ont été optimisés en mode ESI+ par un réglage automatique par l'utilisation d'une solution standard de rutine à 0.1 g.l⁻¹ infusée dans la phase mobile (A/B: 50/50) à un débit de 5 µl.min⁻¹.

L'analyse complète des spectres de spectrométrie de masse (SM) a été réalisée à haute résolution (R = 30000) sur un analyseur Orbitrap de 120 à 2000 *m/z* (rapport masse/charge) pour obtenir des masses exactes et des scans en MS² ont été automatiquement réalisés sur un analyseur LTQ (Linear Trap Quadripole) pour une étude structurale.

Les données sont traitées à l'aide du logiciel XCALIBUR[®] (version 2.1, <http://www.thermoscientific.com>). Les masses exactes expérimentales ont été comparées à des banques de données (Pubchem Compound: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, ReSpec: <http://spectra.psc.riken.jp/>, Mass Bank: <http://www.massbank.jp>) et de la littérature disponible afin d'identifier la nature des métabolites.

VI. Analyses statistiques

Les valeurs indiquées dans les tableaux sont des moyennes ± écarts-types des trois mesures parallèles. Les valeurs de CI₅₀ ont été calculées à partir des équations linéaires, logarithmiques ou projection directe sur les courbes. Plus la valeur de CI₅₀ ou de CE₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante de l'extrait testé 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

Chapitre 1.

Etude phytochimique, activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits hydro-méthanoliques de quatre plantes

Résumé : Dans le but de sélectionner l'espèce la plus prometteuse, la première partie de cette étude a été consacrée à la comparaison des contenus phénoliques de sept extraits hydro-méthanoliques de 4 plantes (Baies, aiguilles et écorces de racines de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, partie aérienne de *Prasium majus* L, racines d'*Ehium pycnanthum* Pomel, feuilles et fleurs de *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce.). Par la suite, l'investigation de leurs activités antioxydantes via plusieurs tests, *in vitro*, (capacité antioxydante totale, DPPH[·], ABTS⁺, β-carotène, pouvoir réducteur et celui chélateur du fer) et antimicrobiennes contre 12 souches bactériennes, une souche de levure et 5 souches de moisissures, ont été réalisées.

Les résultats ont montré que les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés varient respectivement de 2.59 ± 0.81 à 133.08 ± 4.1 mg EAG.g⁻¹ MS, de 3.4 ± 0.62 à 61.52 ± 3.1 mg EC.g⁻¹ MS et de 0.62 ± 0.07 à 26.43 ± 2.6 mg EC.g⁻¹MS. Les extraits les plus riches, sont ceux des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* et celui de la partie aérienne *P. majus*. En outre, les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante montrent que cette activité varie considérablement entre les différentes plantes. Les extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* ont présenté une activité la plus importante. La meilleure activité est obtenue en piégeant le radical DPPH[·], avec des valeurs de CI₅₀ de 2.9 µg.ml⁻¹ pour les écorces de racines et de 10.95 µg.ml⁻¹ pour les aiguilles. Elle est plus importante que celle de l'antioxydant de synthèse (BHT). En outre, des corrélations, entre les teneurs en flavonoïdes et les activités antioxydantes, ont été trouvées avec des coefficients de détermination significative ($R^2 \geq 0.56$), à l'exception du test au β-carotène et du pouvoir chélateur.

D'autre part, une activité antimicrobienne modérée a été constatée par la technique de diffusion des disques sur milieu solide. Les extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* sont les plus actifs contre quelques bactéries et *Candida albicans*. Cependant, tous les extraits sont inactifs contre les souches de moisissures.

De ce fait, les extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* sont les plus riches en composés phénoliques et les plus puissants comme antioxydant et antibactérien, d'où elles ont été sélectionnées pour une investigation plus poussée.

I. Introduction

L'extraction par macération est l'une des méthodes d'extraction les plus utilisées pour la détermination le contenu des plantes médicinales en métabolites secondaires. Pour cela, une fois finement broyée, la poudre des plantes collectées ont subi la même extraction par un mélange de méthanol/eau. Les extraits obtenus, ont été utilisés pour le dosage des composés phénoliques ainsi que pour l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes selon le protocole expérimental ci-dessous (figure 26).

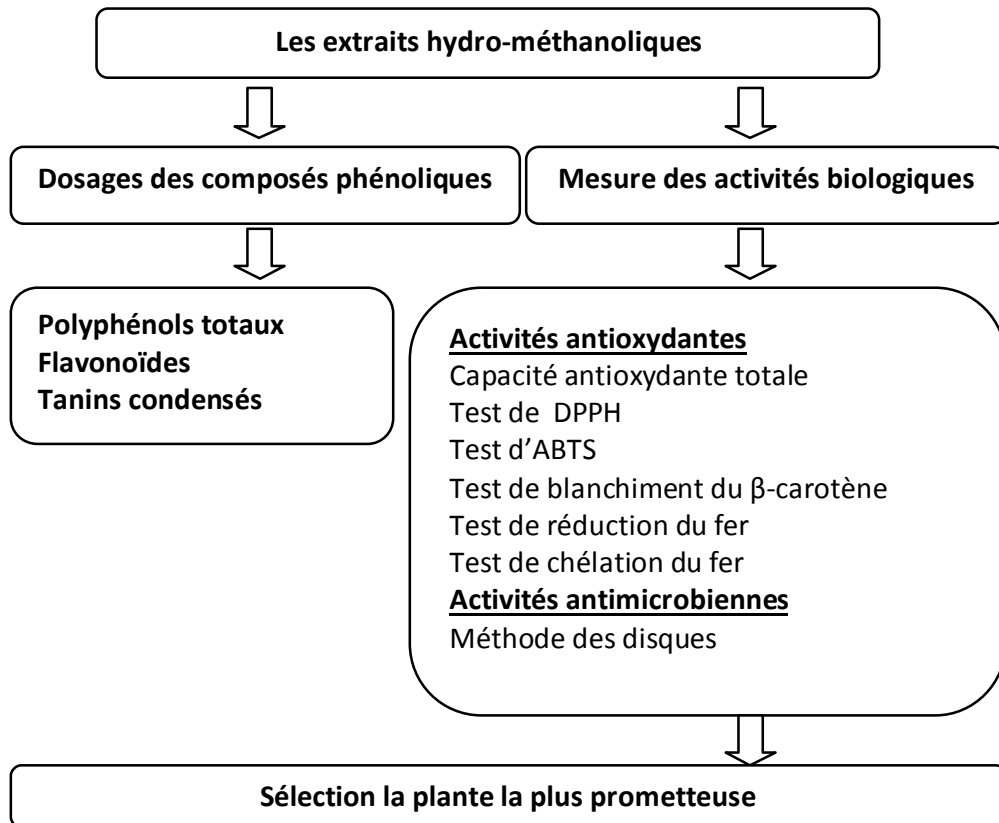


Figure 26: Etapes de la réalisation de l'étude phytochimique, activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits hydro-méthanoliques

II. Résultats

1. Rendements en extraits hydro-méthanoliques

La préparation des extraits hydro-méthanoliques des différentes plantes étudiées ont été réalisées en utilisant la méthode de macération. Les différents rendements obtenus, sont reportés dans le tableau 6.

Tableau 6: Rendements massiques des extraits hydro-méthanoliques

Espèces	Parties utilisées	Rdt(%)
<i>Juniperus oxycedrus</i>	Baies	15
	Aiguilles	16.66
	Ecorces de racines	5.74
<i>Prasium majus</i>	Parties aériennes *	21.89
<i>Ehium pycnanthum</i>	Racines	5.95
<i>Solenostemma oleifolium</i>	Feuilles	16.29
	Fleurs	15.24

* : tige, feuille et fleur

Les résultats obtenus, montrent que les rendements d'extraction varient de 5.74 à 21.89 %. Les rendements obtenus à partir des écorces de racines de *J. oxycedrus* et des racines d'*E. pycnanthum* sont les plus faibles, alors que celui obtenu à partir de la partie aérienne de *P. majus* est le plus élevé (21.89%).

2. Teneurs en composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules bioactives très recherchées car ils sont réputés pour leurs excellentes propriétés biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes, etc.). Pour ces raisons, des dosages des polyphénols totaux (PT), des flavonoïdes (Flv) et des tanins condensés (Tn), ont été effectués pour chaque extrait hydro-méthanolique préparé et ce par des méthodes spectrophotométriques, en utilisant les équations des régressions linéaires des courbes d'étalonnages.

2.1. Courbes d'étalonnages

Les courbes d'étalonnage sont élaborées par des solutions standards de l'acide gallique et de la catéchine préparées à des concentrations différentes.

2.1.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

Cette courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence. La formule de la régression linéaire de cette courbe est de $y = 0.00253 x + 0.01344$ avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0.9954 (figure 27).

Cette courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence. La formule de la régression linéaire de cette courbe est de $y = 0.00253x + 0.01344$ avec un coefficient de détermination ($R^2 = 0.9954$) (figure 27).

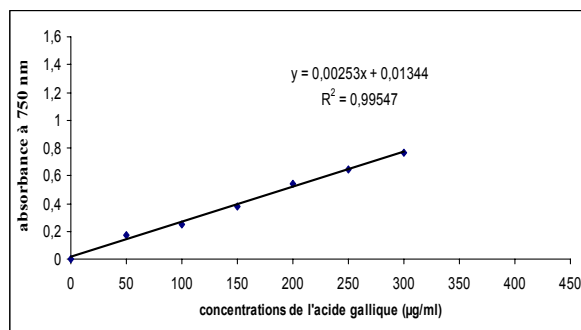


Figure 27: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

2.1.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la (+)-catéchine. La formule de la régression linéaire de cette courbe est de $y = 0.00355x + 0.09903$ avec un coefficient de détermination ($R^2 = 0.9870$) (figure 28).

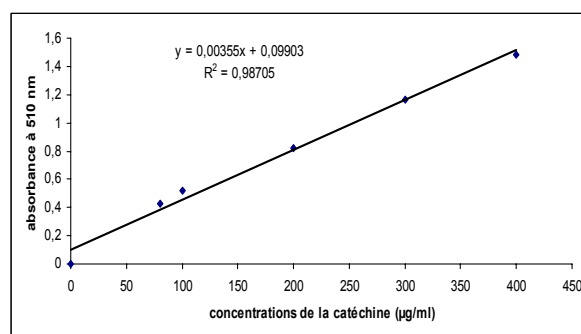


Figure 28: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux

2.1.3. Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés

La courbe est établie en utilisant la (+)-catéchine comme référence. La formule de la régression linéaire de cette courbe est de $y = 0.00076x + 0.0076$ avec un coefficient de détermination ($R^2 = 0.9948$) (figure 29).

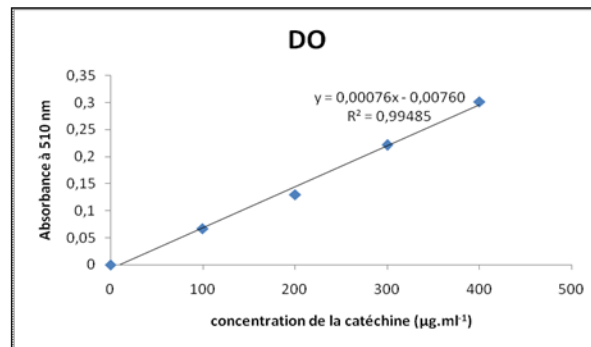


Figure 29: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

2.2. Analyses spectrophotométriques des extraits hydro-méthanoliques

Les extraits hydro-méthanoliques ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible, pour leur contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés. Par la suite, les D.O ont été exprimées à partir des courbes d'étalonnages (27, 28 et 29).

L'estimation des teneurs en polyphénols totaux a été réalisée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium. La vanilline a été utilisée pour quantifier les tanins condensés dans ces extraits. Les résultats du dosage sont représentés dans le tableau 7.

Tableau 7: Contenus en composés phénoliques des extraits hydro-méthanoliques des plantes

espèces	Parties utilisées	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Tanins condensés
		mg EAG.g ⁻¹ MS	mg EC.g ⁻¹ MS	mg EC.g ⁻¹ MS
<i>J. oxycedrus</i>	Baies	5.59 ± 0.81	3.4 ± 0.62	0.62 ± 0.07
	Aiguilles	133.08 ± 4.10	61.52 ± 3.10	26.43 ± 2.60
	Ecorces de racines	53.2 ± 2.20	39.72 ± 3.20	9.78 ± 1.30
<i>P. majus</i>	Parties aériennes	64.25 ± 0.30	31.56 ± 0.20	7.37 ± 0.20
<i>E. pycnanthum</i>	Racines	27.31 ± 2.10	16.26 ± 1.20	2.08 ± 0.20
<i>S. oleifolium</i>	Feuilles	31.37 ± 2.0	2.73 ± 0.15	3.98 ± 0.25
	Fleurs	38.78 ± 2.20	7.15 ± 1.20	3.33 ± 0.50

Les résultats montrent que les teneurs en ces composés varient considérablement entre les extraits des différentes parties des plantes. Concernant les teneurs en PPT, deux groupes peuvent être distingués: Le premier ayant des valeurs supérieures ou égales à 53 mg EAG.g⁻¹MS (c'est le cas des extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* et de *P. majus*), le deuxième groupe est celui des extraits des plantes ayant des valeurs

inférieures ou égales à 38.78 mg EAG.g⁻¹MS (c'est le cas des extraits des feuilles et des fleurs de *S. oleifolium*, des racines d'*E. pycnanthum* et des baies de *J. oxycedrus*).

En ce qui concerne les teneurs en flavonoïdes et en tanins condensés, les teneurs les plus élevées sont présentes dans les aiguilles (61.52 ± 3.1 mg CE.g⁻¹MS et 26.43 ± 2.6 mg CE.g⁻¹MS, respectivement) et les écorces de racine de *J. oxycedrus* (39.72 ± 3.2 mg CE.g⁻¹MS et 9.78 ± 1.3 mg CE.g⁻¹MS, respectivement). En outre, les faibles teneurs sont trouvées dans les baies de *J. oxycedrus*.

3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-méthanoliques

3.1. Détermination de l'activité antioxydante

A travers l'étude bibliographique, il apparaît clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser les potentialités antioxydantes en raison de la nature complexe de composés phytochimiques et de leurs interactions. L'utilisation de plusieurs tests d'évaluation des activités antioxydantes, est nécessaire. De ce fait, six méthodes pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits hydro-méthanoliques de différentes parties des plantes, ont été faites. Il s'agit de la capacité antioxydante totale, les tests DPPH[•] et ABTS^{•+}, le système de blanchiment du β-carotène, les pouvoirs réducteur et chélateur du fer.

3.1.1. Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits hydro-méthanoliques est exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG.g⁻¹MS), à partir d'une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'acide gallique comme référence ($y = 0.3072 \ln X - 0.7541$, $R^2 = 0.992$) (figure 30).

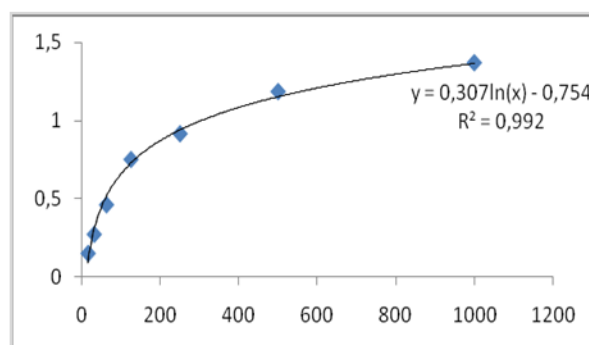
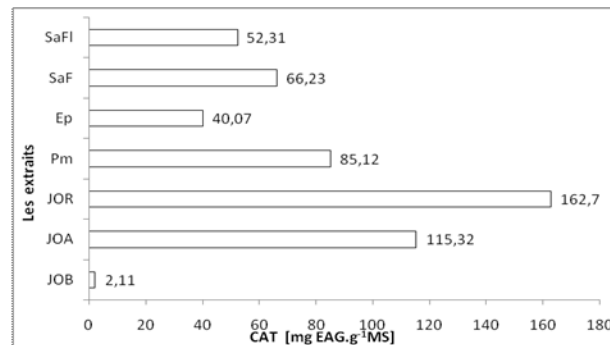


Figure 30: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la capacité antioxydante totale

Les résultats montrent une importante variabilité avec des valeurs comprises entre 2.11 ± 0.18 à 162.70 ± 6.6 mg EAG.g⁻¹MS (figure 31). L'extrait le plus actif est celui des écorces de racines de *J. oxycedrus* et le plus faible est celui des baies de *J. oxycedrus*. Le classement par ordre décroissant des extraits testés est le suivant : Ecorces de racines de *J. oxycedrus* > Aiguilles de *J. oxycedrus* > *P. majus* > Feuilles de *S. oleifolium* > Fleurs de *S. oleifolium* > Racines d'*E. pycnanthum* > Baies de *J. oxycedrus*. En outre, les 4 extraits les plus actifs sont ceux les plus riches en composés phénoliques.

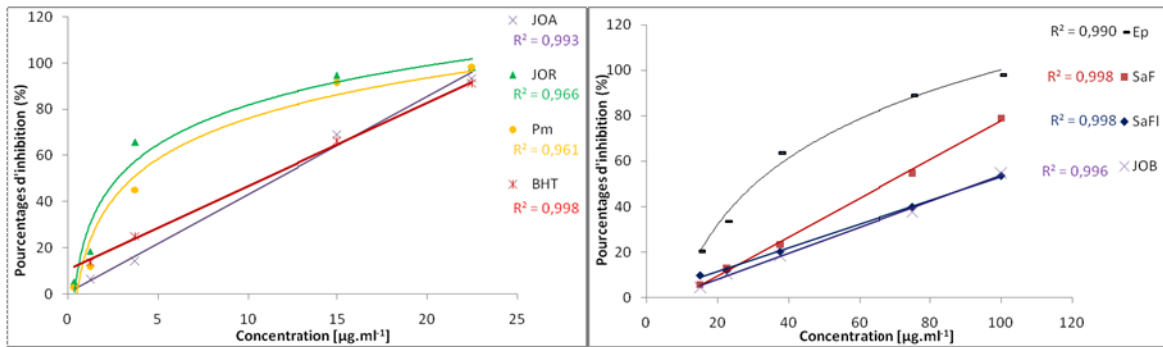


SaFl: fleurs de *Solenostemma oleifolium*, SaF: feuilles de *Solenostemma oleifolium*, Ep: *Ehitum pycnanthum*
Pm: *Prasium majus*, JOR: écorces de racines de *J. oxycedrus*, JOA: aiguilles de *J. oxycedrus*, JoB: baies de *J. oxycedrus*

Figure 31: Capacité antioxydante totale des extraits hydro-méthanoliques

3.1.2. Piégeage du radical DPPH

Ce test est déterminé par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH[·] à 517 nm, réduit par les extraits de plantes, pendant 30 min à l'obscurité. Par des dilutions en cascade des différents extraits à tester, ainsi que l'antioxydant de synthèse (BHT). Deux gammes de concentrations ont été faites: la première allant de 0.5 à 22 µg.ml⁻¹ (BHT, extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* et de *P. majus*) et la deuxième allant de 15 à 100 µg.ml⁻¹ (extraits des baies de *J. oxycedrus*, des racines d'*E. pycnanthum* et des feuilles et des fleurs de *S. oleifolium*). Les résultats, montrant une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits, ont permis l'obtention des courbes linéaires et logarithmiques avec un R^2 compris entre 0.96 et 0.99 (figure 32).

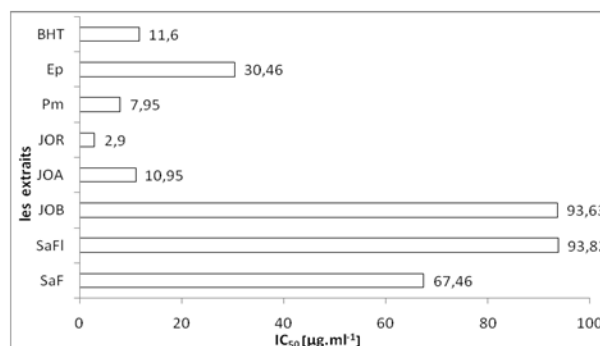


JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*, Pm: *Prasium majus*, Ep: *Ehium pycnanthum*, SaF: feuilles de *Solenostemma oleifolium*, SaFl: fleurs de *Solenostemma oleifolium*, JoB: baies de *J. oxycedrus*

Figure 32: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH[·] en fonction des différentes concentrations des extraits hydro-méthanoliques et du BHT

A une concentration de 15 µg.ml⁻¹, les extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus*, de *P. majus* et le BHT révèlent une activité importante avec plus de 70% d'inhibition du DPPH[·]. A cette concentration, les extraits des feuilles et des fleurs de *S. oleifolium*, des racines d'*E. pycnanthum* et des baies de *J. oxycedrus* montrent une faible activité qui ne dépassent pas les 20% d'inhibition.

La capacité antioxydante des différents extraits a été exprimée, aussi par la détermination des CI₅₀ (µg.ml⁻¹). Les valeurs sont représentées dans la figure 33. A partir des valeurs de CI₅₀, on constate que les extraits hydro-méthanoliques des aiguilles (10.95 µg.ml⁻¹) et des écorces de racines (2.9 µg.ml⁻¹) de *J. oxycedrus* et à moindre degré ceux de *P. majus* (7.95 µg.ml⁻¹) sont les plus puissants, même par comparaison à l'antioxydant de synthèse (BHT = 11.6 µg.ml⁻¹). Cependant, les extraits des feuilles et des fleurs de *S. oleifolium*, des racines d'*E. pycnanthum* et des baies de *J. oxycedrus* ont des valeurs de CI₅₀ supérieures à 30 µg.ml⁻¹.

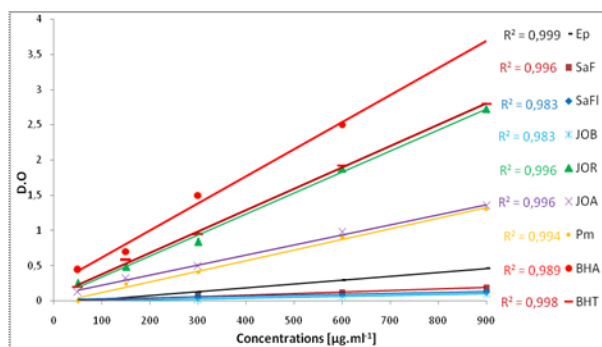


Ep: *Ehium pycnanthum*, Pm: *Prasium majus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*, JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JoB: baies de *J. oxycedrus*, SaFl: fleurs de *Solenostemma oleifolium*, SaF: feuilles de *Solenostemma oleifolium*

Figure 33: Valeurs de CI₅₀ des extraits hydro-méthanoliques et du BHT par la méthode du piégeage du radical libre DPPH[·]

3.1.3. Pouvoir réducteur du fer

Ce pouvoir se traduit par la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , en présence d'antioxydants dans l'échantillon testé. La quantité de Fe^{2+} est suivie par la mesure de l'absorbance à 700 nm. Par des dilutions en cascade des différents extraits à tester, ainsi que des antioxydants de synthèse (BHT et BHA), une gamme de concentrations allant de 50 à 900 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a été réalisée. Les valeurs des D.O ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires avec R^2 entre 0.98 et 0.99 (figure 34).

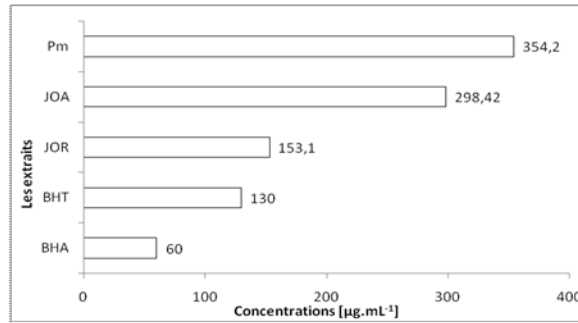


Ep: *Ehium pycnanthum*, SaF: feuilles de *Solenostemma oleifolium*, SaFl: fleurs de *Solenostemma oleifolium*
 JoB: baies de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*, JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, Pm: *Prasium majus*

Figure 34: Pouvoirs réducteurs des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse

A une concentration de 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, les D.O des extraits varient entre 0.069 à 1.92. Les extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus*, de *P. majus* et les antioxydants de synthèse révèlent une activité importante ($\text{D.O} \geq 0.9$).

La capacité antioxydante des différents extraits est exprimée par la détermination de la concentration efficace (CE_{50}) qui correspond à une absorbance égale à 0.5. Les valeurs sont représentées dans la figure 35. D'après ces résultats, on déduit que les extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* et ceux de *P. majus* ont des valeurs respectives des CE_{50} de 153.1, 298.42 et 354.2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Toutefois, les valeurs de CE_{50} des antioxydants de synthèse, BHT et BHA ($\text{CE}_{50} = 130$ et 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivement), sont inférieures à celles des extraits hydro-méthanoliques, indiquant une meilleure activité. On peut donc classer la puissance de la réduction du fer par les différents extraits, comme suit : BHA > BHT > Ecorces de racines de *J. oxycedrus* > Aiguilles de *J. oxycedrus* > *P. majus*.



Pm: *Prastum majus*, JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*,

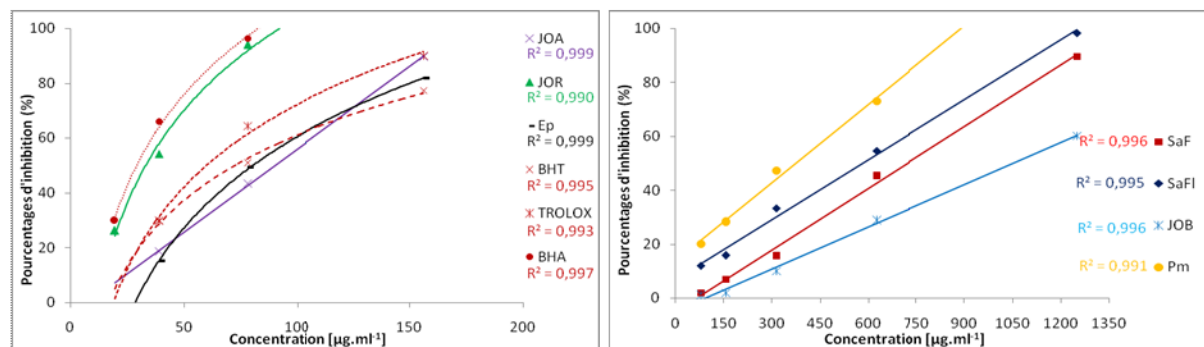
Figure 35: pouvoir réducteur exprimé par les valeurs de CE₅₀ des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse

3.1.4. Piégeage du radical ABTS^{•+}

L'ABTS^{•+} est un autre radical plus réactif que le DPPH[•]. Les réactions avec les radicaux DPPH[•], impliquent le transfert d'atomes d'hydrogène, cependant, les réactions avec les radicaux ABTS^{•+} impliquent à la fois transfert d'atomes d'hydrogène et d'électron. L'ABTS^{•+} a des avantages d'être plus polyvalent que le DPPH[•], parce qu'il est soluble dans l'eau et les solvants organiques, ce qui permet l'évaluation de l'activité de piégeage pour les échantillons hydrophiles et lipophiles (Gülçin, 2012).

Par des dilutions en cascade des différents extraits à tester, ainsi que des antioxydants de synthèse (BHT, BHA et Trolox), deux gammes de concentrations différentes ont été optés: la première allant de 20 à 160 µg.mL⁻¹, pour les antioxydants de synthèse et les extraits hydro-méthanoliques des écorces de racines et des aiguilles de *J. oxycedrus* et d'*E. pycnanthum*, la deuxième allant de 80 à 1250 µg.mL⁻¹, pour les extraits hydro-méthanoliques des feuilles et des fleurs de *S. oleifolium*, de *P. majus* et des baies de *J. oxycedrus*.

Pour chaque concentration, on mesure les densités optiques à 734 nm. Les valeurs obtenues des D.O ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires et logarithmiques avec un R² égal à 0.99 (figure 36).

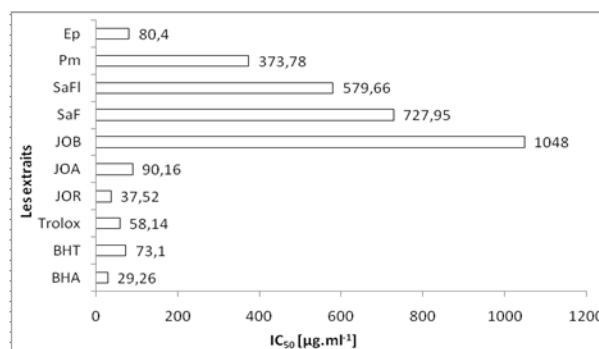


JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*, Ep: *Ehitum pycnanthum*
SaF: feuilles de *Solenostemma oleifolium*, SaFl: fleurs de *Solenostemma oleifolium*, JoB: baies de *J. oxycedrus*, Pm: *Prastum majus*

Figure 36: Pourcentages d'inhibition du radical ABTS^{•+} en fonction des différentes concentrations des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse

A une concentration de $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, l'extrait hydro-méthanolique des écorces de racines de *J. oxycedrus* et le BHA révèlent une activité intéressante avec une inhibition de plus de 95% de l'ABTS^{•+}, alors que, les extraits des aiguilles de *J. oxycedrus*, des racines d'*E. pycnanthum*, le BHT et le Trolox dépassent les 80% à une concentration de $160 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. A une concentration plus élevée de $1200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, les extraits de *P. majus*, des feuilles et des fleurs de *S. oleifolium* révèlent une activité qui dépasse les 90% d'inhibition de l'ABTS^{•+}. A cette même concentration, les baies de *J. oxycedrus* montrent une faible activité qui ne dépasse pas les 60%.

En outre, pour chaque extrait, les valeurs de CI_{50} sont représentées dans la figure 37. Les résultats montrent que la réduction de 50% de l'ABTS^{•+} a été atteinte pour tous les extraits testés. La figure 37 montre que l'extrait des écorces de racines de *J. oxycedrus* est le plus puissant avec une valeur de CI_{50} de $37.52 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Il est plus actif que les antioxydants de synthèse : le BHT et le Trolox ($\text{CI}_{50} = 73.1$ et $58.14 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivement). Son activité est proche de celle du BHA, le témoin le plus puissant ($\text{CI}_{50} = 29.26 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Les extraits des racines d'*E. pycnanthum* ($80.4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) et des aiguilles de *J. oxycedrus* ($90.16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sont comparables avec le BHT.



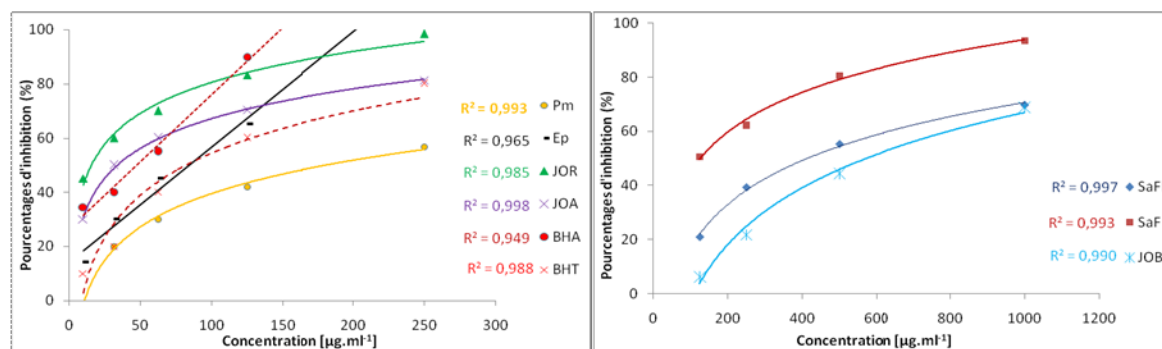
Ep: *Ehium pycnanthum*, Pm: *Prasium majus*, SaFl: fleurs de *Solenostemma oleifolium*, SaF: feuilles de *Solenostemma oleifolium*, JoB: baies de *J. oxycedrus*
JOA: aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR: écorces de racines de *J. oxycedrus*

Figure 37: Valeurs de CI_{50} des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse par la méthode de piégeage du radical ABTS^{•+}

3.1.5. Inhibition de blanchiment du β -carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaquent les onze doubles liaisons du β -carotène, ce qui entraîne une décoloration de ce dernier mesuré spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène (Kubola et al., 2008).

Par des dilutions en cascade des différents extraits à tester, ainsi que l'antioxydant de synthèse (BHA), deux gammes de concentrations ont été faites : la première allant de 10 à 250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, pour le BHA, les extraits hydro-méthanoliques des écorces de racines et des aiguilles de *J. oxycedrus*, de *P. majus* et d'*E. pycnanthum*, la deuxième allant de 125 à 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, pour les extraits hydro-méthanoliques des feuilles et des fleurs de *S. oleifolium* et des baies de *J. oxycedrus*. Les résultats représentés dans la figure 38, montrent que les pourcentages d'inhibition de l'oxydation du β -carotène, sont proportionnels aux concentrations des extraits. Ces résultats ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires et logarithmiques (R^2 compris entre 0.98 et 0.99).

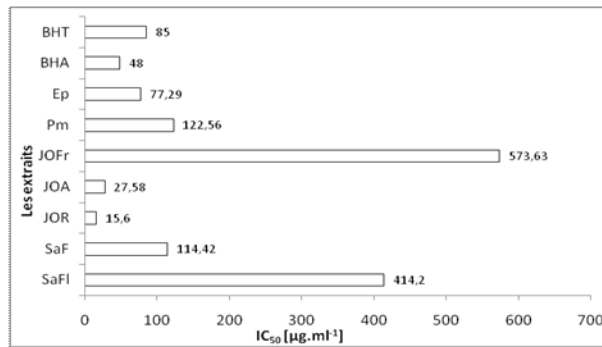


Pm: *Prasium majus*, Ep: *Ethium pycnanthum*, JOR: écorces de racines de *J. oxycedrus*, JOA: aiguilles de *J. oxycedrus*, SaFl: fleurs de *Solenostemma oleifolium*, SaF: feuilles de *Solenostemma oleifolium*, JoB: baies de *J. oxycedrus*

Figure 38 : Pourcentages d'inhibition de blanchiment du β -carotène en fonction des différentes concentrations des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse

A une concentration de 60 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, les extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* révèlent une activité élevée, avec des pourcentages d'inhibition qui dépassent les 65%, suivis par les antioxydants de synthèse et l'extrait des racines d'*E. pycnanthum* avec des pourcentages supérieurs à 40%. Les autres extraits montrent une faible activité à la même concentration.

Les valeurs de CI_{50} , exprimées en $\mu\text{g.ml}^{-1}$, des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse, sont représentées dans la figure 39. De ces résultats, on déduit que les valeurs de CI_{50} ont été atteintes pour tous les extraits testés. Les extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* sont les plus puissants avec des valeurs respectives de CI_{50} de 27.58 et 15.6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Cependant, la comparaison avec les antioxydants de synthèse montre que ces extraits ont un pouvoir antioxydant puissant par rapport à celui du BHA et du BHT (48 et 85 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Les autres extraits ont une faible activité avec des valeurs de CI_{50} supérieures à 77.29 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.



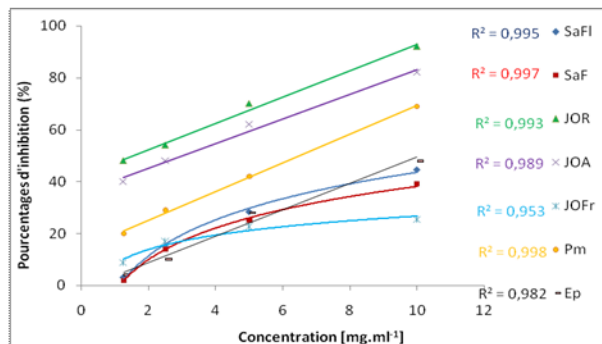
Ep: *Ehium pycnanthum*, Pm: *Prasium majus*, JoFr: baies de *J. oxycedrus*, JOA: aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR: écorces de racines de *J. oxycedrus*, SaF: feuilles de *Solenostemma oleifolium*, SaFI: fleurs de *Solenostemma oleifolium*

Figure 39: Valeurs de IC_{50} des extraits hydro-méthanoliques et des antioxydants de synthèse par la méthode de blanchiment du β -carotène

3.1.6. Pouvoir chélateur du fer

Les métaux de transition peuvent générer des radicaux hydroxyles et superoxydes et conduire à la peroxydation des lipides, la modification de la protéine et de lésions de l'ADN. Les agents chélateurs peuvent inactiver ces ions métalliques et potentiellement inhiber ces processus.

Par des dilutions en cascade des différents extraits à tester, ainsi que l'antioxydant de synthèse (EDTA), on a opté pour une gamme de concentrations allant de 1.25 à 10 mg.ml⁻¹. Les valeurs des pourcentages d'inhibition obtenues montrent une augmentation proportionnelle du pouvoir chélateur en fonction des concentrations des extraits. Ces pourcentages ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires et logarithmiques avec R^2 qui dépasse 0.95 (figure 40).



SaFI: fleurs de *Solenostemma oleifolium*, SaF: feuilles de *Solenostemma oleifolium*, JOR: écorces de racines de *J. oxycedrus*, JOA: aiguilles de *J. oxycedrus*, JoFr: baies de *J. oxycedrus*, Pm: *Prasium majus*, Ep: *Ehium pycnanthum*

Figure 40: Pourcentages d'inhibition du pouvoir chélateur en fonction des différentes concentrations des extraits hydro-méthanoliques

A une concentration de 2.5 mg.ml⁻¹, les extraits hydro-méthanoliques des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* ont des pourcentages d'inhibition qui dépassent les 48%. Les autres extraits ne dépassent pas les 20% d'inhibition à cette même concentration.

Les valeurs de CI_{50} des extraits hydro-méthanoliques sont représentées dans la figure 41. Pour les extraits hydro-méthanoliques des feuilles et des fleurs de *S. oleifolium*, des baies de *J. oxycedrus* et des racines d'*E. pycnanthum*, les valeurs de CI_{50} ne sont pas atteintes. Les extraits hydro-méthanoliques des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* ont une capacité importante à chélater les ions ferriques ($CI_{50} = 1.52$ et 2.99 $mg.ml^{-1}$, respectivement), par rapport aux autres extraits, suivi par l'extrait de *P. marus* ($CI_{50} = 6.5$ $mg.ml^{-1}$). En outre, les extraits hydro-méthanoliques sont moins efficace que l'antioxydant de synthèse, l'EDTA ($CI_{50} = 0.00465$ $mg.ml^{-1}$).

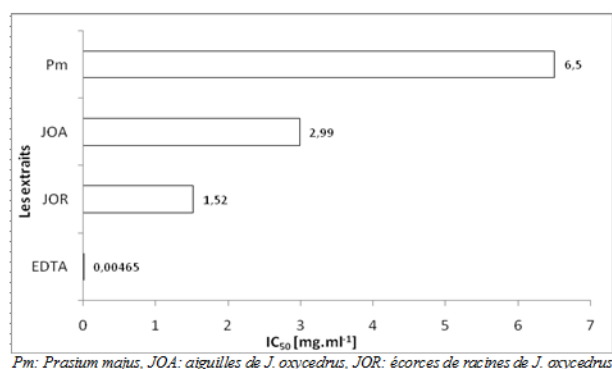


Figure 41: Valeurs de CI_{50} des extraits hydro-méthanoliques et d'EDTA par la méthode du pouvoir chélateur

3.2. Influence des teneurs en composés phénoliques sur les activités antioxydantes des différents extraits

L'étude de cette influence a été réalisée par une régression linéaire (R^2). Le tableau 8 résume les coefficients de corrélation.

Tableau 8: Corrélations linéaires entre les tests antioxydants et les teneurs en composés phénoliques des extraits hydro-méthanoliques

R^2	CAT	DPPH'	P. réducteur	ABTS ^{•+}	β -carotène	P. chélateur
PT	0.41	0.41	0.46	0.37	0.35	0.01
Flv	0.58	0.68	0.74	0.56	0.42	0.35
Tn	0.41	0.35	0.39	0.30	0.31	0.12

La capacité antioxydante des extraits semble être influencée par la teneur en flavonoïdes. Ces derniers ont montré des coefficients élevés (R^2 compris entre 0.56 et 0.74, $p \leq 0.05$) avec les tests suivants : CAT, DPPH', ABTS^{•+} et le pouvoir réducteur. Concernant les tests, de blanchiment du β -carotène et le pouvoir chélateur, les corrélations avec les teneurs en flavonoïdes sont plus faibles et non significatives, avec des R^2 de 0.42 ($p \geq 0.05$) et 0.35 ($p \geq 0.05$), respectivement. En outre, des corrélations faibles et non significatives existent entre les

différents tests antioxydants et les deux autres fractions phénoliques comme les teneurs en polyphénols et en tanins (R^2 compris entre 0.3 et 0.46, $p \leq 0.05$).

4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits hydro-méthanoliques

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. Cette situation a poussé les scientifiques à la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes provenant de diverses sources, comme les plantes médicinales, qui sont des bonnes sources de nouveaux agents antimicrobiens.

L'étude de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu solide (Mueller Hinton), qui est une technique qualitative basée sur la mesure de diamètre de la zone d'inhibition, en millimètre (mm), qui apparaît autour du disque imprégné d'extrait de plante. A cet effet, on a comparé, à la même concentration ($100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), la capacité des extraits hydro-méthanoliques à inhiber la croissance des micro-organismes.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions des extraits hydro-méthanoliques vis-à-vis des bactéries, de levures et des moisissures sont illustrés dans le tableau 9. Les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis des extraits testés, ce qui est parfois difficile à interpréter.

En effet, *Enterobacter cloacea*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter freundii* se sont révélés résistantes à tous les extraits. Les autres souches présentent une certaine sensibilité à au moins un des extraits avec des diamètres compris entre 10 et 15 mm, y compris la souche de *Candida albicans*. Les plus sensibles sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* à l'extrait des écorces de racines de *J. oxycedrus* et *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* aux extraits des écorces et des baies de *J. oxycedrus*. Cependant, tous les extraits ne montrent aucune activité contre les souches de moisissures.

Tableau 9: Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits hydro-méthanoliques

	<i>J. oxycedrus</i>			<i>P. majus</i>	<i>E. pycnanthum</i>	<i>S. oleifolium</i>			DMSO	Antibiotiques de référence**
	Ecorces de racines	Aiguilles	Baies	Parties Aériennes*	Racines	Feuilles	Fleurs			
Bactéries Gram –										
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	10	10	9	10	6	8	6	6	12
<i>Citrobacter freundii</i>	8	6	8	9	6	6	6	6	6	27
<i>Enterobacter cloacea</i>	6	6	8	7	6	6	8	6	6	26
<i>Escherichia coli</i>	6	7	8	8	6	6	6	6	6	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	8	8	6	8	6	6	17
<i>Proteus mirabilis</i>	11	10	11	6	6	6	7	6	6	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	10	11	7	6	6	8	6	6	19
<i>Salmonella typhi</i>	6	6	8	6	6	6	8	6	6	16
Bactérie Gram +										
<i>Bacillus cereus</i>	14	10	10	8	6	6	8	6	6	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	10	14	6	6	6	6	6	6	9
<i>Listeria monocytogenes</i>	12	10	10	6	6	6	6	6	6	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	11	15	6	6	7	6	6	6	17
<hr/>										
<i>Candida albicans</i>	11	11	10	7	6	6	8			19
<hr/>										
Moisissures										
<i>Alternaria alternata</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	17
<i>Aspergillus flavus</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	28
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	16
<i>Cladosporium herbarum</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	14
<i>Fusarium oxysporum</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	8

*: tige, feuille et fleur

**Gentamicine (15µg/disque) pour les Bactéries, Amphotéricine (20 µg/disque) pour la levure et les moisissures

III. Discussion

L'extraction des principes actifs, à partir de la matière végétale, suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leurs pouvoirs biologiques. L'extraction des polyphénols se fait grâce à plusieurs solvants ou à des mélanges de solvant/eau. Le mélange méthanol/eau, 80/20 (v/v) (Harborne, 1998), considéré comme un mélange de polarité élevée, a été choisi pour la réalisation des extractions. Ce choix est basé sur les résultats de plusieurs travaux antérieurs qui ont montré que le rendement d'extraction augmente de manière significative avec l'utilisation d'éthanol aqueux ou du méthanol aqueux par rapport à des extractions aux solvants organiques purs (Vazquez et al., 2008; Mussatto et al., 2011). Plus précisément, l'addition d'eau à 20% aux solvants polaires améliore l'extraction des composés phénoliques en particulier à l'éthanol, le méthanol ou l'acétone (Robards et Antolovich, 1997; Trabelsi et al., 2010). Ce comportement peut être expliqué par le fait que la présence de l'eau déstabilise les parois cellulaires. Par conséquent, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande du soluté, favorisant ainsi l'extraction. D'autre part, la diminution du taux d'extraction à des concentrations plus faibles de 50% peut être attribuée à la diminution de la capacité du solvant, devenant de plus en plus pauvre en alcool (Penchev et al., 2010; Mussatto et al., 2011).

Les rendements massiques des baies et des aiguilles de *J. oxycedrus* (15 et 16.66%, respectivement), sont 2 fois plus inférieurs par rapport à ceux trouvés par Orhan et al. (2011a), soit respectivement 33.3 et 35.2%. Dans ce travail antérieur, la même technique d'extraction a été utilisée avec comme solvant d'extraction à l'éthanol (80%). Toutefois, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques des plantes ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée du stockage, à la période de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées, le rapport poids de la plante /volume du solvant et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

Peu de travaux concernant les teneurs en composés phénoliques des espèces étudiées ont été réalisés. Pour les feuilles de *S. oleifolium*, les teneurs en PT et en Flv sont supérieures à celles de la même espèce étudiée antérieurement par Nassr-Allah et al. (2009) soit respectivement 21 ± 0.65 mg EAG.g⁻¹MS et 1.8 ± 0.06 mg EC.g⁻¹MS. Cependant, l'extrait de *P. majus* s'est révélé moins riche en PT en le comparant avec le contenu en polyphénols de 24 espèces de Lamiacées (115 à 575 mg EAG.g⁻¹MS) (Stagos et al., 2012). Les teneurs en PT dans l'extrait des aiguilles de *J. oxycedrus* (133.08 ± 4.1 mg EAG.g⁻¹MS) est inférieure à celle

de l'extrait éthanolique de la même espèce étudiée par Orhan et al. (2011b) (206.19 ± 9.04 mg EAG.g⁻¹MS). Cependant, ces teneurs sont comparable à celles de *J. excelsa*, *J. sarbia* (111.32 ± 6.71 et 122.67 ± 5.25 mg EAG.g⁻¹MS, respectivement) (Orhan et al., 2011b), *J. sidirica* (163.66 ± 15.80 mg EAG.g⁻¹MS) (Lesjak et al. 2011) et de *J. foetidissima* étudié par Orhan et al. (2011b) et Lesjak et al. (2013) (144.32 ± 16.04 et 196.07 ± 2.97 mg EAG.g⁻¹MS, respectivement).

Selon Orhan et al. (2011b) (4.50 ± 0.87 mg EAG.g⁻¹MS) et Taviano et al. (2013) (5.14 ± 0.06 mg EAG.g⁻¹MS), les teneurs en ces composés dans les baies de *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* sont proches de notre résultat (5.59 ± 0.81 mg EAG.g⁻¹MS). Les baies de *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* (Taviano et al., 2013) (17.89 ± 0.23 mg EAG.g⁻¹MS), *J. excelsa* (15.02 ± 0.58 mg EAG.g⁻¹MS), *J. foetidissima* (55.85 ± 1.17 mg EAG.g⁻¹MS) et *J. communis* subsp. *nana* (11.92 ± 6.71 mg EAG.g⁻¹MS) (Orhan et al., 2011b), ont des teneurs élevées.

Les faibles teneurs en tanins dans les plantes étudiées, comparées avec celles des polyphénols totaux et des flavonoïdes, sont probablement dues au fait que le méthanol n'est pas le solvant approprié à l'extraction de ces composés. Cette probabilité est soutenue par plusieurs travaux, qui ont montré que les tanins condensés sont mieux extraits par un mélange acétone/eau (70/30) (Chavan et al., 2001; Macheix et al., 2005; Trabelsi et al., 2010).

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été évalué à travers différentes méthodes. Les résultats ont été analysés par le test de tukey, afin de classer et sélectionner les extraits les plus actifs par toutes les méthodes utilisées. Il s'est avéré que les extraits des écorces de racine et des aiguilles de *J. oxycedrus* et celui de *P. majus* sont les plus puissants, même en les comparant avec les antioxydants de synthèse.

L'activité importante des aiguilles de *J. oxycedrus* est soutenue par les résultats de quelques études antérieures. Ces travaux montrent que les extraits hydro-métanoliques des feuilles de *J. sibirica* et *J. foetidissima*, testés par la méthode de DPPH[·] (CI₅₀ de $6.20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $2.58 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivement) (Lesjak et al., 2011; 2013), et celui méthanolique de *J. communis* testé par la méthode d'ABTS^{·+} (CI₅₀ = $24.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Al-Mustafa et Al-Thunibat, 2008), sont plus actifs que celui des aiguilles de *J. oxycedrus*. Cependant, les baies de *J. oxycedrus* ont une faible activité antioxydante. Ce résultat est confirmé par des travaux récents sur *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa*, *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Taviano et al., 2013) et *J. drupacea* (Miceli et al., 2011), qui ont montré une très faible capacité à piéger le radical DPPH par rapport à nos résultats. En outre, ces extraits ont une capacité à chélater le fer beaucoup plus importante que le nôtre.

Les extraits hydro-méthanoliques de *S. oleifolium* et d'*E. pycnanthum* ont une activité antioxydante modérée, cela est confirmé par les résultats de la capacité à piéger le radical DPPH[•] de l'extrait éthanolique de *S. oleifolium* (CI₅₀ = 52.13 µg.ml⁻¹) (Shafek et al., 2012) et par l'étude de Assimopoulou et al. (2004), qui ont montré que la shikonine, une quinone présente dans les extraits des racines d'*E. pycnanthum* (Chaouche et al., 2012), ont une activité antioxydante modérée et qui peut être à l'origine de l'activité de cette plante.

Il est intéressant de relier l'activité antioxydante des extraits à leurs teneurs en composés phénoliques, dans le but de connaître lesquels sont responsables de ce pouvoir. Afin d'explorer cette relation, on a déterminé la corrélation entre les teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins et les différentes activités antioxydantes. Les composés phénoliques ont montré une corrélation avec chacune des activités antioxydantes, ce qui a été confirmé par certains travaux précédents qui ont montré que les teneurs en composés phénoliques sont responsables des activités antioxydantes élevées (Liu et al., 2008; Turumtay et al., 2014). En effet, c'est la fraction des flavonoïdes qui a montré une bonne corrélation avec la plupart des tests. Cela s'explique par un mécanisme de transfert d'électrons qui augmente la capacité de réagir comme réducteurs. Pour le test de blanchiment du β-carotène, la faible corrélation est probablement due à la haute spécificité de ce test pour les composés lipophiles (Gachkar et al., 2007; Kubola et al., 2008). Alors que pour le pouvoir chélateur, une faible corrélation peut prédire l'inexistence des groupes appropriés qui chélatent les cations (Sánchez-Vioque et al., 2012).

Concernant l'activité antimicrobienne, les extraits hydro-méthanoliques ont révélé une activité modérée. Cela s'explique soit par l'absence des molécules fortement antimicrobiennes soit par la faible capacité des composés antibactériens, présents dans ces extraits de se diffuser de manière uniforme à travers l'agar (Rauha et al., 2000). Les études réalisées par Karaman et al. (2003), sur l'activité antimicrobienne des aiguilles de *J. oxycedrus* et par Taviano et al. (2013), sur l'activité des baies de cette espèce, viennent confirmer nos résultats.

Kuruüzüm-Uz et al. (2004), ont montré que l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique d'*Echium vulgare* contre des microorganismes testés (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*) n'était pas significative, ce qui est en accord avec nos résultats. En outre, l'étude faite par Shafek et al. (2012), a révélé que certaines bactéries gram (+) et (-) montrent une sensibilité à l'extrait brut de *Solenostemma oleifolium*. Ce résultat est en contradiction avec le notre.

VI. Conclusion

Les résultats sont une contribution à la valorisation des plantes médicinales. Pour la plus part des plantes étudiées, cette enquête peut être considérée comme le premier travail sur les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

Dans ce chapitre la préparation des extraits hydro-méthanoliques par macération a abouti à des différents rendements. Les parties aériennes sont les plus importants par comparaison aux racines. Les résultats des dosages spectrophotométriques ont montré que les extraits de *J. oxycedrus* (aiguilles et écorces de racines) et de *P. majus* sont les plus riches en composés phénoliques.

En se basant sur les résultats des tests antioxydants, les extraits de *J. oxycedrus* (aiguilles et écorces de racines) sont les extraits les plus intéressants en terme de capacité antioxydante. Une capacité fortement liée à la présence de composés phénoliques, ce qui a été confirmé par une corrélation positive entre ce potentiel et le contenu phénolique, notamment en flavonoïdes. Les interactions synergiques peuvent aussi expliquer ces fortes propriétés de ces extraits. Par conséquent, cette étude va se poursuivre sur les aiguilles et les écorces de racines de *J. oxycedrus* dans le chapitre suivant. En effet un fractionnement par des solvants de polarité croissante sera réalisé et les extraits vont être testés pour leur pouvoir antioxydant, antimicrobien et hémolytique.

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet de trois publications et des participations dans plusieurs séminaires.

1. Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Medini F, Atik-Bekara F. 2013. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Phytothérapie*, 11(4) : 244-249.
DOI: 10.1007/s10298-013-0779-5
2. Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Medini F, El-Haci IA, Boucherit Z, Sekkal F-Z, Atik-Bekara F. 2013. Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of phenolic extract of *Prasium majus* L. *Free Radicals and Antioxidants*, 3(1): 43-46.
DOI: 10.1016/j.fra.2013.03.004
3. Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Atik-Bekara F. 2014. Evaluation of antioxidant activity of hydro-methanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *Journal of the Chinese Medical Association*, 77(6): 302-307.
DOI:10.1016/j.jcma.2014.01.009

Chapitre 2.

Étude phytochimique, activités antioxydantes, antimicrobiennes et hémolytiques des extraits de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*

Résumé : Le but de ce chapitre est d'évaluer les activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits, obtenus par des extractions successives par des solvants de polarité croissante (hexane, dichlorométhane, méthanol et eau), des deux parties de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (aiguilles et écorces de racines). Ceux possédant des activités importantes, ont été testés pour leurs pouvoirs hémolytiques. Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins dans les différents extraits, ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. Ce sont les extraits méthanoliques et aqueux, qui se sont montrés les plus riches en ces composés. Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers neuf méthodes (capacité antioxydante totale, pouvoir réducteur et celui chélateur du fer, DPPH[·], ABTS^{·+}, β-carotène, oxygène singulet, anion superoxyde et radical hydroxyle). Les extraits méthanoliques et aqueux, se sont montrés les plus actifs. L'extrait méthanolique des écorces de racines a montré la plus grande activité, même par rapport aux antioxydants de synthèse. Sa valeur de CI₅₀, en piégeant le radical DPPH[·], est de 1.07 µg.ml⁻¹. Cependant, dans le test de la chélation de fer, aucun des extraits n'a montré une activité comparable à celles de l'antioxydant de synthèse (EDTA). Il y a des corrélations linéaires significatives entre les teneurs en flavonoïdes et les différents tests. La détermination de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé et celle des dilutions en milieu liquide, vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques. Ces extraits ont une activité antibactérienne modérée. Ceux méthanoliques ont montré le plus d'efficacité avec une valeur de CMI de 0.78 mg.ml⁻¹ contre *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Tous les extraits ont une faible activité antifongique. Les extraits aqueux sont totalement inactifs, alors que ceux d'hexane et de dichlorométhane ont montré une activité contre *C. albicans* avec des valeurs respectives de CMI de 0.39 et 0.78 mg.ml⁻¹. Le test d'hémolyse est évalué pour les extraits méthanoliques et aqueux, vis-à-vis des érythrocytes humains. Les pourcentages d'hémolyse sont inférieurs à 5% pour tous les extraits, ce qui les caractérise par une cytotoxicité mineure.

I. Introduction

Les extraits des écorces de racines et des aiguilles de *J. oxycedrus*, d'intérêt antioxydant dans le chapitre précédent, ont été choisis pour la réalisation des extractions au soxhlet par des solvants de polarité croissante, dans le but de simplifier les extraits, en séparant les molécules en fonction de leurs affinités aux solvants. Les différents extraits servent à l'évaluation, *in vitro*, des activités antioxydantes et antimicrobiennes.

L'efficacité de l'extraction au soxhlet est liée au fait que le solvant qui se condense et qui vient au contact du végétal est toujours pur, permettant de meilleurs coefficients de partage. Dans le cas de la macération, le solvant devant extraire la matière végétale peut arriver à saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction au cours du procédé (Romanik et al., 2007).

Les solvants utilisés sont l'hexane (Hx), le dichlorométhane (Dich), le méthanol (M) et l'eau (Aq). Ce choix a été établi afin d'épuiser la matière végétale progressivement, par des solvants de polarité croissante. Les étapes de la réalisation de cette étude sont représentées dans la figure 42.

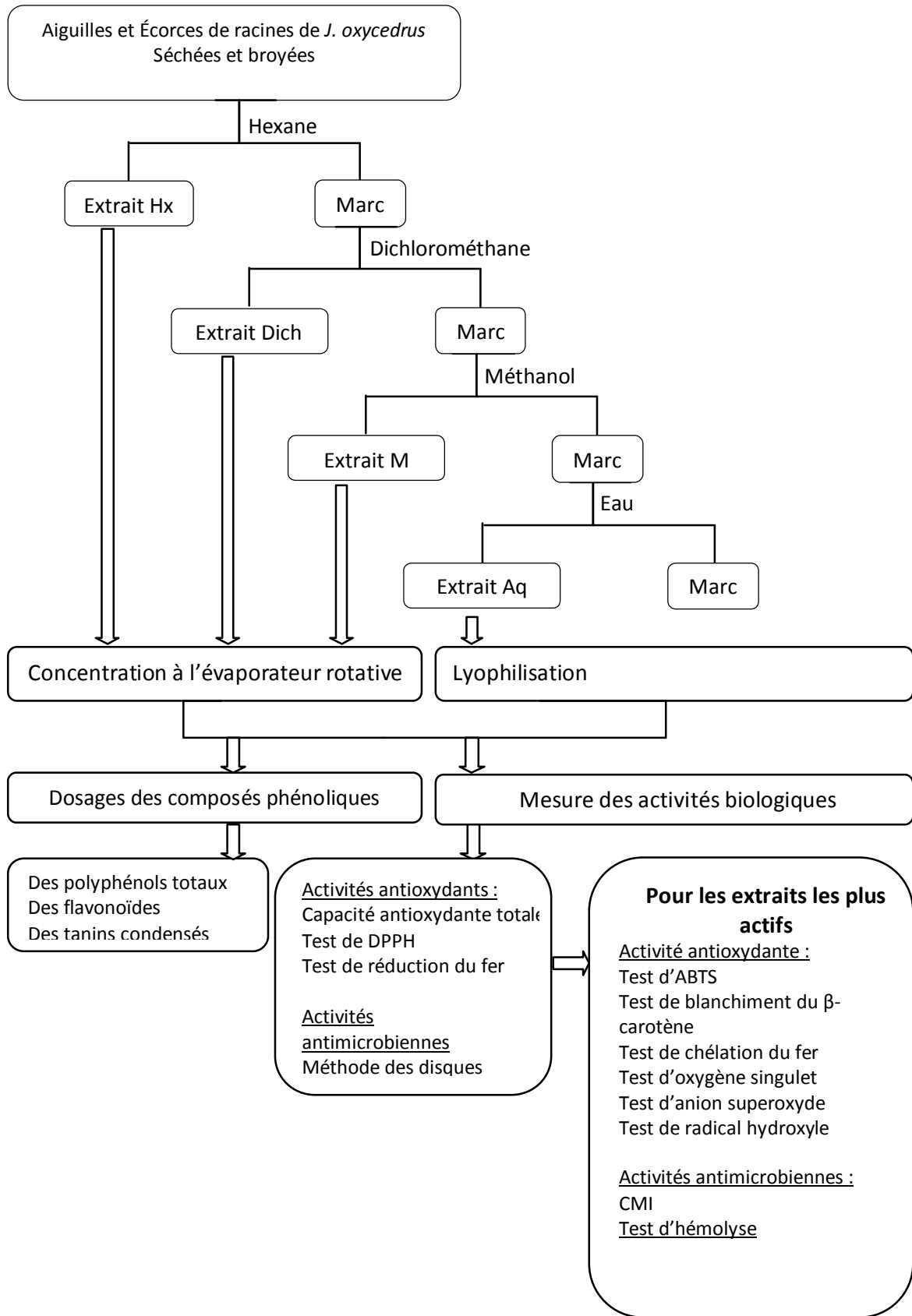


Figure 42: Etapes de la réalisation de l'étude phytochimique, activités antioxydantes, antimicrobiennes et hémolytiques de quelque extrait de *Juniperus oxycedrus*

II. Résultats

1. Rendement des extraits de polarité croissante

Les extractions successives par des solvants de polarité croissante permettent de séparer les composés de la matière végétale selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Les rendements d'extractions, les aspects et les couleurs des extraits sont reportés dans le tableau 10.

Tableau 10: Aspects, couleurs et rendements massique (%) des extraits obtenus par extraction au soxhlet

Plante	Extrait	Aspect	Couleur	Rendement (%)	
<i>J. oxycedrus</i>	Aiguilles (JOA)	Hx	Visqueux	Vert	3.55
		Dich	Visqueux	Vert foncé	1.6
		M	Visqueux	Jaune	24.85
	Ecorces de racines (JOR)	Aq	Poudre	Marron	9.02
		Hx	Visqueux	Jaune	3.5
		Dich	Visqueux	Jaune	1.4
		M	Visqueux	Rouge	12.1
		Aq	Poudre	Rouge orange	11.37

Hx: hexane, Dich: dichlorométhane, M: méthanol, Aq: aqueux.

Les rendements des extractions varient de 1.4 à 24.85 dans l'ordre décroissant suivant: méthanol > eau > hexane > dichlorométhane. Le rendement de l'extrait méthanolique des aiguilles est supérieur à ceux des autres extraits. Celui des écorces de racines est supérieur à ceux d'hexane et de dichlorométhane et est proche de celui d'aqueux. Les extractions par l'hexane et le dichlorométhane ont conduit à des rendements faibles (1.4 - 3.55%).

Ces extraits servent par la suite à évaluer les activités antioxydantes, antimicrobiennes et le test d'hémolyse. Ces activités doivent être précédées par des dosages spectrophotométriques des composés phénoliques.

2. Teneurs en composés phénoliques

Les extraits préparés ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible, pour leurs contenus en polyphénols totaux (PT), en flavonoïdes (Flv) et en tanins condensés (Tn). Ensuite, les D.O ont été exprimées à partir des courbes d'étalonnages, d'acide gallique (figure 27) et de la (+)-catéchine (figure 28 et 29). Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau 11.

Tableau 11: Contenus en composés phénoliques des différents extraits de *J.oxycedrus*

Plante	Extraits	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Tanins condensés	
		mg EAG.g ⁻¹ MS	mg EC.g ⁻¹ MS	mg EC.g ⁻¹ MS	
<i>J. oxycedrus</i>	Aiguilles	Hx	0.28 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.82 ± 0.02
		Dich	0.94 ± 0.09	0.25 ± 0.08	0.55 ± 0.03
		M	58.8 ± 1.08	16.2 ± 1.20	19.05 ± 1.81
		Aq	12.07 ± 0.84	3.78 ± 0.56	4.34 ± 0.91
	Ecorces de racines	Hx	3.17 ± 0.12	2.01 ± 0.41	1.02 ± 0.55
		Dich	1.85 ± 0.10	1.01 ± 0.33	0.5 ± 0.02
		M	76.16 ± 2.85	39 ± 2.50	31.3 ± 2.11
		Aq	25.37 ± 2.03	11.01 ± 1.03	8.31 ± 0.94

Hx: hexane, Dich: dichlorométhane, M: méthanol, Aq: aqueux.

Pour les deux parties de la plante, la capacité des différents solvants pour extraire de PT, Flv et Tn a été jugée dans l'ordre suivant: méthanol > eau > hexane > dichlorométhane. Ces résultats suggèrent que la plupart des composés phénoliques sont extractibles dans les solvants polaires (méthanol et eau). Par contre les extraits d'Hexane et de dichlorométhane ont les plus basses teneurs avec des valeurs qui ne dépassent pas 3.17 mg EAG.g⁻¹ MS. Les résultats en composés phénoliques des écorces de racines sont supérieurs à ceux des aiguilles.

3. Evaluation de l'activité antioxydante des différents extraits

3.1. Détermination de l'activité antioxydante

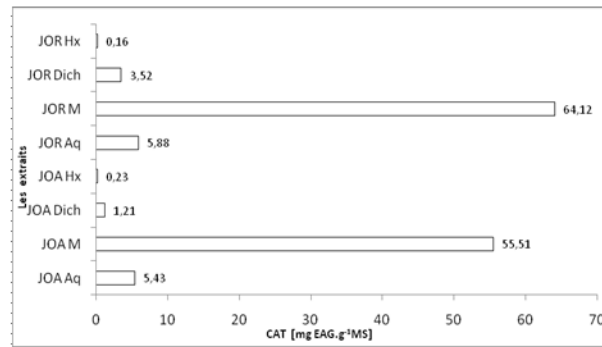
Dans cette partie, on a étudié l'activité antioxydante des différents extraits (Hx, Dich, M, Aq) des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* par neuf techniques, *in vitro*, afin de localiser les extraits qui présentent le plus d'activité. Il s'agit de CAT, DPPH[·], ABTS^{·+}, β-carotène, [·]OH, [·]O₂⁻, ¹O₂, pouvoir réducteur et celui chélateur de fer.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent comparés à des antioxydants de synthèse, à savoir le BHA, le BHT, l'EDTA et le Trolox.

3.1.1. Selection des extraits les plus actifs par trois méthodes

a. Capacité antioxydante totale

Les résultats de ce dosage montrent que les extraits d'hexane et de dichlorométhane ont une très faible capacité antioxydante totale, avec des valeurs qui ne dépassent pas 3.52 mg EAG.g⁻¹MS (figure 43). Les extraits méthanoliques présentent une bonne capacité antioxydante par rapport aux extraits aqueux. L'extrait méthanolique des écorces de racines possède la meilleure capacité de l'ordre 64.12 mg EAG.g⁻¹MS.

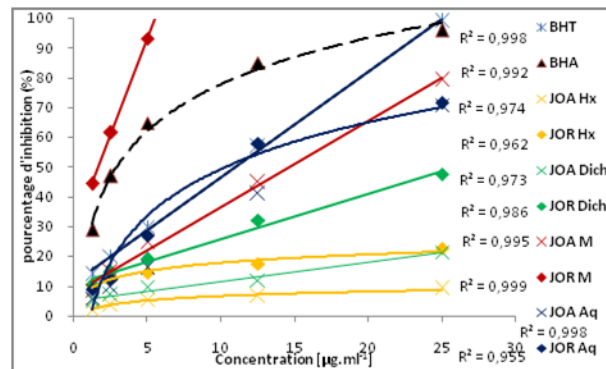


JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*
Hx: hexane, Dich: dichlorométhane, M: méthanol, Aq: aqueux.

Figure 43: Capacité antioxydante totale des extraits M et Aq de *J. oxycedrus*

b. Piégeage du radical DPPH[•]

La gamme de concentrations utilisée est de 1 à 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Les valeurs des D.O obtenues montrent une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits. Les résultats sont illustrés sous forme des courbes ayant des allures linéaires et logarithmiques avec un R^2 compris entre 0.94 à 0.99 (figure 44).



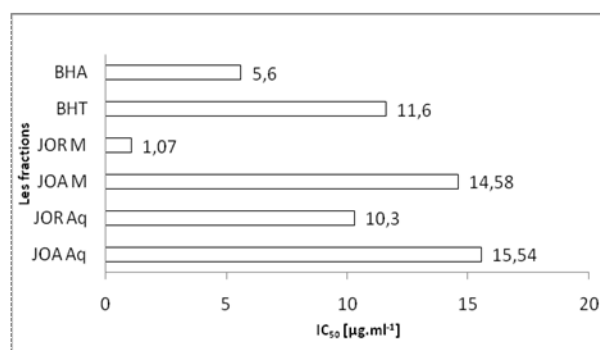
JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*
Hx: hexane, Dich: dichlorométhane, M: méthanol, Aq: aqueux.

Figure 44: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH[•] en fonction des différentes concentrations des extraits de *J. oxycedrus* et des antioxydants de synthèse

On constate que les extraits méthanoliques et aqueux ont une activité importante à piéger le radical DPPH[•] avec des pourcentages d'inhibition compris entre 70% et 99% à une concentration de 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. En outre l'extrait méthanolique des écorces de racines est le plus actif, même par rapport aux antioxydants de synthèse (BHA et BHT). Cependant les extraits d'hexane ont une très faible activité aux concentrations testées. Ils n'atteignent pas les 20% d'inhibition de DPPH[•], même à une concentration de 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, ce qui reste significativement inférieure à celles des antioxydants de synthèse qui dépassent 95% de l'activité inhibitrice.

Les extraits de dichlorométhane testés montrent une certaine activité, mais aucun d'entre eux n'est suffisamment actif pour que 50% d'inhibition soit atteinte. A la même concentration 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, les extraits n'atteignent pas les 45% d'inhibition de DPPH'.

Les valeurs de CI_{50} des extraits méthanoliques et aqueux, les seuls à avoir pu inhiber plus de 50% du radical DPPH', sont représentées dans la figure 45. Ces valeurs ont permis de classer les extraits par ordre de réactivité décroissante: JOR M > BHA > JOR Aq > BHT > JOA M > JOA Aq. L'extrait méthanolique des écorces de racines, avec la valeur de CI_{50} la plus faible (1.07 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), a la meilleure activité même par rapport aux antioxydants de synthèse (BHA et BHT).



JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*
M: méthanol, Aq: aqueux.

Figure 45: Valeurs de CI_{50} des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et des antioxydants de synthèse par la méthode du piégeage du radical libre DPPH'

c. Pouvoir réducteur du fer

Pour tester le pouvoir réducteur, une gamme de concentrations de 100 à 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a été préparée pour chaque extrait. Les valeurs des D.O obtenues montrent une augmentation proportionnelle du pouvoir réducteur en fonction des concentrations des extraits. Ces résultats ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires avec un R^2 compris entre 0.97 à 0.99 (figure 46).

A une concentration de 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, les D.O des extraits varient entre 0.2 à 1.935. Les extraits méthanoliques et aqueux révèlent une activité intéressante ($0.6 \geq \text{D.O} \geq 1.621$). Cependant, les extraits d'hexane et de dichlorométhane révèlent une faible activité ($\text{D.O} \leq 0.402$).

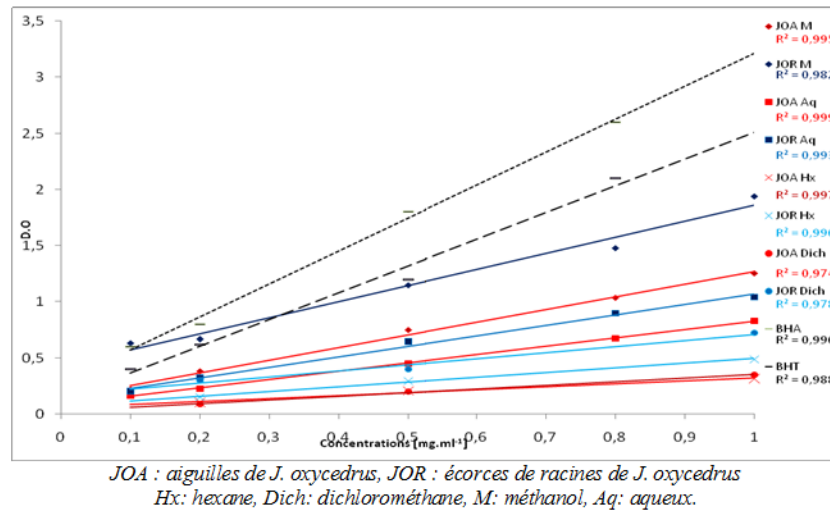


Figure 46: Pouvoirs réducteurs en fonction des différentes concentrations des extraits de *J. oxycedrus* et des des antioxydants de synthèse

Les valeurs de CE₅₀ des extraits méthanoliques et aqueux sont représentées dans la figure 47. Pour les extraits d'hexane et de dichlorométhane, ces valeurs n'ont pas abouti. Donc d'après ces valeurs, on peut classer la puissance de réduction du fer des différents extraits, comme suit: BHA > JOR M > BHT > JOA M > JOR Aq > JOA Aq.

Les extraits méthanoliques et aqueux semblent avoir une activité réductrice faible en comparaison avec les antioxydants de synthèse, à l'exception de l'extrait méthanolique des écorces de racines qui présente une bonne activité, comparable à celle du BHA et plus importante que celle du BHT. L'effet de cet extrait est probablement attribué à sa richesse en composés capables de réduire le fer.

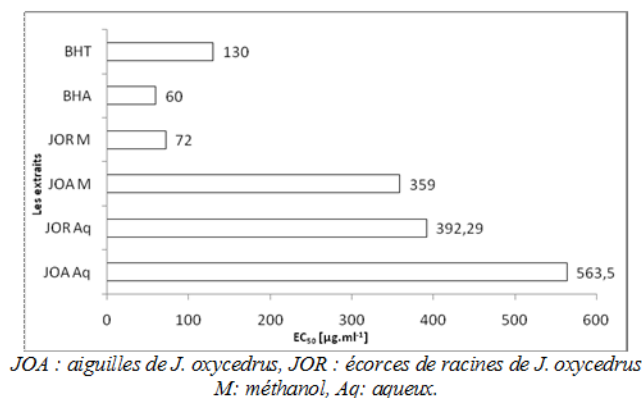


Figure 47: Valeurs de CE₅₀ des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et des antioxydants de synthèse par la méthode de la réduction du fer.

3.1.2. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits actifs par d'autres méthodes

A partir des résultats des trois méthodes précédentes on a sélectionné les extraits méthanoliques et aqueux pour les tester par d'autres méthodes.

a. Piégeage du radical ABTS^{•+}

Pour tester la capacité des extraits à piéger le radical ABTS^{•+}, une gamme de concentrations de 15 à 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a été préparée. Les valeurs des D.O ont permis de calculer les pourcentages d'inhibition de ce radical. Ces pourcentages augmentent de façon proportionnelle en fonction des concentrations. Ces résultats ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires et logarithmiques avec un R^2 compris entre 0.97 à 0.99 (figure 48).

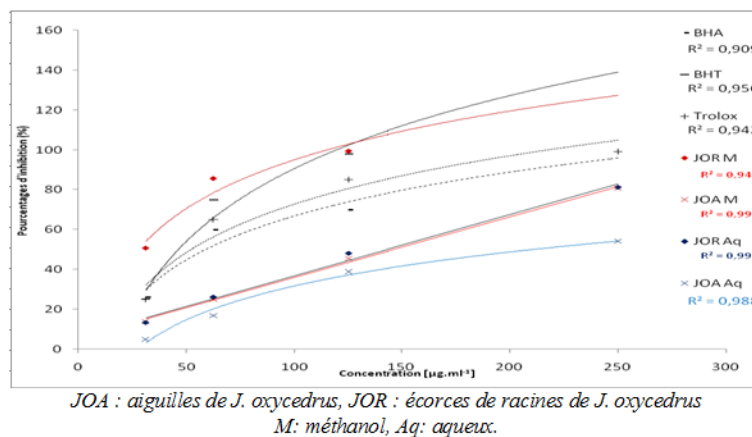
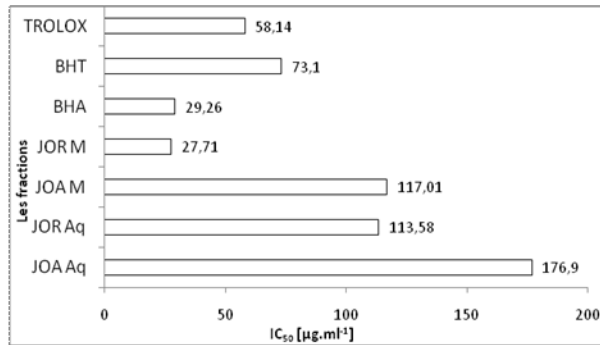


Figure 48: Pourcentages d'inhibition du radical ABTS^{•+} en fonction des différentes concentrations des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et des antioxydants de synthèse

A une concentration de 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, l'extrait méthanolique des écorces de racines révèle une activité importante avec plus de 85% d'inhibition de l'ABTS^{•+}. A cette concentration les autres extraits ne dépassent pas les 25% d'inhibition. C'est à partir d'une concentration de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, que l'extrait méthanolique des aiguilles et l'extrait aqueux des écorces de racines dépassent les 85% d'inhibition de l'ABTS^{•+}. L'extrait aqueux des aiguilles montre une faible activité qui ne dépasse pas les 55% à cette même concentration.

Les valeurs de CI_{50} sont déterminées et sont représentées dans la figure 49. A partir de ces valeurs, on peut classer les extraits par ordre de réactivité croissante: JOR M > BHA > Trolox > BHT > JOA M > JOR Aq > JOA Aq.

C'est l'extrait méthanolique des écorces de racines qui présente l'activité la plus importante, avec une CI_{50} de 27.71 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, même en comparant avec les antioxydants de synthèse. Les autres extraits ont une activité moindre que celle des antioxydants de synthèse.

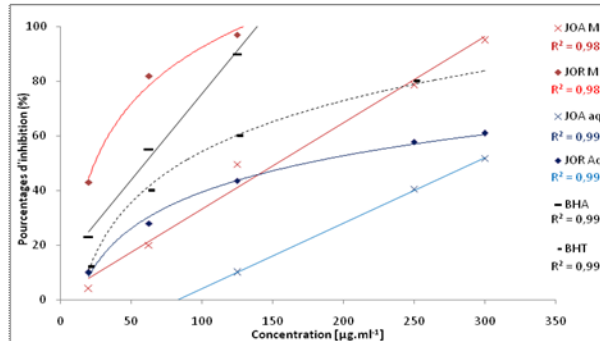


JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*
M: méthanol, Aq: aqueux.

Figure 49: Valeurs de CI₅₀ des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et des antioxydants de synthèse par la méthode de piégeage du radical ABTS^{•+}

b. Inhibition de blanchissement du β-carotène

Pour la réalisation de ce test, une gamme de concentrations de 20 à 300 µg.ml⁻¹ a été choisie. Les valeurs de D.O obtenues ont permis de calculer les pourcentages d'inhibition de blanchissement du β-carotène. L'augmentation de ces pourcentages d'inhibition est proportionnelle aux concentrations utilisées. Ces pourcentages ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires et logarithmiques avec des valeurs de R² comprises entre 0.97 et 0.99 (figure 50).



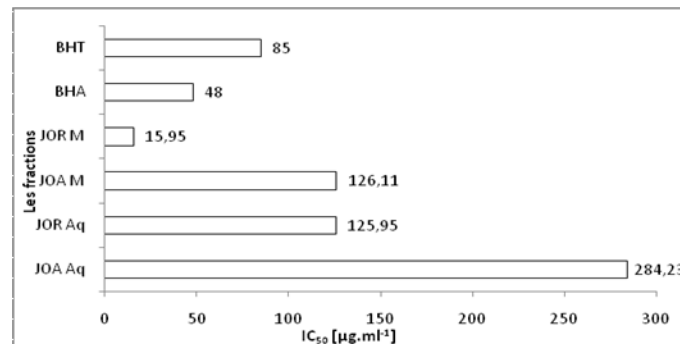
JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*
M: méthanol, Aq: aqueux.

Figure 50: Pourcentages d'inhibition de blanchiment du β-carotène en fonction des différentes concentrations des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et des antioxydants de synthèse

A 60 µg.ml⁻¹, l'extrait méthanolique des écorces de racines révèle une activité importante avec une inhibition qui dépasse les 80%. A 250 µg.ml⁻¹, tous les extraits méthanoliques dépassent 90%, à l'exception des extraits aqueux.

La figure 51 représente les valeurs de CI₅₀ des extraits dont 50% d'inhibition ont abouti. Le classement des extraits par leurs ordres de réactivité croissante est le suivant : JOR M > BHA > BHT > JOA M > JOR Aq > JOA Aq. L'extrait méthanolique des écorces de racines montre la plus grande activité inhibitrice avec une CI₅₀ estimé à 15.95 µg.ml⁻¹. Une valeur

significativement inférieure à celle des antioxydants de synthèse, le BHA ($48 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et le BHT ($85 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

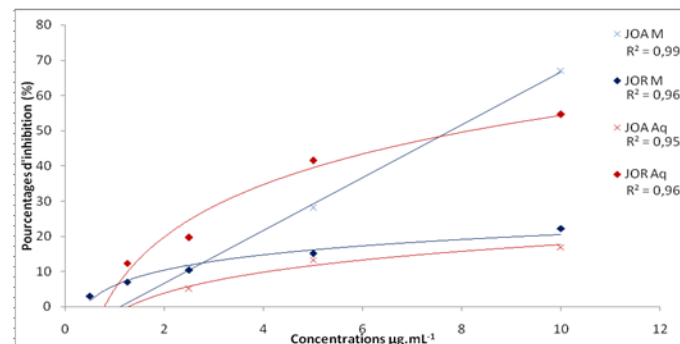


JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*
M: méthanol, Aq: aqueux.

Figure 51: Valeurs de CI_{50} des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et des antioxydants de synthèse par la méthode d'inhibition de blanchiment du β -carotène

c. Pouvoir chélateur du fer

Dans ce test, la gamme de concentrations utilisée est de 0.5 à 10 mg.ml^{-1} . Une augmentation proportionnelle du pouvoir chélateur en fonction des concentrations des extraits a été observée en traçant des courbes ayant des allures linéaires et logarithmiques avec des valeurs de R^2 qui dépassent 0.95 (figure 52).



JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*
M: méthanol, Aq: aqueux.

Figure 52: Pourcentages d'inhibition du pouvoir chélateur en fonction des différentes concentrations

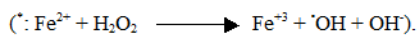
A une concentration de 2.5 mg.ml^{-1} , tous les extraits révèlent une faible chélation de fer, qui ne dépasse pas 20% . Les extraits les plus actifs sont l'extrait méthanolique des aiguilles et celui aqueux des écorces de racines, avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 67% et 55% , à une concentration de 10 mg.ml^{-1} .

Les valeurs de CI_{50} ont été calculées pour l'extrait méthanolique des aiguilles (7.77 mg.ml^{-1}) et l'extrait aqueux des écorces de racines (8.16 mg.ml^{-1}). Elles sont loin d'être comparables

avec celle d'EDTA (0.00465 mg.ml⁻¹). Pour les autres extraits les valeurs de CI₅₀ n'ont pas abouti, même à 10 mg.ml⁻¹.

d. Piégeage du radical hydroxyle

Lorsque les radicaux hydroxyles ([•]OH) générés par la réaction de Fenton*, ils oxydent le désoxyribose et les produits de réaction, malondialdéhydes (MDA), donnent une chromogène rose à une absorption à 532 nm lors d'un chauffage avec de l'acide thiobarbiturique (TBA) dans un milieu acide (TCA). La présence des anti-radicaux diminue la production des MDA.



La gamme de concentrations utilisée dans ce test est de 0.25 à 5 mg.ml⁻¹. Les valeurs de D.O obtenues montrent une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits. Ces pourcentages ont permis de tracer des courbes ayant des allures logarithmiques avec des valeurs de R² comprises entre 0.95 et 0.99 (figure 53).

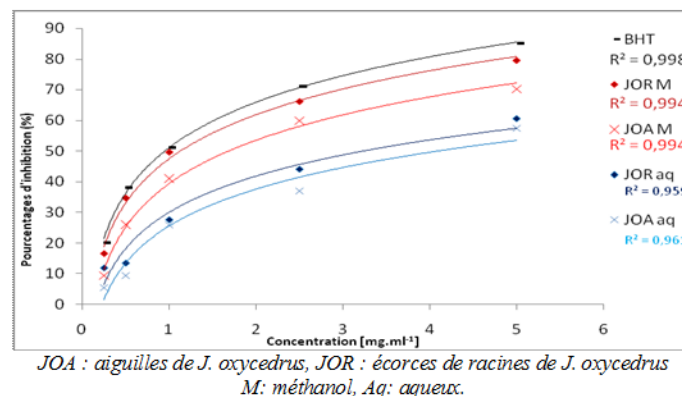
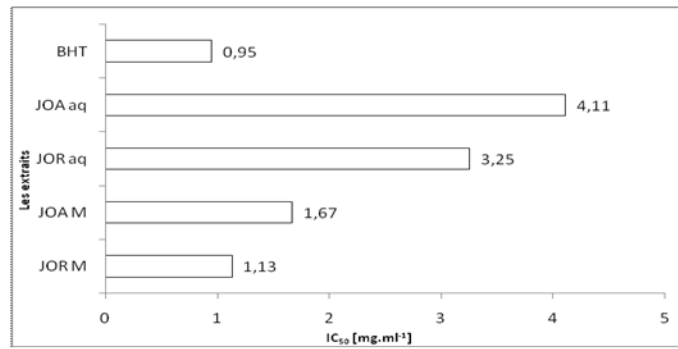


Figure 53: Pourcentages d'inhibition de piégeage du radical hydroxyle en fonction des différentes concentrations des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et d'antioxydant de synthèse

A toutes ces concentrations, les extraits méthanoliques révèlent une meilleure activité par rapport aux extraits aqueux. Ils restent légèrement moins actifs que l'antioxydant de synthèse (BHT).

Les valeurs de CI₅₀ des extraits méthanoliques confirment qu'ils possèdent la meilleure activité en comparaison avec celle des extraits aqueux (figure 54). Ces valeurs restent légèrement supérieures à celle du BHT (0.95 mg.ml⁻¹).



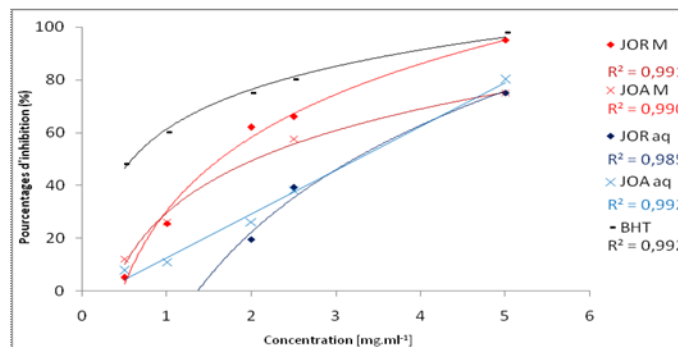
JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*
M: méthanol, Aq: aqueux.

Figure 54: Valeurs de CI₅₀ des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et d'antioxydant de synthèse par la méthode de piégeage du radical hydroxyle

e. Piégeage de l'anion superoxyde

Le pouvoir piégeur du radical anion superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$), par les différents extraits méthanoliques et aqueux de *J. oxycedrus*, a été évalué spectrophotométriquement en suivant la diminution de la réduction de NBT (Nitrobleu tetrazolium) en formazan ($\lambda_{\text{max}} = 560\text{nm}$) par le superoxyde, produit chimiquement dans le système PMS-NADH.

La gamme de concentrations utilisée est de 0.5 à 5 mg.ml⁻¹. Les valeurs de D.O obtenues montrent une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits et qui ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires et logarithmiques avec des valeurs de R^2 comprises entre 0.98 et 0.99 (figure 55).



JOA : aiguilles de *J. oxycedrus*, JOR : écorces de racines de *J. oxycedrus*
M: méthanol, Aq: aqueux.

Figure 55: Pourcentages d'inhibition du radical superoxyde en fonction des différentes concentrations des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et d'antioxydant de synthèse

A une concentration de 1 mg.ml⁻¹, les extraits méthanoliques révèlent un pouvoir à piéger l'anion superoxyde avec un pourcentage d'inhibition qui dépasse les 25%, alors que, les extraits aqueux ne dépassent pas les 10% à cette même concentration. L'activité de l'extrait méthanolique des aiguilles de *J. oxycedrus* (26%) est plus importante que celle de la même espèce étudiée par Orhan et al. (2011b) (20%) à la même concentration.

A partir des valeurs de CI_{50} , on peut donc classer les différents extraits, comme suit : BHT > JOR M > JOA M > JOR Aq > JOA Aq. Ces valeurs confirment que les extraits méthanoliques ont une activité plus importante que celle des extraits aqueux (figure 56), mais moins importante que celle du BHT (0.65 mg.ml^{-1}).

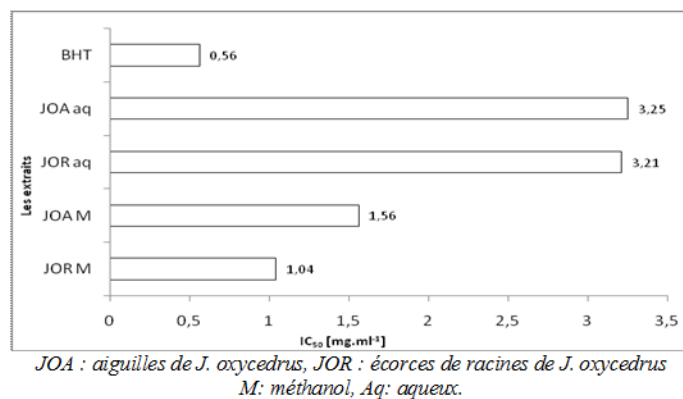


Figure 56: Valeurs de CI_{50} des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et d'antioxydant de synthèse par la méthode de piégeage du radical superoxyde

f. Piégeage de l'oxygène singulet

L'oxygène singulet (1O_2) n'est pas un radical. Ils réagit principalement par l'ajout de doubles liaisons, formant endoperoxydes qui peuvent être réduites à des radicaux alcoyles ($R-O\cdot$) qui initient des réactions radicalaires en chaîne (Prior et al., 2005). Il s'agit d'un état excité de l'oxygène moléculaire qui n'a pas d'électrons non appariés, pour être un puissant agent oxydant qui réagit directement avec une large gamme de biomolécules (Gülçin, 2012).

Le pouvoir piégeur d'oxygène singulet (1O_2) par les différents extraits méthanoliques et aqueux des plantes a été évalué, spectrophotométriquement, en suivant la diminution de la réduction de DPN/Histidine ($\lambda_{max} = 440\text{nm}$) par l'oxygène singulet, produit chimiquement dans un mélange l'hypochlorite de sodium et de H_2O_2 .

La gamme de concentrations utilisée est de 0.25 à 3 mg.ml^{-1} . Les valeurs de D.O obtenues montrent une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits. Les pourcentages ont permis de tracer des courbes ayant des allures logarithmiques avec des valeurs de R^2 comprises entre 0.95 et 0.99 (figure 57).

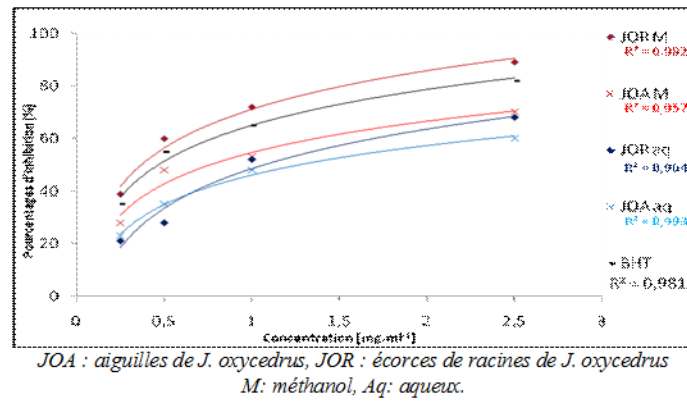


Figure 57: Pourcentages d'inhibition de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et d'antioxydant de synthèse

A une concentration de 0.5 mg.ml^{-1} , les extraits méthanoliques révèlent un pouvoir à piéger l'oxygène singulet avec un pourcentage d'inhibition qui dépasse les 50%, alors que, les extraits aqueux ne dépassent pas les 35% à cette même concentration.

Dans le but de comparer la puissance inhibitrice de l'oxygène singulet des différents extraits, les valeurs de CI_{50} ont été déterminées (Figure 58). L'extrait méthanolique des écorces de racines est le plus actif avec une CI_{50} de l'ordre 0.368 mg.ml^{-1} . Cependant, la comparaison avec l'antioxydant de synthèse montre un pouvoir antioxydant important par rapport au BHT (0.452 mg.ml^{-1}). Les autres extraits restent faibles avec des valeurs de CI_{50} comprise entre 0.757 et 1.26 mg.ml^{-1} .

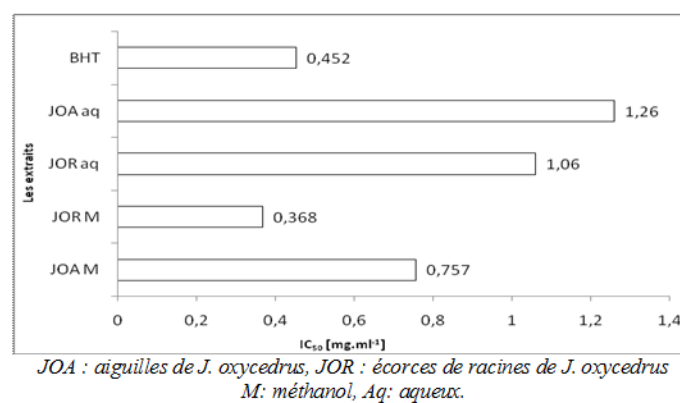


Figure 58: Valeurs de CI_{50} des extraits M et Aq de *J. oxycedrus* et d'antioxydant de synthèse par la méthode de l'oxygène singulet

3.2. Influence des composés phénoliques sur les activités antioxydantes

Les composés phénoliques ont été signalés comme étant responsables des activités antioxydantes. Pour explorer cette responsabilité, on a déterminé une régression linéaire (R^2) (tableau 12), mettant en œuvre l'influence de ces composés sur les activités étudiées.

Tableau 12 : Corrélations linéaires entre les tests antioxydants et les composés phénoliques des extraits M et Aq de *J. oxycedrus*

R^2	DPPH \cdot	P.réducteur	CAT	ABTS $\cdot\cdot^+$	β -carotène	\cdot OH	\cdot O $_2^-$	1 O $_2$
PT	0.47	0.83	0.95	0.72	0.10	0.92	0.92	0.93
Flv	0.84	0.97	0.69	0.94	0.87	0.90	0.95	0.99
Tn	0.62	0.91	0.89	0.84	0.93	0.97	0.97	0.97

Une corrélation fortement significative a été établie entre les teneurs des composés phénoliques et les tests réalisés (R^2 compris entre 0.62 et 0.99, $p \leq 0.05$). Cependant une réponse faible a été estimée d'une part entre le test au β -carotène et les teneurs en PT ($R^2 = 0.10$, $p \leq 0.05$) et d'autre part entre le piégeage du DPPH \cdot et les teneurs en PT ($R^2 = 0.47$, $p \leq 0.05$).

4. Etude de l'activité antimicrobienne

Dans la présente étude, les extraits obtenus par des solvants de polarité croissante à partir des aiguilles et des racines de *J. oxycedrus*, ont été testés contre une gamme de microorganismes (bactériens et fongiques). L'efficacité et la puissance des extraits ont été évaluées qualitativement, par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide, basée sur la mesure des diamètres des zones d'inhibitions en mm (Biyiti et al., 2004). Par la suite, cette activité a été estimée quantitativement, par la méthode de dilutions sur milieu liquide, basée sur la recherche de la plus faible concentration, des composés, qui inhibent la croissance de micro-organismes «la concentration minimale inhibitrice, CMI».

4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

4.1.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide

Cette méthode a conduit à l'obtention d'un grand nombre de données, parfois difficiles à interpréter. Les résultats obtenus, résumés dans le tableau 13, montrent que tous les extraits testés ont réagi positivement au moins sur une des souches bactériennes testées à l'exception de l'extrait aqueux des aiguilles de *J. oxycedrus*.

Listeria monocytogenes, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacea*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* sont les souches qui se sont montrées totalement résistantes. Les autres souches se comportent différemment avec des diamètres compris entre 7-14 mm. Celles qui ont une certaine sensibilité à ces extraits ont des diamètres compris entre 9 et 14mm. Les plus sensibles (12 -14 mm) sont: *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus* à

l'extrait d'hexane, *Proteus mirabilis* et *Bacillus cereus* à l'extrait de dichlorométhane, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis* et *Acinetobacter baumannii* à l'extrait de méthanol des écorces de racines. *Proteus mirabilis* est sensible à l'extrait d'hexane des aiguilles. De plus, l'inactivité du solvant utilisé pour dissoudre les résidus de ces extraits (DMSO) a été vérifiée. La sensibilité des souches à l'antibiotique de référence, la gentamicine, a été aussi testée et les valeurs des diamètres d'inhibition sont comprises entre 9 et 27mm.

Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits de polarité croissante et des contrôles, positif et négatif

	Aiguilles 500 µg/disque				Ecorces de racines 500 µg/disque				DMSO	Gentamicine 15µg/disque
	Hx	Dich	M	Aq	Hx	Dich	M	Aq		
Bactérie Gram –										
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	8	10	6	11	11	12	7	6	12
<i>Citobacter freundii</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	27
<i>Enterobacter cloacea</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	26
<i>Escherichia coli</i>	10	6	8	6	8	8	6	6	6	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	17
<i>Proteus mirabilis</i>	12	6	10	6	6	14	12	10	6	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	19
<i>Salmonella typhimurium</i>	10	6	6	6	6	6	6	6	6	16
Bactérie Gram +										
<i>Bacillus cereus</i>	9	6	10	6	13	12	12	7	6	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	6	8	6	12	10	8	6	6	9
<i>Listeria monocytogenes</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	10	11	6	9	11	10	6	6	17

Hx: hexane, Dich: dichlorométhane, M: méthanol, Aq: aqueux.

4.1.2. Détermination des CMI

Pour les souches bactériennes, qui se sont montrées les plus sensibles (12 - 14 mm) par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide, on a déterminé les valeurs de CMI. Ces valeurs sont rapportées dans le tableau 14.

Tableau 14: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits

	Aiguilles mg.ml ⁻¹	Ecorces de racines mg.ml ⁻¹			Gentamicine µg.ml ⁻¹
	Hx	Hx	Dich	M	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	/	/	/	0.78	> 8
<i>Proteus mirabilis</i>	1.56	/	25	0.78	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	/	25	/	/	8
<i>Bacillus cereus</i>	/	25	12.5	0.78	0.5

Hx: hexane, Dich: dichlorométhane, M: méthanol, Aq: aqueux, /: Non testé.

Les souches d'*Acitobacter baumannii*, *Proteus mirabilis* et *Bacillus cereus* sont les plus sensibles aux extraits méthanoliques des écorces de racines avec des valeurs de CMI égales à 0.78 mg.ml⁻¹. Les extraits d'hexane et de dichlorométhane se sont montrés les moins actifs contre ces souches avec des valeurs de CMI ≥ 12.5 mg.ml⁻¹ pour les écorces de racines. La

souche de *Proteus mirabilis* s'est montrée sensible à l'extrait d'hexane des aiguilles de *J. oxycedrus* (1.56 mg.ml⁻¹).

4.2. Evaluation de l'activité antifongique

4.2.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide

Les résultats de l'activité antifongique (tableau 15) montrent que les extraits d'écorces de racines et des aiguilles de *J. oxycedrus* qui ont un effet inhibiteur sur la croissance de ces souches fongiques, sont ceux:

- D'hexane et du méthanol d'aiguilles contre la souche de *Candida albicans*, avec un diamètre de 12mm.
- D'hexane des écorces de racines contre *Fusarium oxysporum* et *Candida albicans* avec des diamètres respectifs de 10 et 14 mm.
- Du dichlorométhane des écorces de racines contre *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans* avec des diamètres respectifs de 10 et 12 mm.
- Du méthanol des écorces de racines contre *Aspergillus fumigatus* (10mm).

Les extraits aqueux sont totalement inactifs contre ces souches fongiques. La sensibilité des souches a été vérifiée par des tests à l'amphotéricine B. *Fusarium oxysporum* s'est montrée la plus résistante à cet antifongique.

Tableau 15: Diamètre des zones d'inhibition (en mm)

	Aiguilles 500 µg/disque				Ecorces de racines 500 µg/disque				Amphotéricine 20 µg/disque
	Hx	Dich	M	Aq	Hx	Dich	M	Aq	
<i>Candida albicans</i>	12	6	12	6	14	12	6	6	19
<i>Fusarium oxysporum</i>	6	6	6	6	10	6	6	6	8
<i>Aspergillus flavus</i>	6	6	6	6	9	6	6	6	17
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6	6	6	6	6	10	10	6	28

Hx: hexane, Dich: dichlorométhane, M: méthanol, Aq: aqueux.

4.2.2. Détermination des CMI

La souche qui a fait l'objet de la recherche de CMI est celle de *Candida albicans* (tableau 16), dont les diamètres d'inhibition sont ≥ 12 .

Tableau 16: Concentrations minimales inhibitrices des extraits et de l'amphotéricine vis-à-vis de la souche de *Candida albicans*

	Aiguilles mg.ml ⁻¹		Ecorces de racines mg.ml ⁻¹		Amphotéricine B µg.ml ⁻¹
	Hx	M	Hx	Dich	
<i>Candida albicans</i>	0.39	3.12	0.39	0.78	2.5

Hx: hexane, Dich: dichlorométhane, M: méthanol.

Les deux extraits d'hexane, riches en lipides, pigments et en composés moins polaires, sont les plus actifs avec des valeurs de CMI égales à 0.39 mg.ml^{-1} , suivis par l'extrait de Dich. Cette activité reste beaucoup moins importante que celle de l'Amphotéricine B.

5. Tests d'hémolyse *in vitro*

Ce test a été évalué parce que, même si une plante possède un pouvoir antioxydant puissant et une activité antimicrobienne modérée, son utilisation en médecine traditionnelle et dans les préparations pharmacologiques sera impossible en présence de leur effet hémolytique, qui est un indicateur de cytotoxicité. Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour cette étude, en raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en hémoglobine. Ces cellules sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs et la stabilité de leurs membranes est un bon indicateur de l'effet de diverses études réalisées par divers composés, *in vitro*, pour le dépistage de la cytotoxicité (Arbos et al., 2008; Çimen, 2008). L'exposition des érythrocytes à un agent hémolytique conduit donc à la lyse de leurs membranes plasmiques avec libération du contenu cellulaire mesurable à 540 nm.

Les extraits méthanoliques et aqueux des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus*, possédant un potentiel antioxydant important, ont été testés à différentes concentrations (5, 10, 15 et 20 mg.ml^{-1}) pendant 15, 30, 45 et 60 min d'incubation avec des érythrocytes humains dilués à 10% (v/v) dans du PBS (Phosphate buffered saline) à température ambiante. Un pouvoir hémolytique se définit si le pourcentage d'hémolyse est supérieur à 5% (Sharma et Sharma, 2001).

Les résultats obtenus, montrent que les pourcentages d'effet hémolytique sont directement proportionnels à l'augmentation des concentrations des extraits en fonction du temps (figure 59). Après 15 min et pour toutes les concentrations testées, les pourcentages d'hémolyse sont compris entre 0.15% et 1.28%. Les pourcentages atteignent des valeurs entre 2.26% et 4.91%, après 60 min d'incubation. Donc, on peut classer l'effet hémolytique des différents extraits testés, à la concentration de 20 mg.ml^{-1} , après 60 min de contact avec les érythrocytes humain, comme suit : JOA M > JOA Aq > JOR M > JOR Aq. De ce fait, les extraits testés ont montré une légère activité hémolytique avec des pourcentages inférieurs à 5%. Donc, ils sont d'une très faible toxicité, même à des concentrations élevées et après 1 heure de contact avec les érythrocytes humains.

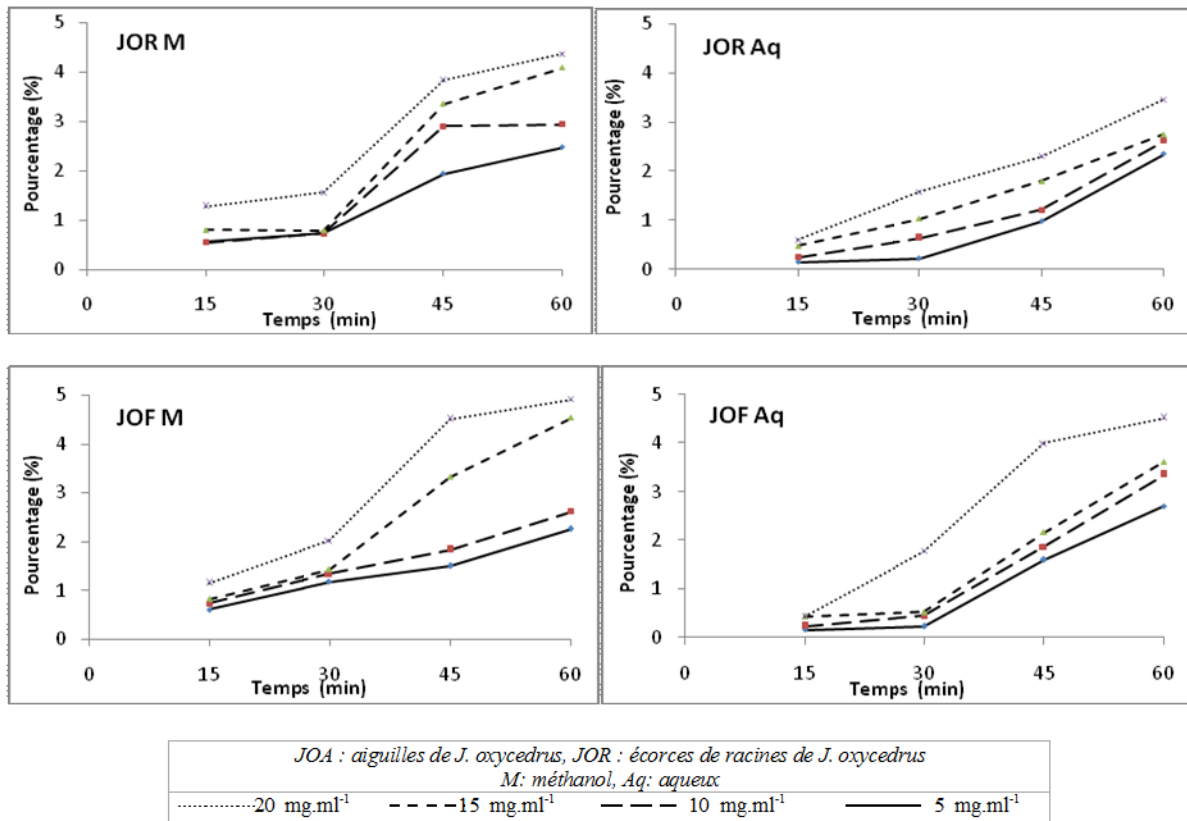


Figure 59: Activité hémolytique des extraits M et Aq de *J. oxycedrus*, exprimées en pourcentage, à des différentes concentrations et en fonction du temps

III. Discussion

Les rendements des extractions successives par des solvants de polarité croissante dépendent de la nature du solvant utilisé et des propriétés chimiques des molécules à extraire (Michel et al., 2012). Nos résultats, qui sont en accord avec ceux d'autres travaux (Abdille et al., 2005; Hadj-Salem et al., 2011; Armania et al., 2013), ont pu montrer que les rendements des extractions par des solvants polaires, notamment le méthanol, sont plus importants par rapport aux solvants moins polaires, l'hexane et le dichlorométhane qui ont la capacité de délipider et dépigmenter la matière végétale (Bruneton, 2009).

D'après ces résultats, on constate que les écorces de racines sont les plus riches en composés phénoliques (PT, Fv, Tn), et que les extraits méthanoliques et aqueux sont les plus riches en ces composés. Donc le méthanol est le meilleur solvant pour extraire ces composés. Cette affinité a été appuyée par plusieurs travaux (Abdille et al. 2005; Turkmen et al., 2006; Norhaizan et al., 2010; Stankovic et al., 2010). Cela est dû à la capacité de méthanol à inhiber l'action du polyphénol oxydase qui provoque l'oxydation des polyphénols dans les tissus végétaux (Yao et al. 2004).

Toutefois, les résultats des travaux réalisés sur quelques espèces de *juniperus*, *J. oxycedrus* (Orhan et al., 2011b) et *J. communis* (Al-Mustafa et Al-Thunibat, 2008), confirment la richesse des solvants polaires (méthanol, éthanol et eau) en composés phénoliques et révèlent que les extraits aqueux, préparés directement, sont plus riches que les autres qui sont précédés par une extraction au méthanol. Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction (Trabelsi et al., 2010), des courbes d'étalonnage (quercétine, rutine, cathéchine) et les parties des plantes étudiées, réduisent la fiabilité de la comparaison entre les études. Des études récentes ont montré que les teneurs en composés phénoliques changent de façon considérables d'une espèce à une autre et à l'intérieur de la même espèce (Ksouri et al., 2009), à cause des facteurs extrinsèques (température, climat...) (Ksouri et al., 2008), génétiques (la variétés et l'origine d'espèces) (Ebrahimzadeh et al., 2008), physiologiques (le degré de maturation de la plante, nature des organes) (Maisuthisakul et al., 2007) et de la durée de stockage.

L'évaluation de l'activité antioxydante de différents extraits a été réalisée par trois méthodes, la CAT, le piégeage du radical DPPH et la réduction du fer. La faible activité antioxydante, pour les extraits d'hexane et de dichlorométhane, est en accord avec la faible quantité en composés phénoliques. Ces résultats sont attendus, étant donné que les extraits moins polaires, connus par leurs affinités aux matières grasses et pigments (chlorophylle),

sont donc dénués de composés phénoliques ou de tout autre groupement connu pour être antioxydant. Par conséquent, les différences entre les activités antioxydantes des extraits méthanoliques et aqueux peuvent refléter des différences dans le contenu de ces extraits en composés phénoliques.

Le potentiel des extraits méthanoliques et aqueux, riches en composés phénoliques, a été évalué par d'autres méthodes telles que l'ABTS^{•+}, le blanchiment du β -carotène, l'oxygène singulet, le pouvoir chélateur, le radical hydroxyle et l'anion superoxyde.

En comparant les valeurs de CI_{50} des extraits méthanoliques et aqueux des aiguilles avec les résultats publiés par Jong et al. (2002), on a constaté qu'ils ont une meilleure capacité à piéger le radical DPPH[•], par rapport aux extraits, méthanoliques et aqueux, des feuilles de *J. chinensis*, préparés séparément (CI_{50} de 18.5 et $> 40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivement). Par contre, ces extraits, ont une capacité moindre, à piéger le radical ABTS^{•+}, par rapport aux extraits, méthanoliques et aqueux, des feuilles de *J. communis* ($24.7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et $48 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivement) (Al-Mustafa et Al-Thunibat, 2008).

L'activité réductrice de l'extrait méthanolique des écorces de racine est probablement due à sa richesse en composés de catéchine. Cette suggestion est en accord avec une étude récente qui indique que le noyau catéchol est la seule structure qui augmente le pouvoir réducteur d'un composé à 36% par rapport à un autre qui n'en contient pas (DeGraft et al., 2007). Une analyse par CLHP, de cet extrait méthanolique, peut confirmer cette suggestion.

Le pouvoir chélateur du fer des extraits méthanoliques des écorces de racine et des aiguilles et de l'extrait aqueux des écorces de racine de *J. oxycedrus* sont proches, mais loins d'être comparés avec l'EDTA. Cela peut indiquer que ces extraits sont pauvres en groupes appropriés qui chélatent les cations.

Les résultats publiés par Lesjak et al. (2011; 2013), sur le piégeage du radical hydroxyle, montrent que les extraits hydro-méthanoliques (80%) des feuilles de *J. sibirica* et *J. foetidissima* ($0.48 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ et $0.46 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivement) sont plus actifs que l'extrait méthanolique des aiguilles de *J. oxycedrus* étudié ($1.67 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Smith et al. (1992), ont signalé que les molécules capables d'inhiber la dégradation du désoxyribose sont ceux qui pourraient chélater les ions de fer. Donc, Il est probable que nos extraits sont dépourvus de ce type de molécules.

Concernant le piégeage de l'anion superoxyde, les résultats publiés par Lesjak et al. (2011; 2013), ont montré que les extraits hydro-méthanoliques (80%) des feuilles de *J. sibirica* et *J.*

foetidissima (16.27 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 35.77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivement) sont plus actifs que l'extrait méthanolique des aiguilles de *J. oxycedrus* étudiée (1.56 mg.mL^{-1}).

L'activité antimicrobienne de tous ces extraits a été démontré. Si en comparant les diamètres d'inhibition (tableau 13) avec les valeurs de CMI obtenues, on suggère, de même que Cimanga et al. (2002), que la taille de la zone d'inhibition ne reflète pas la réelle efficacité antibactérienne d'un composé. Cependant, les valeurs de CMI ne signifient pas que ces extraits sont inactifs parce que, selon Lewis et Ausubel (2006), une molécule phytochimique est considérée comme antimicrobienne si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des valeurs de CMI comprises entre 0.1 et 1 mg.mL^{-1} . Pour les antibiotiques d'origine microbienne, des CMI allant de 0,01 à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sont suffisantes pour engendrer une activité inhibitrice.

Les résultats de Karaman et al. (2003), ont montré que l'extrait méthanolique de *J. oxycedrus*, obtenu par une extraction au soxhlet, a des effets antimicrobiens plus importants que l'extrait aqueux obtenu par une simple infusion. D'après nos résultats et de celui de ce travail antérieur, on déduit que la nature du solvant et la méthode d'extraction influent directement sur la composition des extraits et par conséquence sur leur activité antimicrobienne.

Evaluer les activités biologiques des extraits naturels, nécessite une étude de l'activité hémolytique, même si la plante possède une activité antioxydante, son utilisation dans des préparations alimentaires et pharmaceutiques sera impossible vu la présence de ces effets hémolytiques qui confirment la présence des saponines (Sparg et al., 2004). En outre, il est important de noter que les valeurs de CI_{50} et de CE_{50} , trouvées lors de l'évaluation de l'activité antioxydantes des extraits méthanoliques et aqueux de *J. oxycedrus*, ne dépassent pas 2 mg.mL^{-1} et qu'à une concentration 10 fois plus importante (20 mg.mL^{-1}), le pouvoir hémolytique ne dépassent pas 5 % d'hémolyse. Donc, il peut être prévu que les extraits de cette plante ont une cytotoxicité mineure. Nos résultats sont en accord avec les conclusions de Rengasamy et al. (2013) et Zubair et al. (2013) où les extraits méthanoliques et aqueux, de plusieurs plantes étudiées, ont montré des effets hémolytiques faibles contre les érythrocytes humains.

IV. Conclusion

On peut conclure que, les extraits méthanoliques et aqueux sont les plus riches en composés phénoliques et ont un pouvoir antioxydant important et une cytotoxicité mineure. Les différences de sensibilité parmi les micro-organismes vis-à-vis des extraits de polarité croissante, peuvent être expliquées par la composition de chaque extrait en composés antimicrobiens. Donc, ils peuvent être recommandés comme une source de médicament potentiel et pour la formulation d'agents de conservation à base de plantes.

Chapitre 3.

Analyse par CLHP Orbitrap-MSⁿ des extraits méthanoliques des aiguilles et des écorces de racines de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*

Résumé : Le but de ce chapitre est d'obtenir des profils qualitatifs de la composition en composés phénoliques des extraits méthanoliques des aiguilles et des écorces de racines de *Juniperus oxycedrus* par CLHP Orbitrap-MSⁿ. L'analyse a permis de mettre en évidence la présence de proanthocyanine dimère, de myricétine 3-*O*-glucoside, de quercétine, de rutine et d'amentoflavone dans les aiguilles et de proanthocyanine dimère, trimère et tetramère, de catechine, de quercétine hexose et d'isorhamnétine-3-*O*-glucoside dans les écorces de racines.

I. Introduction

Les composés phénoliques constituent une source importante d'antioxydants, grâce à la présence de nombreux hydroxyles qui peuvent réagir avec les radicaux libres. A cet effet, de nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des composés phénoliques et leurs capacités antioxydantes (Heim et al., 2002; Seyoum et al., 2006).

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques des écorces de racines et des aiguilles de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* est probablement liée à leurs contenus en composés phénoliques. Cela peut être confirmé par la réalisation d'une chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) qui est sans doute la technique d'analyse la plus utilisée pour la caractérisation des extraits en composés phénoliques, car elle présente une haute résolution, une reproductibilité élevée et une durée d'analyse relativement courte (Larbat et al., 2012).

II. Résultats

Notre étude, basée sur des analyses par CLHP enregistrées à 280 nm, a révélé des différences qualitatives dans le profil des composés phénoliques entre les extraits méthanoliques d'aiguilles et des écorces de racines. Ces extraits ont été analysés ensuite par CLHP Orbitrap-MSⁿ en mode d'ionisation positive et négative. Les molécules proposées sont consignées dans les tableaux 17 et 18.

1. Identification des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique des aiguilles

Douze composés phénoliques ont été détectés dans l'extrait méthanolique des aiguilles (figure 60). Ces composés identifiés pourraient être divisés en trois groupes en fonction de leurs relations structurelles (tableau 17).

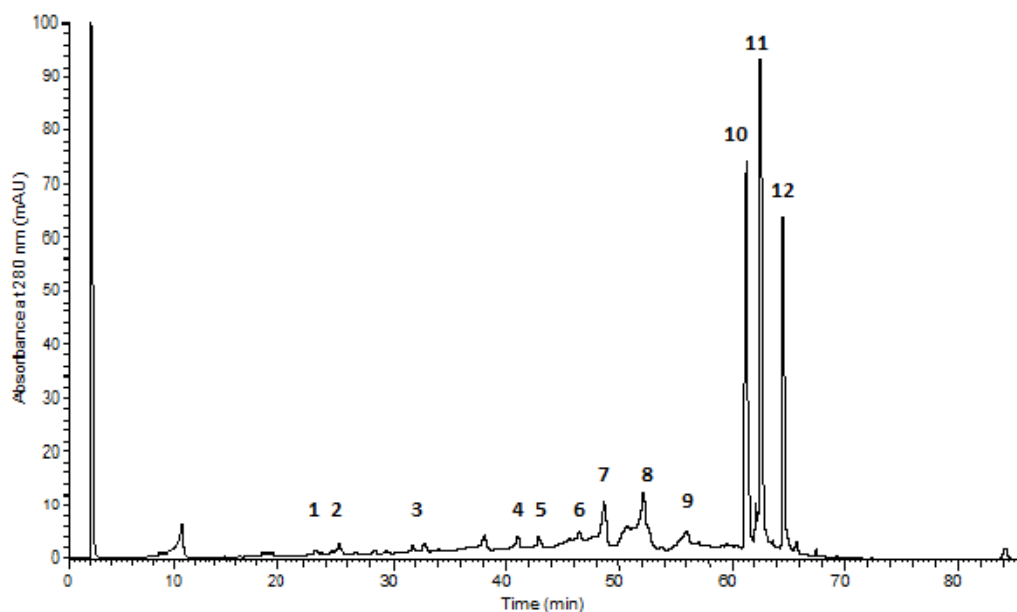


Figure 60: Chromatogramme d'une analyse par CLHP de l'extrait méthanolique des aiguilles de *J. oxycedrus*, enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm.

Tableau 17: Composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-MSⁿ dans l'extrait méthanolique des aiguilles de *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*

Pic	Tr	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻	SM/SM [M-H] ⁻	[M+H] ⁺	SM/SM [M+H] ⁺	Masse exacte calculée	Formule	Molécule proposée	Références
1	23.36	279	577.1326	451 425 407 289	579.149	453 427 409 289	578.1408	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Dimère de proanthocyanidine (B2)	
2	26.87	279	577.1322	425 407	579.1484	427 409 301	578.1403	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Dimère de proanthocyanidine (B2)	Li & Deinzer, 2007; Touriño et al., 2008
3	32.82	279	577.1336	425 407	579.1484	427 409 301	578.1410	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Dimère de proanthocyanidine (B2)	
4	41.69	275	479.0811	317	481.0962	319	480.0886	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	Myricétine 3- <i>O</i> -glucoside	Sawada et al., 2009 ; Touriño et al., 2008
5	42.93	219, 269	479.0809	317	481.0965	319	480.0887	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	Myricétine 3- <i>O</i> -glucoside	
6	46.51	216, 275, 341	463.0863	301	465.1016	303	464.0939	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercétine hexose	Ek et al., 2006 ; Sawada et al., 2009
7	48.7	265, 359	609.1433	449 300	611.1601	465 303	610.1517	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutine	Sawada et al., 2009
8	52.15	256, 348	447.0911	300	449.1067	303	448.0989	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Quercétine-deoxyhexose	Petsalo et al., 2005
9	55.93	216, 275, 341	463.0861	417 285	465.1014	287	464.0937	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercétine hexose	Ek et al., 2006 ; Sawada et al., 2009
10	61.29	231, 271, 332	537.0804	375	539.0957		538.0880	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	Amentoflavone	
11	62.5	235, 269, 336	537.0802	375	539.0962		538.0882	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	Amentoflavone	Sánchez-Rabaneda et al., 2003 ; Miceli et al., 2009
12	64.55	237, 266, 342	537.0804	375	539.0835		538.0820	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	Amentoflavone	

Tr: temps de retention. [M-H]⁻ : mode positif. [M+H]⁺ : mode négatif. SM/SM: Spectroscopie de masse en tandem

1.1. Flavanols

Les composés 1, 2 et 3, sont élués à 23.36, 26.83 et 32.82 min et présentent des masses à m/z 577.1326 en mode négatif $[M-H]^-$ (figure 61) et 579.149 en mode positif $[M+H]^+$ (figure 62). La masse calculée est de m/z 578.1408 ce qui correspond à la formule de $C_{30}H_{26}O_{12}$ caractéristique de proanthocyanidine dimère B2 (2 epi-catéchines liaison 4-8) (Sawada et al., 2009; Touriño et al., 2008).

Le spectre de spectrométrie de masse (SM) permet de détecter un ion fragment à m/z 451 $[M-H]^-$ et à m/z 453 $[M+H]^+$, correspondant à la perte du cycle A (-126). Par ailleurs, les fragments à m/z 425 et 407 $[M-H]^-$ et à m/z 427 et 409 $[M+H]^+$, sont les résultantes de la réaction de rétro Diels-Alder (RDA). Finalement, le signal à 289 indique la libération de l'épi-catéchine.

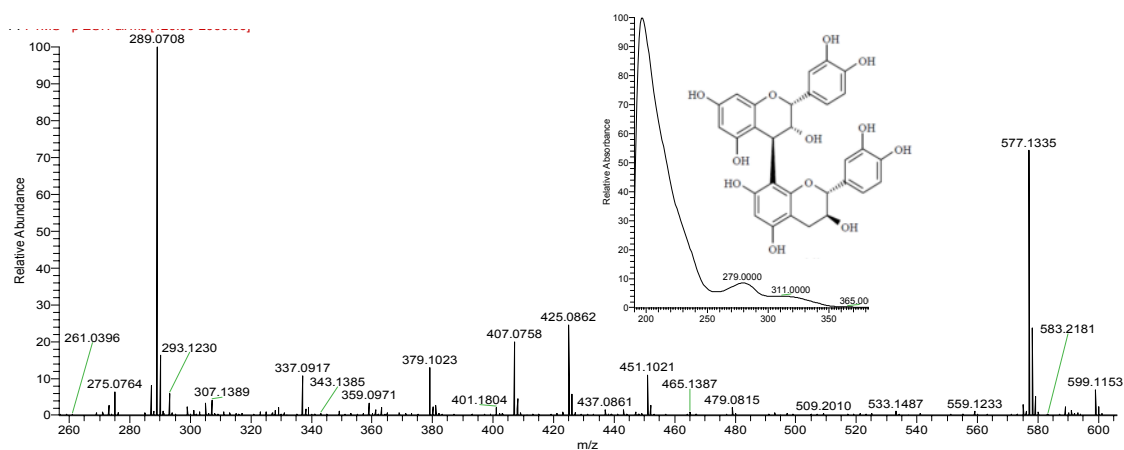


Figure 61: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la proanthocyanidine dimère B2 et de sa fragmentation.

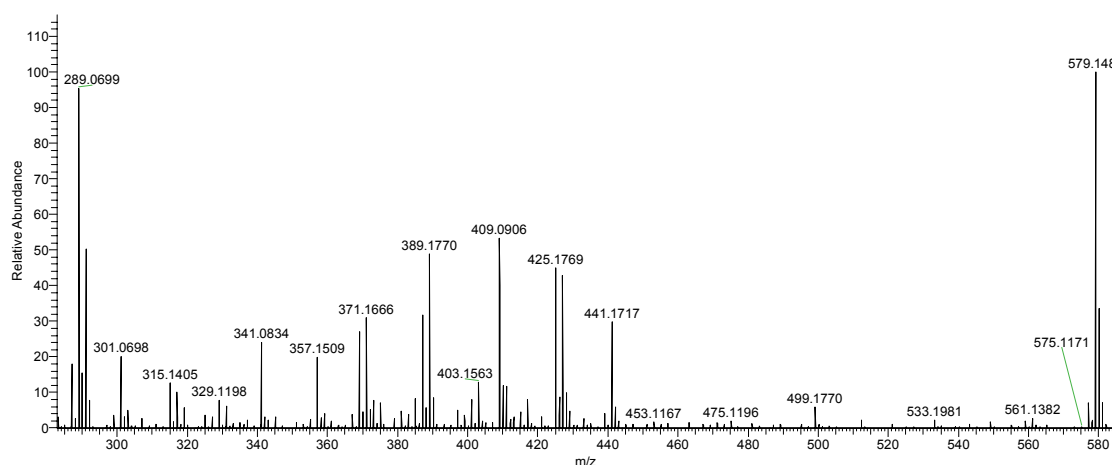


Figure 62: Spectre de masse SM en mode positif de la proanthocyanidine dimère B2 et de sa fragmentation.

1.2. Flavonols

Les composés 4 et 5, sont élués à 41.96 et 42.93 min et présentent des masses à m/z 479.0811 $[M-H]^-$ (figure 63) et à m/z 481.0962 $[M+H]^+$ (figure 64). La masse calculée est de m/z 480.0886 ce qui correspond à la formule de $C_{21}H_{20}O_{13}$ caractéristique de myricétine-3-*O*-glucoside (Sawada et al., 2009; Touriño et al., 2008). En effet, le spectre SM affiche un fragment en mode négatif à m/z 317 et en mode positif à m/z 319, indiquant la libération de la myricétine.

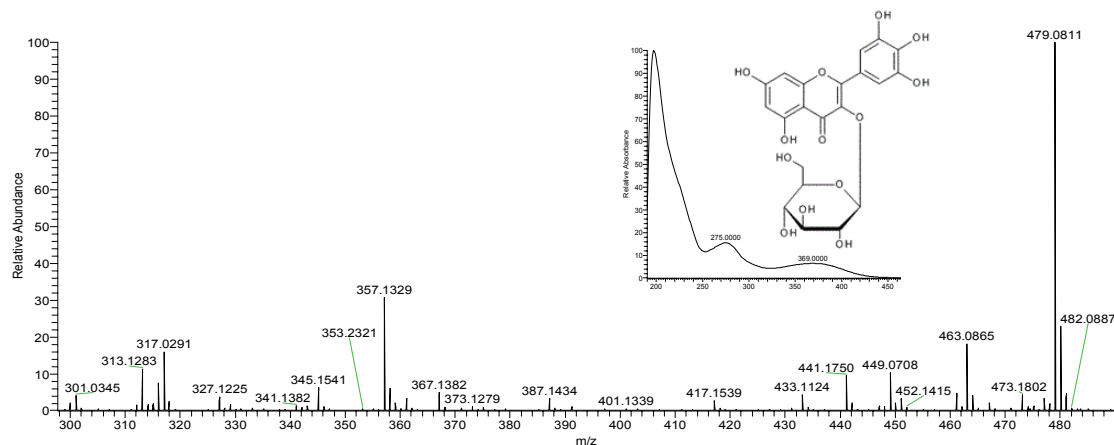


Figure 63: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la myricétine-3-*O*-glucoside et de sa fragmentation.

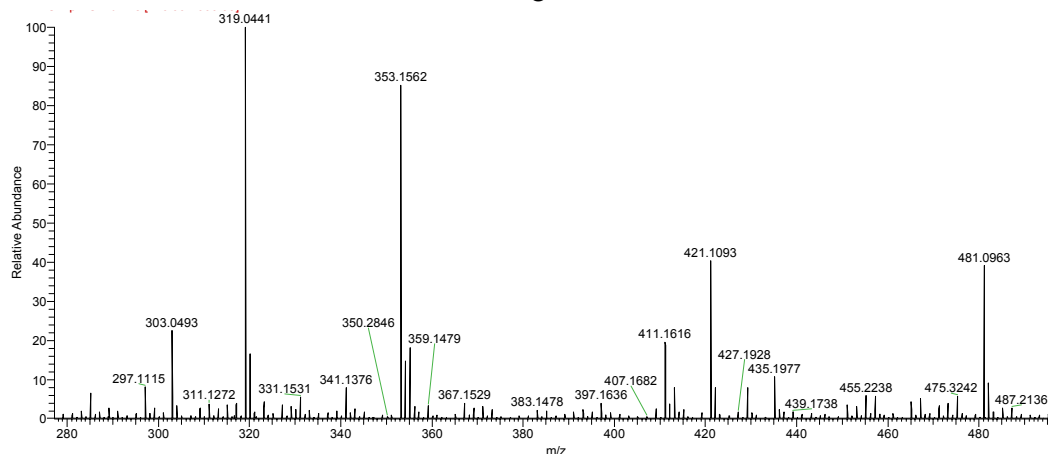


Figure 64: Spectre de masse SM en mode positif de la myricétine-3-*O*-glucoside et de sa fragmentation.

Les composés 6 et 9, sont élués à 46.51 et 55.93 min et présentent des masses à m/z 463.0863 $[M-H]^-$ (figure 65) et à m/z 465.1016 $[M+H]^+$ (figure 66). La masse calculée est de m/z 464.0933 qui correspond à la formule de $C_{21}H_{20}O_{12}$ caractéristique de quercétine hexose (Ek et al., 2006; Sawada et al., 2009). En effet, le spectre SM affiche un ion fragment à m/z 301 $[M-H]^-$ et à m/z 303 $[M+H]^+$ correspondant à la perte de la partie quercétine.

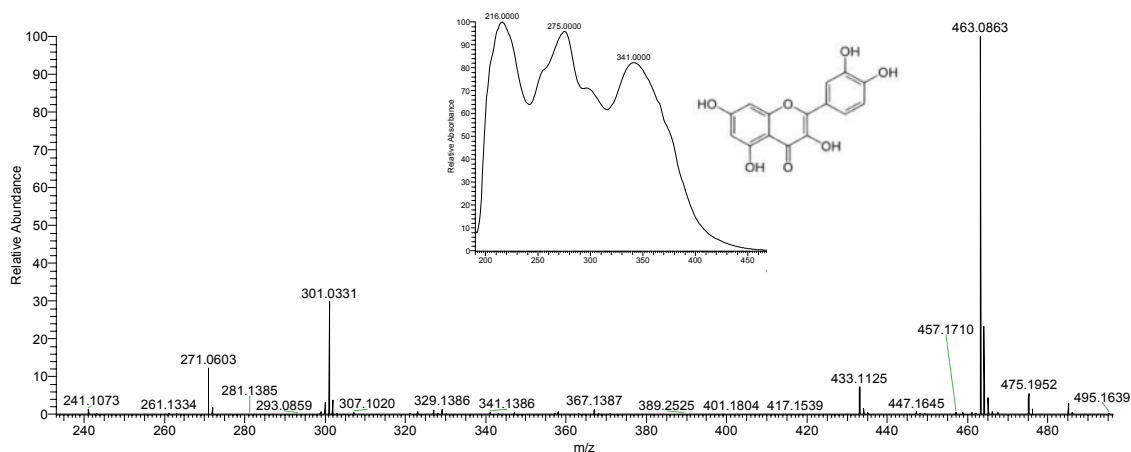


Figure 65: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la quercétine hexose et de sa fragmentation.

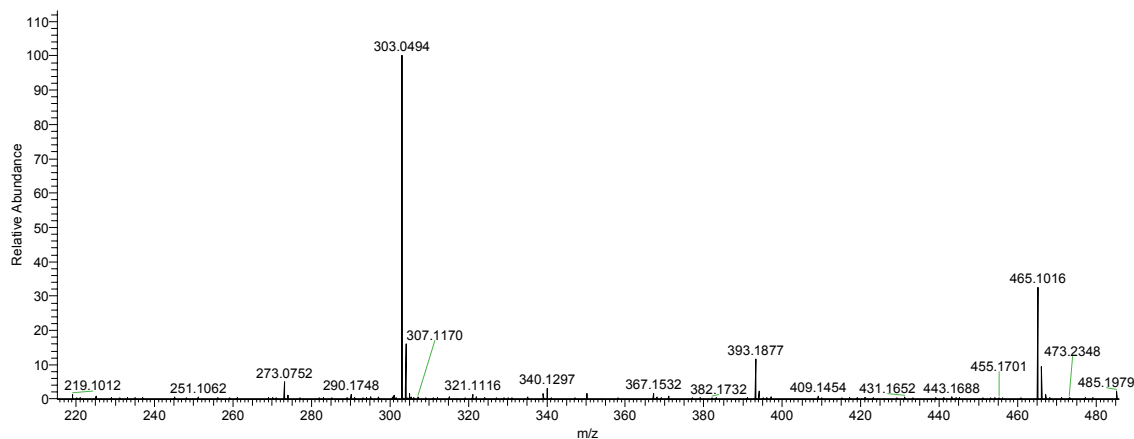


Figure 66: Spectre de masse SM en mode positif de la quercétine hexose et de sa fragmentation.

Le pic 7, détecté à 48.7 min présente un m/z de 609.1434 en $[M-H]^-$ (figure 67) et 611.1597 en $[M+H]^+$ (figure 68), d'où une masse exacte de m/z 610.1517, caractéristiques de la rutine (quercétine-3-*O*-rutinoside), qui correspond à la formule de $C_{27}H_{30}O_{16}$ (Petsalo et al., 2005). Sur les spectres de masse réalisés en deux modes, on observe un ion moléculaire à m/z 301 $[M-H]^-$ et à m/z 303 $[M+H]^+$ correspondant à la perte de la quercétine.

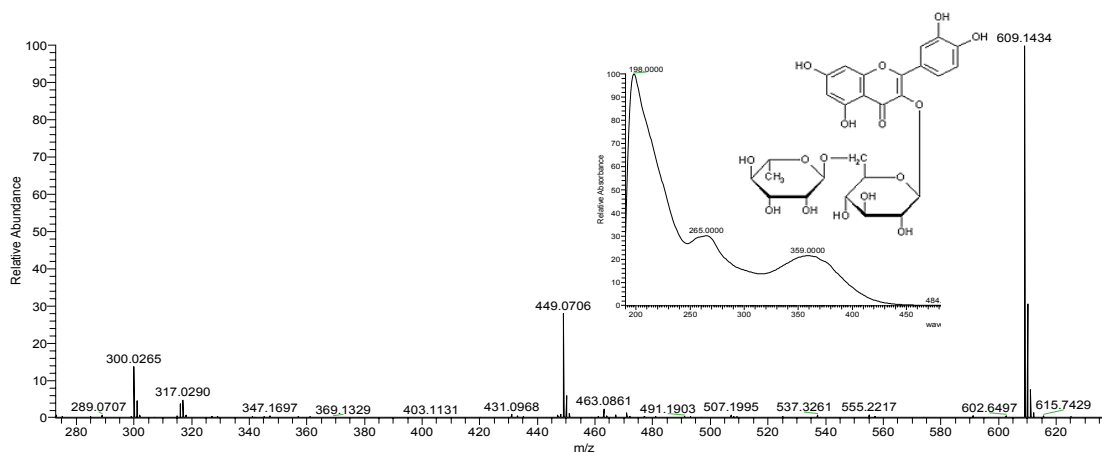


Figure 67: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la rutine et de sa fragmentation.

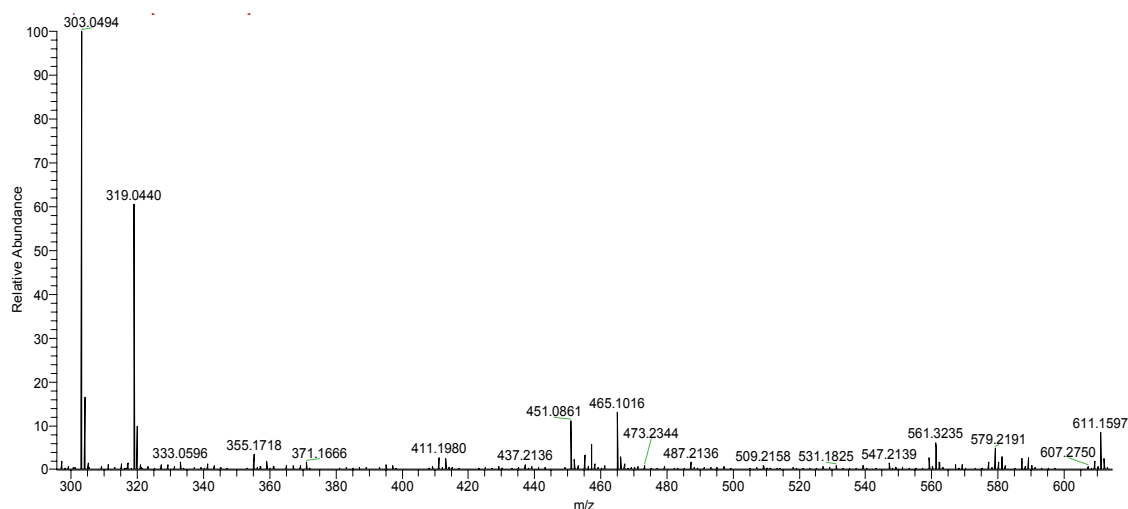


Figure 68: Spectre de masse SM en mode positif de la rutine et de sa fragmentation.

Le pic 8, détecté à 52.15 min présente des masses à m/z 447.0912 $[M-H]^-$ (figure 69) et à m/z 449.1066 $[M+H]^+$ (figure 70), d'où une masse exacte de m/z 448.0989, caractéristiques de la quercétine-deoxyhexose ($C_{21}H_{20}O_{11}$) (Ek et al., 2006 ; Sawada et al., 2009). Sur les spectres de masse réalisés en deux modes, on observe un ion moléculaire à m/z 301 $[M-H]^-$ et à m/z 303 $[M+H]^+$ correspondant à la perte de la quercétine.

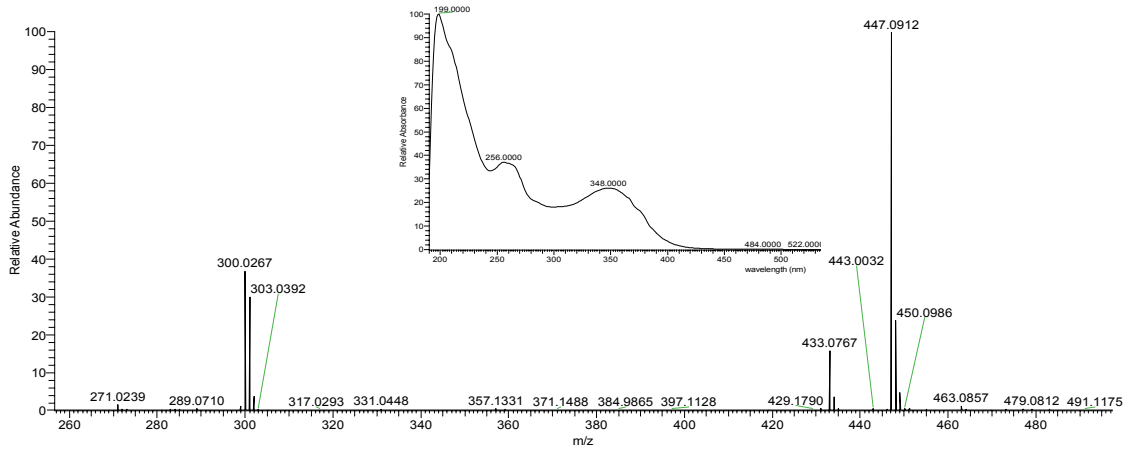


Figure 69: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la quercétine-deoxyhexose et de sa fragmentation.

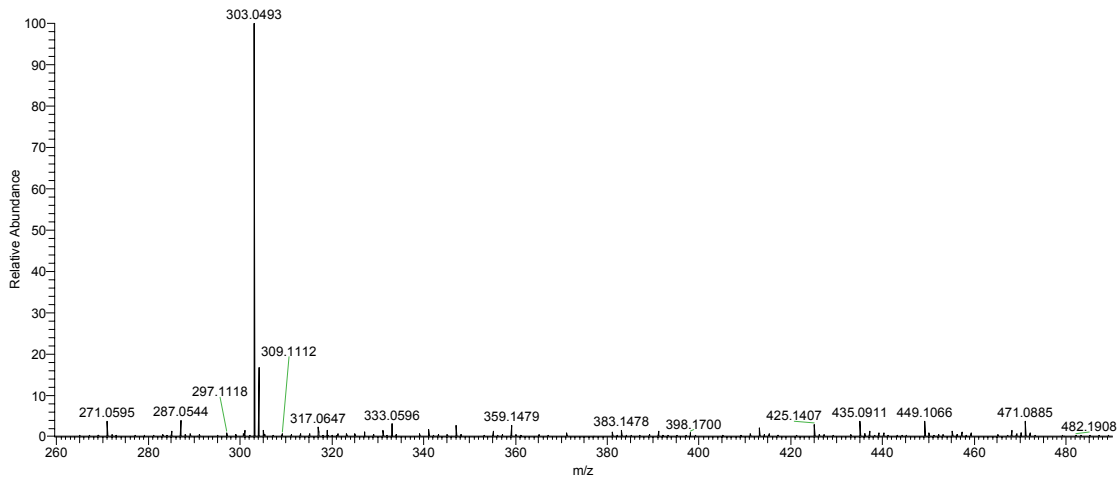


Figure 70: Spectre de masse SM en mode positif de la quercétine-deoxyhexose et de sa fragmentation.

1.3. Biflavones

Les pics 10, 11 et 12 sont les composés majoritaires de l'extrait d'aiguilles de *J. oxycedrus*. Ils sont élués entre 61.29 et 64.55 min, présentent tous des masses à m/z 537.0803 $[M-H]^-$ (figure 71) et à m/z 539.0962 $[M+H]^+$ (figure 72). La masse calculée est de m/z 538.0880 ce qui correspond à la formule de $C_{30}H_{26}O_{10}$ caractéristique d'amentoflavone (Sánchez-Rabareda et al., 2003 ; Miceli et al., 2009). Sur le spectre de masse réalisé en mode négatif, on observe un ion moléculaire à m/z 375.0493 $[M-H]^-$ correspondant à la perte du cycle A et B.

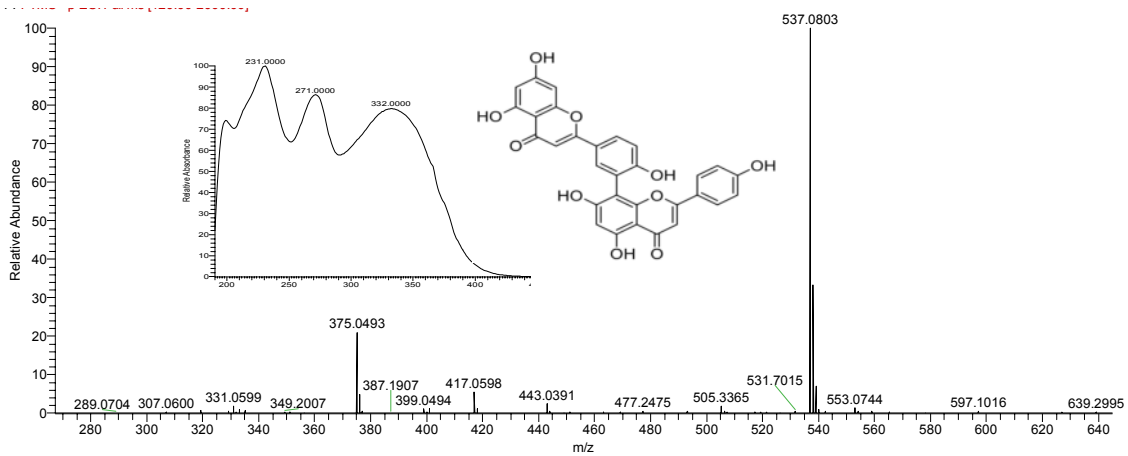


Figure 71: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de l'amentoflavone et de sa fragmentation.

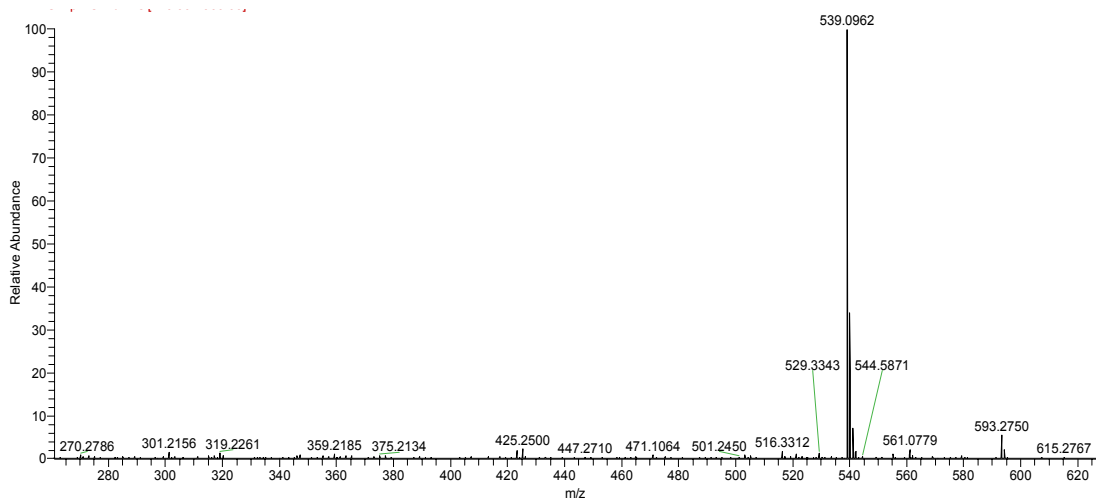


Figure 72: Spectre de masse SM en mode positif de l'amentoflavone et de sa fragmentation.

2. Identification des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique des écorces de racines

Dix sept composés phénoliques ont été détectés dans l'extrait méthanolique des écorces de racines (figure 73). Ces composés identifiés pourraient être divisés en trois groupes en fonction de leurs relations structurelles (tableau 18):

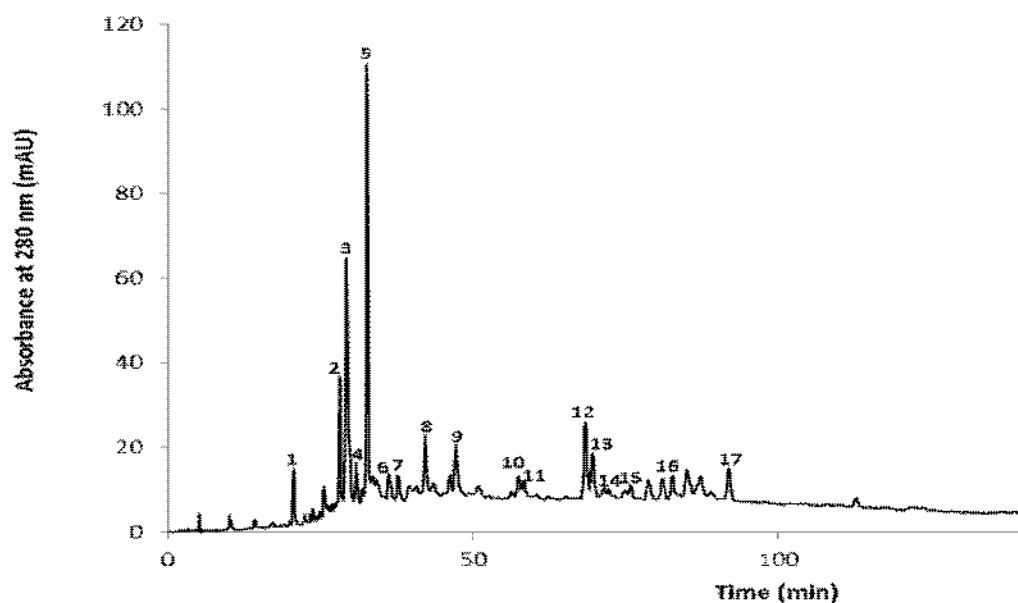


Figure 73: Chromatogramme d'une analyse CLHP de l'extrait méthanolique des écorces de racines de *J. oxycedrus*, enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm.

Tableau 18: Composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-MSⁿ dans l'extrait méthanolique des écorces de racines de *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*

Pic	Tr*	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻	SM/SM [M-H] ⁻	[M+H] ⁺	SM/SM [M+H] ⁺	Masse exacte calculée	Formule	Molécule proposée	Références
1	20.5	279	865.1935	713 695 577 287	867.2129	715 577 579 289	866.2032	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Trimère de Proanthocyanidine	
2	28.2	279	577.1326	451 425 407 289	579.149	453 427 409 289	578.1408	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Dimère de Proanthocyanidine	Li & Deinzer, 2007 ; Tourinho et al., 2008
3	29.1	279	577.1326	451 425 407 289	579.149	453 427 409	578.1408	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Dimère de Proanthocyanidine	
4	32.3	279	865.1935	713 695 577 287	867.2129	715 577 579 289	866.2032	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Trimère de Proanthocyanidine	
5	32.7	279	289.0703	289	291.0857	123 139 165	290.0779	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catechine	Li & Deinzer, 2007
6	36.1	279	865.1935	713 695 577 287	867.2129	715 577 579 289	866.2032	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Trimère de Proanthocyanidine	Li & Deinzer, 2007 ; Tourinho et al., 2008
7	37.9	279	577.1322	425 287 407	579.1484	427 409 301	578.1403	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Dimère de Proanthocyanidine	
8	43.3	279	1153.2557	865 577 289	1155.2765	867 579 291	1154.2671	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	Tetramère de Proanthocyanidine	Li & Deinzer, 2007

9	47.6	279	573.1009	447 285	575.1179	423 395	574.1094	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₂	Biflavone (GB2) ou Hypnumbiflavonoïde A	Sievers et al., 1994
10	56.5	279	1153.2545	865 577 289	1155.2765	867 579 291	1154.2672	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	Tetramère de Proanthocyanidine	Li & Deinzer, 2007
11	57.1	280	573.1007	447 283	575.1183	547 423 395	574.1095	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₂	Biflavone (GB2) ou hypnumbiflavonoïde A	Sievers et al., 1994
12	68.5	264, 365	463.0849	301	465.1017	303 229	464.0933	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercétine hexose	Ek et al., 2006 ; Sawada et al., 2009
13	70.3	279	573.1011	447 283	575.1184	547 423 395	574.1095	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₂	Biflavone (GB2) ou hypnumbiflavonoïde A	Sievers et al., 1994
14	71.2	279	573.1007	447 283	575.1183	547 423 395	574.1095	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₂	Biflavone (GB2) ou hypnumbiflavonoïde A	
15	76.1	255, 355	477.101	314	479.1116	317	478.1062	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Isorhamnétine-3- <i>O</i> - glucoside	Sawada et al. 2009 ; Matsuda et al., 2009
16	79.5	279	573.1007	447 283	575.1183	547 423 395	574.1095	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₂	Biflavone (GB2) ou hypnumbiflavonoïde A	Sievers et al., 1994
17	91.2	255, 305, 372	447.2211	301 151	471.2189 (+Na ⁺)	303	448.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Quercétine -rhamnosyl	Matsuda et al., 2009

* : temps de retention. [M-H]⁻ : mode positif. [M+H]⁺ : mode négatif. SM/SM: Spectroscopie de masse en tandem

2.1. Flavanols

Les pics 1 à 8 et 10, appartiennent à la classe des tanins condensés dont l'unité de base est de flavan-3-ols. Ils sont élués entre 20.5 à 43.3 min et à 56.5 min, avec une absorbance de 279 nm. Sur les spectres de masse réalisés en deux mode, on observe des ions moléculaires à m/z 577.1326, 865.1935, 1153.2557 $[M-H]^-$ (figure 74) et à m/z 579.149, 867.2129, 1155.2765 $[M+H]^+$ (figure 75), d'où des masses exactes respectives de m/z 578.1408, 866.2032, 1154.2671, correspondant aux structures de type proanthocyanidines dimères, trimères et tétramères (Li et Deinzer, 2007; Touriño et al., 2008).

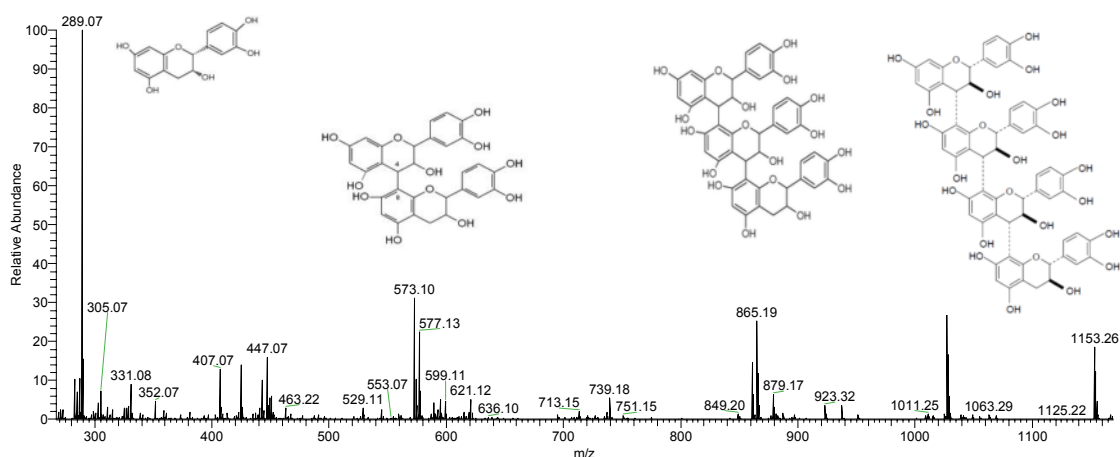


Figure 74: Spectre UV et spectre de masse SM en mode négatif de la proanthocyanidines et de sa fragmentation.

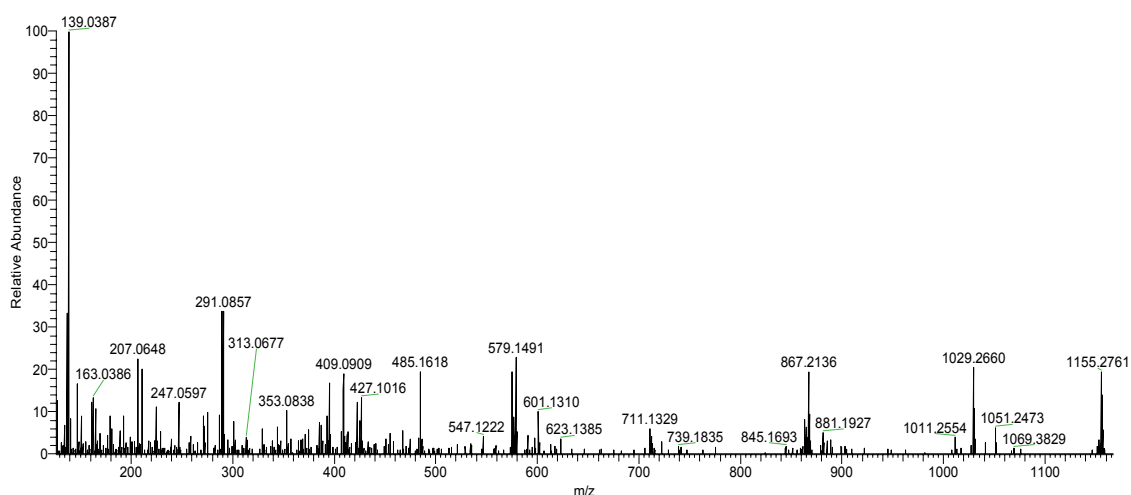


Figure 75: Spectre de masse SM en mode positif de la proanthocyanidines tétramère et de sa fragmentation.

Les pics 1, 4 et 6, sont élués à 46.51 et 55.93 min et présentent des masses à m/z 865.1935 $[M-H]^-$ et à m/z 867.2129 $[M+H]^+$. La masse calculée est de m/z 866.2032 qui correspond à la formule de $C_{45}H_{38}O_{18}$ caractéristique un trimère de proanthocyanidine. En effet, le spectre SM

affiche un ion fragment à m/z 695 $[M-H]^-$ correspondant à une fragmentation de type Rétro Diels- Alder (RDA) au niveau du noyau C d'une des 3 unités catéchines. L'ion fragment à m/z 577 $[M-H]^-$ et m/z 579 $[M+H]^+$ correspond à une fragmentation au niveau de la liaison interflavanique. Les ions fragments à m/z 739, 713 $[M-H]^-$ et m/z 715 $[M+H]^+$ sont également typiques de ce tanin. L'ion fragment à m/z 289 $[M-H]^-$ indique la libération de l'épicatéchine.

Les pics 8 et 10 présentent une masse égale à m/z 1153.2557 $[M-H]^-$ (figure 74) et à m/z 1155.2765 $[M+H]^+$ (figure 75), correspondant à un tétramère de proanthocyanidine ($C_{60}H_{50}O_{24}$). En effet, le spectre SM affiche des ions fragments à m/z 865, 577 et 289 $[M-H]^-$ correspond à des fragmentations au niveau de la liaison de l'épicatéchine.

Les pics 2, 3 et 7 présentent une masse égale à m/z 577.1326 $[M-H]^-$ et à m/z 579.149 $[M+H]^+$, il s'agit de dimères de proanthocyanidine.

Le pic 5, détecté à 32.7 min possède une masse de m/z 289.0703 $[M-H]^-$ et 291.0857 $[M+H]^+$, une masse exacte prévue à 290,0779 qui correspond à la $C_{15}H_{14}O_6$, à une absorption à 279 nm, il s'agit donc d'un catéchine (Li et Deinzer, 2007).

2.2. Biflavones

Les pics 9, 11, 13, 14 et 16 présentent une masse égale à m/z 573.1007 $[M-H]^-$ et à m/z 575.1183 $[M+H]^+$, d'où une masse exacte de m/z 574.1095, correspond à la formule $C_{30}H_{22}O_{12}$. Sur la base de ces données, il n'est pas possible de définir cette formule. Au mieux, on déduit des hypothèses, c'est un biflavone GB2 (dimère flavone), un hypnumbiflavonoïde A (Sievers et al., 1994) ou autres. Cependant, des analyses structurales supplémentaires par RMN seraient nécessaires pour les identifier correctement.

2.3. Flavonols

Un composé de ce chromatogramme, a été élué à 68.5 nm (Le pic 12) avec des absorbances de 264 et 365 nm, qui correspondent au quercétine hexose (Ek et al., 2006 ; Sawada et al., 2009). Sur les spectres de masse réalisés en mode négatif et en mode positif, on observe un ion moléculaire à m/z 463.0849 $[M-H]^-$ et à m/z 465.1017 $[M+H]^+$, d'où une masse atomique exacte de m/z 464.0933. Le spectre SM affiche également un ion fragment à m/z 301 $[M-H]^-$ et à m/z 303 $[M+H]^+$ correspondant à la perte de la partie glycane.

Le pic 15 présente une masse égale à m/z 477.101 $[M-H]^-$ et à m/z 479.1116 $[M+H]^+$, d'où une masse atomique exacte de m/z 478.1062. Il s'agit d'isorhamnétine-3-*O*-glucoside (figure 76). En effet, le spectre SM affiche des ions fragments à m/z 314 $[M-H]^-$ et 317 $[M+H]^+$ correspondant à la perte de la partie glycanne (Matsuda et al., 2009 ; Sawada et al. 2009).

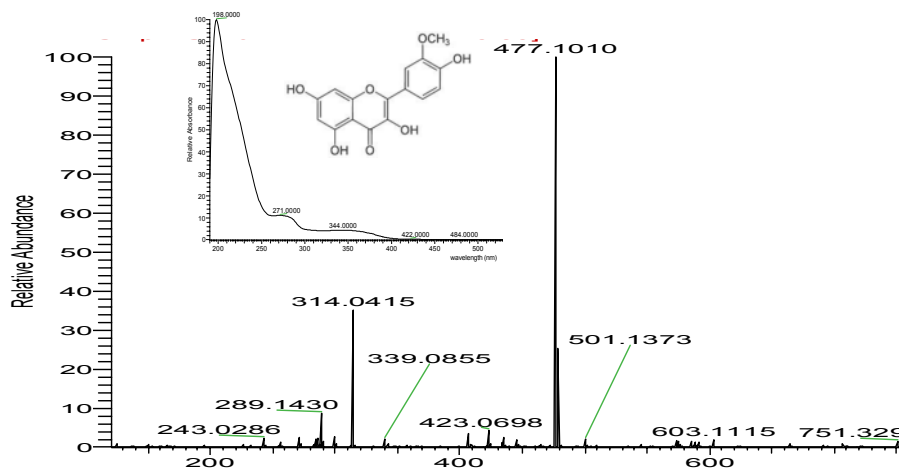


Figure 76: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside et de sa fragmentation.

Le pic 17 présente une masse égale à m/z 447.2211 $[M-H]^-$ et à m/z 471.2189 $[M+H+Na]^+$, d'où une masse atomique exacte de m/z 448.22. Il s'agit de quercétine-rhamnosyl (Matsuda et al., 2009). En effet, le spectre SM affiche des ions fragments à m/z 301 $[M-H]^-$ et 303 $[M+H]^+$ correspondant à la perte de la partie glycanne oxydé.

III. Discussion

La présence des flavonols, flavanols et biflavones dans les aiguilles de *J. oxycedrus* subsp *oxycedrus* est confirmée par les travaux de Stassi et al. (1998) et Tavares et al. (2012), qui ont déjà identifié le dimère de proanthocyanine, l'amentoflavone et trois flavonols. La présence d'amentoflavone, de la rutine et de la quercétine hexose, a été signalée par les travaux réalisés sur les baies de trois espèces différentes à savoir, *J. oxycedrus*, *J. drupacea* et *J. communis* (Innocenti et al., 2007; Miceli et al., 2011; Taviano et al., 2013).

Aucun travail antérieur n'a été trouvé sur l'identification des composés phénoliques dans les écorces de racines. L'analyse par CLHP Orbitrap-MSⁿ, réalisée dans ce travail, révèle une grande diversité d'oligomères de proanthocyanidine, rarement détectés dans les baies et les aiguilles de quelques espèce du même genre (Innocenti et al., 2007; Miceli et al., 2011; Lesjak et al., 2013; Taviano et al., 2013).

Certains chercheurs ont indiqué qu'il y a une relation entre les structures chimiques des composés phénoliques et l'activité antioxydante. Les hydroxyles sont des donneurs d'hydrogène et d'électrons, conduisant à des espèces beaucoup plus stables. Leur configuration au niveau du noyau B (figure 6), est le paramètre structural le plus déterminant pour l'activité antioxydante. De même la présence d'une fonction catéchol (motif orthodiphénol) sur ce cycle est étroitement corrélée à une activité antioxydante importante. La capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux dépend fortement de la présence d'un groupement hydroxyle libre en position 3 de l'hétérocycle C (figure 20). La présence d'un groupement hydroxyle en position 5, peut aussi contribuer à l'activité antioxydante dans le cas des Flavones, flavonols (figure 8) et flavanols (figure 10) (Heim et al., 2002; Khlebnikov et al., 2007; Wolfe et Liu, 2008).

Dans le cas de flavones et flavonols, la conjugaison des cycles A, B et C, permet une bonne stabilisation du radical phénoxy (Rice-Evans et al., 1996; Musialik et al., 2009). La majorité des recherches effectuées indiquent que les molécules possédant des doubles liaisons entre les carbones C₂- C₃ et à la fonction carbonyle en C₄ du cycle C (Figure 8), sont plus actives que celles qui sont dénuées de l'une, ou de l'autre, ou des deux (Rice-Evans et al., 1996; Burda, 2001; Sekher Pannala, 2001). C'est le cas de la quercétine (flavonol), qui a montré une meilleure activité antioxydante par rapport à la taxifoline (flavanonol) (Van Acker et al., 1996; Burda et al., 2001), et à la catéchine (flavanol) (Rice-Evans et al., 1996).

Cependant, la *O*-glycosylation ou la *O*-méthylation de groupements hydroxyles conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante des flavonols (Dugas et al., 2000). Cette diminution peut s'expliquer par un effet stérique qui modifie la planéité du flavonoïde, et par

suite sa capacité à délocaliser les électrons. Bien qu'il ne soit pas possible d'établir un lien direct entre le nombre de substituants méthoxyles, hydroxyles et l'activité antioxydante d'un flavonoïde, on peut noter que la méthylation d'un hydroxyle du cycle B est particulièrement défavorable à l'activité antioxydante (Burda et al., 2001; Ma et al., 2007; Musialik et al., 2009).

Toutes ces suggestions nous mènent à comprendre la bonne activité antioxydante des extraits des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus*. Les deux parties de la plante contiennent les mêmes familles de composés phénoliques, flavan-3-ol, flavonols et flavones, ce qui leur confère e les hydroxyles et les conjugaisons qui permettent une excellente activité. La meilleure activité de l'extrait des écorces de racines est probablement due au fait qu'il contient plus de tanins en particulier l'épicatéchine, qui sont réputés pour leurs forts pouvoirs antioxydants (Mendoza-Wilson et al., 2006; Iacopini et al., 2008; Saito et al., 2009; Ruijters et al., 2013). La teneur importante en tanins a été révélée par le dosage spectrophotométrique et est confirmée par le nombre important des pics de dimères, trimères et tétramères de proanthocyanidines. Concernant l'extrait d'aiguilles, le nombre moins important des pics de dimères proanthocyanidines, ainsi que les glycolysations des flavonls et la méthylation du biflavone, ont peut être conduit à la diminution de cette activité, par rapport aux écorces de racines. Ainsi, il semble important non seulement de détecter et identifier les différents composés phénoliques présents dans cette plante mais également de les quantifier.

Conclusion Générale

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Leur utilisation est en progression constante, étant donné la toxicité et les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse. Dans ce contexte, on s'est intéressé à évaluer les activités antioxydantes et antimicrobiennes de quelques plantes médicinales. Il s'agit d'*Echium pycnanthum* Pomel., de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, de *Prasium majus* L., et de *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce., utilisées dans la pharmacopée traditionnelle de notre région, pour le traitement de plusieurs maladies.

Les résultats du premier chapitre montrent que parmi les sept extraits hydro-méthanoliques préparés par macération, ceux des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* sont les plus riches en composés phénoliques, suivis par celui de *P. majus*. De même, ces extraits ont une activité antioxydante importante. La meilleure activité est obtenue en piégeant le radical DPPH[·], avec des valeurs de CI₅₀ de 2.9 µg.ml⁻¹ pour les écorces de racines et de 10.95 µg.ml⁻¹ pour les aiguilles. Ils sont aussi les plus actifs contre quelques bactéries et contre *Candida albicans*. Les souches bactériennes les plus sensibles sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*. Cependant, tous les extraits ne montrent aucune activité vis-à-vis de toutes les souches de moisissures.

Dans le deuxième chapitre, ce sont les aiguilles et les écorces de racines de *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, les plus riches en composés phénoliques et les plus puissants comme antioxydant et antibactérien, qui ont été sélectionnés pour évaluer les activités de leurs extraits préparés par des solvants de polarité croissante (Hexane, dichlorométhane, méthanol, eau). Les résultats des dosages montrent que les extraits méthanoliques et aqueux, sont les plus riches en composés phénoliques, en particulier ceux des écorces de racines. Concernant l'activité antioxydante, tous les tests réalisés ont révélé que les extraits méthanoliques sont les plus actifs, suivis par ceux aqueux. L'extrait méthanolique des écorces de racines a montré la plus grande efficacité, même par rapport aux antioxydants de synthèse. Sa valeur de CI₅₀, en piégeant le radical DPPH[·], est de 1.07 µg.ml⁻¹. Cependant, dans le test de la chélation de fer, aucun des extraits n'a montré une meilleure activité par rapport à l'antioxydant de synthèse (EDTA). Des corrélations linéaires significatives, entre les teneurs en flavonoïdes et les différents tests, ont été trouvées. Les tests de l'activité antimicrobienne ont révélé quelques résultats intéressants. Ce sont les extraits méthanoliques qui ont montré le plus d'efficacité avec une valeur de CMI de 0.78 mg.ml⁻¹ contre *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*,

Bacillus cereus et *Staphylococcus aureus*. Les extraits aqueux sont totalement inactifs, alors que ceux de l'hexane et du dichlorométhane ont montré une activité contre *C. albicans* avec des valeurs respectives de CMI de 0.39 mg.ml^{-1} et 0.78 mg.ml^{-1} . Les pourcentages d'hémolyse des extraits méthanoliques et aqueux, vis-à-vis des érythrocytes humains, sont inférieurs à 5%, ce qui les caractérise par une cytotoxicité mineure.

L'analyse par CLHP Orbitrap-MSⁿ, des composés phénoliques dans les extraits méthanoliques de *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, a permis l'identification de la proanthocyanine dimère, la myricétine-3-*O*-glucoside, la quercétine, la rutine et l'amentoflavone dans les aiguilles et de la catechine, la quercétine hexose, l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside, la quercétine -rhamnosyl, la proanthocyanine dimère, trimère et tetramère dans les écorces de racines de cette plante.

D'après ces résultats, on conclut que les solvants polaires, notamment le méthanol, semblent être parmi les meilleurs solvants à utiliser pour extraire les substances phénoliques et que les extraits les plus riches en ces composés révèlent un pouvoir antioxydant important. Ces résultats ne constituent bien évidemment qu'une première étape de recherche des molécules biologiquement actives.

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- Isoler les molécules contenues dans les extraits actifs de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*;
- Tester les molécules isolées, *in vivo*, sur différents modèles biologiques, afin de trouver une application thérapeutique ou en agro-alimentaire.
- Étudier la cytotoxicité de ces molécules afin de confirmer ou d'infirmier l'activité attribuée à cette plante.

Références bibliographiques

1. Abdille MH, Singh RP, Jayaprakasha GK, Jena BS, 2005. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chemistry*, 90(4): 891-896.
2. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A, 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4): 324-329.
3. Ahmad M, Yousuf S, Khan MB, Hoda MN, Ahmad AS, Ansari MA, Ishrat T, Agrawal AK, Islam F, 2006. Attenuation by *Nardostachys jatamansi* of 6 hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical, and immunohistochemical studies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83(1): 150-160.
4. Akkol EK, Güvenç A, Yesilada E, 2009. A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(2): 330-336.
5. Albrecht A, Vovk I, Simonovska B, Srbinoska M, 2009. Identification of shikonin and its ester derivatives from the roots of *Echium italicum* L. *Journal of Chromatography*, 1216(15):3156-62.
6. Aljabre SHM, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A, 2005. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3): 116-119.
7. Al-Mustafa AH, Al-Thunibat OY, 2008. Antioxidant Activity of Some Jordanian Medicinal Plants Used Traditionally for Treatment of Diabetes. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(3): 351-358.
8. Andersen MØ, Markham KR, 2006. FLAVONOIDS, Chemistry, Biochemistry and Applications. Natural Products from Plants. Edition Taylor & Francis Group, LLC.
9. Arbos KA, Claro LM, Borges L, Santos CAM, Weffort-Santos AM, 2008. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*, 28(7): 457-463.
10. Armania N, Yazan LS, Musa SN, Ismail IS, Foo JB, Chan KW, Husain N, Hisyam AH, Ismail M, 2013. *Dillenia suffruticosa* exhibited antioxidant and cytotoxic activity through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(2): 525-535.
11. Assimopoulou AN, Boskou D, Papageorgiou VP, 2004. Antioxidant activities of alkannin, shikonin and *Alkanna tinctoria* root extracts in oil substrates. *Food Chemistry*, 87(3): 433-438.
12. Atik Bekkara F, Benhammou N, Panovska K, 2008. Biological activity of essential oil and the extract of the phenolic compounds of *Inula viscosa* of the area of Tlemcen (Algeria). *Advances in Food Science*, 30(3): 132-139.
13. Avissar N, Whitin JC, Allen PZ, Wagner DD, Liegey P, Cohen HJ, 1989. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase: Cell of origin and secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 264(27): 15850-15855.
14. Bamm J, Douira A, 2002. Les plantes médicinales dans la forêt de l'achach (plateau central, maroc). *Acta Botanica Malacitana*, 27: 131-145.
15. Batovska D, Parushev S, Stamboliyska B, Tsvetkova I, Ninova M, Najdenski H, 2009. Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial

- activity was predicted. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(5): 2211-2218.
16. Benchelah AC, Bouziane H, Maka M, 2004. Fleurs du Sahara, arbres et arbustes, voyage au cœur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. *Phytothérapie*, 2(6): 191-197.
17. Bernard B, 2001. Plantes médicinales du monde: réalités & croyances. Edition ESTEM. Paris. p. 205.
18. Biyiti LF, Meko'o DJL, Tamze V, Amvam ZPH, 2004. Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Traditional pharmacology and medicine in Africa*. 13: 11-20.
19. Bouhlal K, Meynadier JM, Peyron JL, Peyron L, Marion JP, Bonetti G, Meynadier J, 1988. Le cade en dermatology. *Parfums, Cosmétiques et Aromes*, 83: 73-82.
20. Bruneton J, 2009. Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, 4^{ème} Edition. Paris.
21. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, 2001. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(6): 2774-2779.
22. Castro L, Freeman BA, 2001. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, 17(2): 295-307.
23. Chandrasekara A, Shahidi F, 2011. Inhibitory activities of soluble and bound millet seed phenolics on free radicals and reactive oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (1): 428-436.
24. Chaouche TM, Haddouchi F, Atik-Bekkara F, 2012. Identification of shikonin from the roots of *Echium pycnanthum* Pomel. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3): 1-3.
25. Chavan UD, Shahidi F, Naczki M, 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75(4): 509-512.
26. Chia-Jung L, Lih-Geeng C, Ting-Lin C, Wei-Ming K, Ying-Fei L, Ching-Chiung W, 2011. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food Chemistry*, 124 (3): 833-841.
27. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ, 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2): 213-220.
28. Çimen MYB, 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 390(1-2): 1-11.
29. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61(1):71-76.
30. Cowan MM, 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582.
31. Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber SL, Duke JA, Brielmann HL, 2006. Natural Products from Plants. 2^{ème} Edition. Taylor & Francis Group, LLC.
32. Cushnie TPT, Hamilton VES, Chapman DG, Taylor PW, Agneau AJ, 2007. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with

- the antibacterial flavonol galangin. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5): 1562-1567.
33. Daglia M, 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2): 174-181.
34. DeGraft-Johnson J, Kolodziejczyk K, Krol M, Nowak P, Krol B, Nowak D, 2007. Ferric Reducing Ability Power of Selected Plant Polyphenols and their Metabolites: Implications for Clinical Studies on the Antioxidant Effects of Fruits and Vegetable Consumption. *Basic & Clinical pharmacology & Toxicology*, 100(5): 345-352.
35. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH, 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(10): 3010-3014.
36. Dewick PM, 1995. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 12(6): 579-607.
37. Dixon RA, Xie DY, Sharma SB, 2005. Proanthocyanidins-A final frontier in flavonoid research?. *New Phytologist*, 165(1): 9-28.
38. Dugas AJ Jr, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW, 2000. Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure-activity L. relationships, *Journal of Natural Products*, 63(3): 327-331.
39. Dupont F, Guignand JL, 2007. Botanique: Systématique moléculaire. 14^{ème} Edition, Masson, Paris France. p. 188.
40. Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR, 2008. Iron chelating activity screening, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7(18): 3188-3192.
41. Ek S, Kartimo H, Mattila S, Tolonen A, 2006. Characterization of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26): 9834-9842.
42. El-Kamali HH, 2001. Larvicidal Activity of Crude Aqueous Extracts of *Solenostemma argel* Against Mosquito Larvae. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 8(4): 83-86.
43. Engels C, Schieber A, Gänzle MG, 2011. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7): 2215-2223.
44. Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G, Bazzocchi IL, 2009. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from Piper species. *Phytochemistry*, 70(5): 621-627.
45. Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE, Kozukue N, 2006. Antimicrobial activities of tea catechins and the aflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 69(2): 354-361.
46. Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I, 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3): 898-904.
47. Gescher K, Hensel A, Hafezi W, Derksen A, Kühn J, 2011. Oligomeric proanthocyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of herpes simplex virus type-1. *Antiviral Research*, 89(1): 9-18.

48. Gritz DC, Srinivasan M, Smith SD, Kim U, Lietman TM, Wilkins JH, Priyadharshini B, John RK, Aravind S, Prajna NV, Duraisami TR, Whitcher JP, 2006. The Antioxidants in Prevention of Cataracts Study: effects of antioxidant supplements on cataract progression in South India. *British Journal of Ophthalmology*, 90(7): 847-851.
49. Gülçin I, 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3): 345-391.
50. Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali Y, Ksouri R, Attou A, Benmansour A, 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chemistry*, 141(1): 253-258.
51. Hadj-Salem J, Chevalot I, Harscoat-Schiavo C, Paris C, Fick M, Humeau C, 2011. Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives. *Food Chemistry*, 124(2): 486-494.
52. Halliwell B, 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, 52(8): 253-265.
53. Hammiche V, Maiza K, 2006. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3): 358-367.
54. Harborne JB, 1998. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition.
55. Hassan HA, Hamed AI, El-Emary NA, Springuel IV, Mitome H, Miyaoka H, 2001. Pregnene derivatives from *Solenostemma argel* leaves. *Phytochemistry*, 57(4): 507-511.
56. Hassan HA, Kame MS, Mohamed MH, Ohtan K, Yamasak K, 2000. Monoterpene and pregame glucoside from *Solenostemma argel*. *Phytochemistry*, 53(8): 937-940.
57. Hegazi AG, El Enbaawy ML, Abd El-Hady FK, Ata NS, 1994. Studies for determining anti microbial activity of *Solenostemma argel* (Del.) Hayne. 3- Extraction with petroleum ether and ether. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association*, 54(5): 401-411.
58. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ, 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10): 572-584.
59. Hider RC, Liu ZD, Khodr HH, 2001. Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymology*, 335:190-203.
60. Hochberg M, Kohen R, Enk CD, 2006. Role of antioxidants in prevention of pyrimidine dimer formation in UVB irradiated human HaCaT keratinocytes. *Biomedical of Pharmacother*, 60(5): 233-237.
61. Hopkins WG, 2003. Physiologie végétale. Edition De Boeck & Larcier. p 515.
62. Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L, 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8):589-598.
63. Innocenti M, Michelozzi M, Giaccherini C, Ieri F, Vincieri FF, Mulinacci N, 2007. Flavonoids and Biflavonoids in Tuscan Berries of *Juniperus communis* L.: Detection and Quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16): 6596-6602.
64. Inoue K, Garner C, Ackermann BL, Oe T, Blair IA, 2006. Liquid chromatography / tandem mass spectrometry characterization of oxidized amyloid beta peptides as potential biomarkers of

- Alzheimer's disease. *Rapid Communications of Mass Spectrometry*, 20(5): 911-918.
65. Ito C, Itoigawa M, Onoda S, Hosokawa A, Ruabgrungsi N, Okuda T, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H, 2005. Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti-tumor promoting effect. *Phytochemistry*, 66(5): 567-572.
66. Jong PL, Young CS, Jin WK, Chung HK, Jae SE, Kang HL, Dae KK, 2002. Free Radical Scavengers from the Heartwood of *Juniperus chinensis*. *Archives of Pharmacal Research*, 25(4): 449-452.
67. Jonkov S, Naidenov G, 1974. *Juniper* bath treatment of the neurasthenic neurosis. *Folia Medica (Plovdiv)*, 16(5-6): 291-296.
68. Kamel MS, 2003. Acylated phenolic glycosides from *Solenostemma argel*. *Phytochemistry*, 62(8): 1247-1250.
69. Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Sengül M, Adıgüzel A, 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 85(2-3): 231-235.
70. Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT, 2007. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(4): 1749-1770.
71. Kim JH, Campbell BC, Mahoney N, Chan KL, Molyneux RJ, Balajee A, 2010. Augmenting the activity of antifungal agents against aspergilli using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. *Fungal Biology*, 114(10): 817-824.
72. Kim JY, Lim H J, Lee DY, Kim DH, Jeon R, Ryu JH, 2009. *In vitro* anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(3): 937-940.
73. Klimko M, Boratynska K, Montserrat JM, Didukh Y, Romo A, Gomez D, Kluza-Wieloch M, Marcysiak K, Boratynski A, 2007. Morphological variation of *Juniperus oxycedrus* subsp. *Oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean region. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 202(2): 133-147.
74. Koerfgen G, 1964. On the treatment of psoriasis. *Zeitschrift für Haut- und Geschlechtskrankheiten*, 36: 254-255.
75. Koleva II, Teris AB, Jozef PH, Linssen AG, Lyuba NE, 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemistry Analysis*, 13(1): 8-17.
76. Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Hamdi B, Chaieb K, Bakhrouf A, Magné C, Abdelly C, 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8): 2083-2091.
77. Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdelly C, 2008. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus biologies*, 331(11): 865-873.
78. Ksouri R, Megdiche Ksouri W, Jallali I, Debez A, Magné C, Hiroko I, Chedly Abdelly, 2012. Medicinal halophytes: potent source of health

- promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4): 289-326
79. Kubata BK, Nagamune K, Murakami N, Merkel P, Kabututua Z, Martin SK, Kalulug TM, Mustakuk H, Hoshida M, Ohnishi-kameyama M, Kinoshita T, Duszenko M, Uradea Y, 2005. *Kola acuminata* proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against trypanosome brucei. *International Journal for Parasitology*, 35(1): 91-103.
80. Kubola J, Siriamornpun S, 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food chemistry*, 110(4): 881-890.
81. Kuruüzüm-Uz A, Güvenalp Z, Ströck K, Demirezer LO, Zeeck A, 2004. Phytochemical and antimicrobial investigation of *Echium vulgare* growing in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(9): 833-836.
82. Kusari S, Zuhlke S, Spiteller M, 2010. Chemometric evaluation of the anticancer pro-drug podophyllotoxin and potential therapeutic analogues in *Juniperus* and *Podophyllum* species. *Phytochemical Analysis*, 22(2): 128-143.
83. Larbat R, Le Bot J, Bourgaud F, Robin C, Adamowicz S, 2012. Organ-specific responses of tomato growth and phenolic metabolism to nitrate limitation. *Plant Biology*, 14(5), 760-769.
84. Le Cren F, 2004. les antioxydants, la révolution du XXI^e siècle, 2^{ème} édition.
85. Lee JY, Cho PY, Kim TY, Kang SY, Song KY, Hong SJ, 2002. Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(5): 1238-1244.
86. Lesjak MM, Beara IN, Orcic DZ, Anackov GT, Balog KJ, Franciškovic MM, Mimica-Dukic NM, 2011. *Juniperus sibirica* Burgsdorf as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chemistry*, 124(3): 850-856.
87. Lesjak MM, Beara IN, Orcic DZ, Risti JD, Anackov GT, Bozin BN, Mimica-Duki NM, 2013. Chemical characterisation and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd. 1806. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2): 530-539.
88. Lewis K, Ausubel FM, 2006. Prospects for plant derived antibacterials. *Nature Biotechnology*, 24(12): 1504-1507.
89. Li HJ, Deinzer ML, 2007. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Analytical Chemistry*, 79(4): 1739-1748.
90. Liu F, Ooi VE, Chang ST, 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, 60(10): 763-771.
91. Liu L, Sun Y, Laura T, Liang X, Ye H, Zeng X, 2009. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. *Food Chemistry*, 112(1): 35-41.
92. Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Saab AM, Statti GA, Menichini F, 2007. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food chemistry*, 105(2): 572-578.
93. Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M, 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by

- complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472: 142-152.
94. Ma XM, Liu Y, Shi YP, 2007. Phenolic derivatives with free-radical-scavenging activities from *Ixeridium gracile* (DC.) SHIH. *Chemistry & Biodiversity*, 4(9): 2172-2181.
95. Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C, 2005. Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. 1^{ère} Edition, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.
96. Maisuthisakul P, Pongsawatmanit R, Gordon MH, 2007. Assessment of phenolic content and free-radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100(4): 1409-1418.
97. Mansouri N, Satrani B, Ghanmi M, Ghadraoui L, Aafi A, Farah A, 2010. Valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *Juniperus oxycedrus* du Maroc. *Phytothérapie*, 8(3): 166-170.
98. Marija ML, Ivana NB, Dejan ZO, Goran TA, Kristina JB, Marina M, Neda MM, 2011. *Juniperus sibirica* Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chemistry*, 124(3): 850-856.
99. Marvin E, 2005. Les antioxydants dans la tourmente. *Phytothérapie*, 3(6): 271-273.
100. Masquelier J, Dumon M, Dumas J, 1979. Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta thérapeutique*, 1: 101-104.
101. Masuda T, Yonemori S, Oyama Y, Takeda Y, Tanaka T, Andoh T, 1999. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(4): 1749-1754.
102. Matsuda F, Yonekura-Sakakibara K, Niida R, Kuromori T, Shinozaki K, Saito K, 2009. MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *The Plant Journal*, 57(3): 555-577.
103. Mendoza-Wilson AM, Glossman-Mitnik D, 2006. Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 761(1-3): 97-106.
104. Miceli N, Trovato A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Marino A, Bellinghieri V, La Barbera TM, Guvenc A-E, Taviano MF, 2009. Comparative Analysis of Flavonoid Profile, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15): 6570-6577.
105. Miceli N, Trovato A, Marino A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Guvenc A, De Pasquale R, Taviano MF, 2011. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 49(10): 2600-2608.
106. Michel T, Destandau E, Le Floch G, Lucchesi ME, Elfakira C, 2012. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry*, 131(3): 754-760.

107. Musialik M, Kuzmicz R, Pawtowski TS, Litwinienko G, 2009. Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *Journal of Organic Chemistry*, 74(7): 2699-2709.
108. Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA, 2011. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83(15): 173-179.
109. Nassr-Allah AA, Aboul-Enein AM, Aboul-Enein K M, Lightfoot DA, 2009. Anti-cancer and anti-oxidant activity of some Egyptian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(10): 799-808.
110. NCCLS "National Committee for Clinical Laboratory Standards". 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100- S11, Wayne, PA, USA.
111. Norhaizan ME, Hern SE, Ismail A, Yee CL, 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry*, 122(4): 1055-1060.
112. Novelli GP, 1997. Role of free radicals in septic shock. *Journal of physiology and pharmacology*, 48(4): 517-527.
113. Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y, 1993. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*, 33(3): 557-561.
114. Oldham KM, Bowen PE, 1998. Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial. *Journal of the American Diet Association*, 98(9): 1001-1008.
115. OMS, 1980. Expert Committee on Diabetes Mellitus Second Report. Technical Report Series 646. WHO, Geneva, p. 66.
116. Orav A, Koel M, Kailas T, Müürisepp M, 2010. Comparative analysis of the composition of essential oils and supercritical carbon dioxide extracts from the berries and needles of Estonian juniper (*Juniperus communis* L.). *Procedia Chemistry*, 2(1): 161-167.
117. Orhan N, Aslan M, Demirci B, Ergun F, 2012. A bioactivity guided study on the antidiabetic activity of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* L. Leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(2): 409- 415.
118. Orhan N, Aysel B, Didem DO, Mustafa A, Fatma E, 2011a. Effects of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* on tissue lipid peroxidation, trace elements (Cu, Zn, Fe) and blood glucose levels in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2): 759-764.
119. Orhan N, Orhan IE, Ergun F, 2011b. Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five *Juniperus* species. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9): 2305-2312.
120. Oueslati S, Ksouri R, Falleh H, Pichette A, Abdelly C, Legault J, 2012. Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forssk. *Food Chemistry*, 132 (2) : 943-947.
121. Oyaizu M, 1986. Studies on products of the browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6): 307-315.
122. Paris M, Hurabielle M, 1981. Abrégé de matière médicale- Pharmacognosie. Tome 1. Edition Masson, Paris. p.182.

123. Pelli K, Lyly M, 2003. Les antioxydants dans l'alimentation. Edition INRA.
124. Penchev P, Angelov G, Condoret JS, 2010. Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de lamélisse (*Melissa officinalis* L.). *Revue de génie industriel*, 5: 115-123.
125. Penfield MP, Campbell AM, 1990. Fats and their lipids constituents. Chemical reactions of lipids. *Experimental food science*, 3^{ème} Edition. San Diego: Academic Press.
126. Petsalo A, Jalonen J, Tolonen A, 2005. Identification of flavonoids of *Rhodiola rosea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2): 224-231.
127. Pfaller MA, Messer SA, Karlsson Å, Bolmstrom A, 1998. Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (9): 2586-2589.
128. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, 2001. Antioxidants in food, Practical applications. *Woodhead Publishing Limited*.
129. Prieto P, Pineda M, Aguilar M, 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2): 337-341.
130. Prior RL, Wu X, Schaich K, 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290-4302.
131. Quezel P, Santa S, 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du centre national de la recherche scientifiques, Paris. Tome II.
132. Rajendra-Prasad N, Anandi C, Balasubramanian S, Pugalendi KV, 2004. Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1): 21-24.
133. Rauha J-P, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P, 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1): 3-12.
134. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay. *Free Radical Biological Medicine*, 26 (9-10):1231-1237.
135. Rengasamy RRR, Radjasegarin A, Palanisamy I, Thirunavukarasu T, Perumal A, 2013. *In vitro* antibacterial, cytotoxicity and haemolytic activities and phytochemical analysis of seagrasses from the Gulf of Mannar, South India. *Food Chemistry*, 136(3-4): 1484-1489.
136. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G, 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7): 933-956.
137. Richter G, 1993. Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Edition Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, p.322-323.

138. Robards K, Antolovich M, 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. *Analyst*, 122(2): 11-34.
139. Romanik G, Gilgenast E, Przyjazny A, Kamiński M, 2007. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2): 253-261.
140. Ruijters EJB, Weseler AR, Kicken C, Haenen GRMM, Bast A, 2013. The flavanol (-)-epicatechin and its metabolites protect against oxidative stress in primary endothelial cells via a direct antioxidant effect. *European Journal of Pharmacology*, 715(1-3): 147-153.
141. Saito A, Mizushima Y, Tanaka A, Nakajima N, 2009. Versatile synthesis of epicatechin series procyanidin oligomers, and their antioxidant and DNA polymerase inhibitory activity. *Tetrahedron*, 65(36): 7422-7428.
142. Sánchez-Rabeneda F, Jáuregui O, Casals I, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventós RM, 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1): 35-42.
143. Sánchez-Vioque R, Rodríguez-Condé MF, Reina-Ureña JV, Escolano-Tercero MA, Herraiz-Peñalver D, Santana-Meridas O, 2012. *In vitro* antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products*, 39: 149-153.
144. Sassi AB, Harzallah-Skhiri F, Bourgougnon N, Aouni M, 2008. Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against herpes simplex virus type 1. *Natural Product Research*, 22(1): 53-65.
145. Sawada Y, Akiyama K, Sakata A, Kuwahara A, Otsuki H, Sakurai T, Saito K, Hirai MY, 2009. Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants. *Plant and Cell Physiology*, 50(1):37-47.
146. Seca AM, Silva AM, Bazzocchi IL, Jimenez IA, 2008. Diterpene constituents of leaves from *Juniperus brevifolia*. *Phytochemistry*, 69(2): 498-505.
147. Sekher Pannala A, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA, 2001. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(5):1161-1168.
148. Seyoum A, AsresK, El-Fiky FK, 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67(18): 2058-2070.
149. Shafek RE, Shafik NH, Michael HN, 2012. Antibacterial and Antioxidant Activities of Two New Kaempferol Glycosides Isolated from *Solenostemma argel* Stem Extract. *Asian Journal of Plant Sciences*, 11(3): 143-147.
150. Sharma P, Sharma JD, 2001. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 74 (3): 239-243.
151. Sherwin ER, 1976. Antioxidants for vegetable oils. *Journal of American Oil Chemical Society*, 53(6): 430-436.
152. Sievers H, Burkhardt G, Becker H, Zinsmeister DH, 1994. Further biflavonoids and 3'-phenylflavonoids from *Hypnum cupressiforme*. *Phytochemistry*, 35(3): 795-798.

153. Smith C, Halliwell B, Aruoma OI, 1992. Protection by albumin against the pro-oxidant actions of phenolic dietary components. *Food and Chemical Toxicology*, 30(6): 483-489.
154. Smyth T, Ramachandran VN, Smyth WF, 2009. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5): 421-426.
155. Soliman KM, Badeaa RI, 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40(11): 1669-1675.
156. Sparg SG, Light ME, Van Staden J, 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 219-243.
157. Stagos D, Portesis N, Spanou C, Mossialos D, Aligiannis N, Chaita E, Panagoulis C, Reri E, Skaltsounis L, Tsatsakis A M, Kouretas D, 2012. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic *Lamiaceae* species. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11): 4115-4124.
158. Stalikas CD, 2007. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18): 3268-3295.
159. Stankovic SM, Topuzovic M, Solujic S, Mihailovic V, 2010. Antioxidant activity and concentration of phenols and flavanoids in the whole plant and plant parts of *Teucrium chamaerdys* L. var *glanduliferum* Haussk. *Journal of Medicinal Plant Research*, 4(20): 2092-2098.
160. Sun B, Richardo-da-Silvia JM, Spranger I, 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(10): 4267-4274.
161. Tavares L, Gordon J, Fortalezasa S, Stewart D, Ricardo BF, Cláudia N, 2012. The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperus* species found in Portugal. *Food Chemistry*, 135 (2): 562-570.
162. Taviano MF, Marino A, Trovato A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Guvenc A, De-Pasquale R, Miceli N, 2013. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. "berries" from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 22-29.
163. Touriño S, Fuguet E, Jáuregui O, Saura-Calixto F, Cascante M, Torres JL, 2008. High-resolution liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry combined with liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify polyphenols from grape antioxidant dietary fiber. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(22): 3489-3500.
164. Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Bourgou S, Hajlaoui H, Abdelly C, 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Science and Technology*, 43(4): 632-639.
165. Trabut L, 2006. Noms indigènes des plantes d'Afrique du Nord. Edition Ibis Press Paris. p.139.

166. Turkmen N, Sari F, Velioglu YS, 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4): 835-841.
167. Turumtay EA, İslamoğlu F, Çavuş D, Şahin H, Turumtay H, Vanholme B, 2014. Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox Opiz* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*). *Industrial Crops and Products*, 52: 687-694.
168. Valenzuela AB, Nieto SK, 1996. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 47(3):186-196.
169. Van Acker SA, Van Den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJ, Bast A, 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3): 331-342.
170. Vazquez G, Fontenla E, Santos J, Freire MS, Gonzalez-Alvarez J, Antorrena G, 2008. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial crops and products*, 28(3): 279-285.
171. Vermerris W, Nicholson R, 2006. Phenolic Compound Biochemistry, *Springer*, Dordrecht.
172. Vinson JA, 2006. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology*, 13(3): 151-162.
173. Watson L, Dallwitz MJ, 1991. The families of angiosperms: automated descriptions, with interactive identification and information retrieval. *Australian Systematic Botany*, 4(4): 681-695.
174. Wolfe KL, Liu RH, 2008. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(18): 8404-8411.
175. Yao HW, Li J, Chen JQ, Xu SY, 2004. Inhibitory effect of leflunomide on hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7): 915-920.
176. Zhao H, Dong J, Lu J, Chen J, Li Y, Shan L, 2006. 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*, 54(19): 7277-7286.
177. Zhou H-C, Lin Y-M, Wei S-D, Tam NF-y, 2011. Structural diversity and antioxidant activity of condensed tannins fractionated from mangosteen pericarp. *Food Chemistry*, 129(4): 1710-1720.
178. Zubair M, Bibi Za, Rizwan K, Rasool N, Zahoor AF, Riaz M, 2013. *In Vitro* Antimicrobial and Haemolytic Studies of *Bambusa arundinaceae* leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(4): 111-115.

Valorisation des travaux de recherche

Communications scientifiques internationales

- 15-17/03/2012. **3^{ème} colloque international de Biotechnologie Microbienne – Innovation Technologique et Valorisation des Biomolécules**
Tanger Etude phytochimique et activités biologiques (Antioxydantes et
MAROC Antibactériennes) des extraits d'*Echium pycnanthum* Pomel
Chaouche T., Atik Bekkara F., Haddouchi F., Boucherit Z.
- 21-24/03/2012. **23^{ème} forum international de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques**
Hammamet Etude phytochimique et activités Antibactériennes et antioxydantes des extraits
Tunisie de la plante *Echium pycnanthum* Pomel
Chaouche T., Atik Bekkara F., Haddouchi F., Boucherit Z.
- 10-11/04/2013. **4th International workshop on industrial biotechnology**
Tlemcen Contribution in the use of medicinal plants in the food industry as a source of
Algerie molecules bioactives
Chaouche T., Haddouchi F., Ksouri R., Medini F., Atik Bekkara F.
- 21-23/03/2014. **3^{ème} Congrès International sur les Molécules bioactives, Aliments fonctionnels et Maladies associées au stress oxydant**
Hammamet ACTIVITÉS ANTIOXYDANTES, HÉMOLYTIQUES ET ANALYSE PAR HPLC Orbitrap-MSⁿ
Tunisie Des Extraits De *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*
Chaouche T., Haddouchi F., Ksouri R., Rachid A., Boucherit Z., Larbat R., Bourgaud F., Tefiani C, Atik Bekkara F.
- 24-27/03/2014. **25^{ème} Forum des Sciences Biologiques et de Biotechnologie**
Hammamet La caractérisation des composés phénoliques, responsable de l'activité biologique
Tunisie de *Juniperus oxycedrus*, par HPLC-DAD-ESI-MSⁿ
Chaouche T., Haddouchi F., Ksouri R., Rachid A., Boucherit Z., Larbat R., Bourgaud F., Tefiani C., Atik Bekkara F.

Communications scientifiques nationales

- 11-12/04//2012 **3^{ème} journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie**
Mostaganem Etude phytochimique et activités biologiques (Antioxydantes et Antibactériennes)
des extraits d'*Echium pycnanthum* Pomel
Chaouche T., Atik Bekkara F., Haddouchi F., Boucherit Z.
- 14-16/05/2012. **Forum sur les sciences de la Nature**
Tlemcen Isolement et identification par RMN C¹³ et H¹ des quinones d'*Echium pycnanthum*
Pomel
Chaouche T., Atik Bekkara F., Haddouchi F.
- 09- 10/04/ 2013 **4^{ème} journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie**
Mostaganem Antioxydant activities profiling by spectrophotometric methods of hydro-
methanolic extracts of some medicinal species from south Algeria.
Chaouche Tarik M., Haddouchi Farah., Medini Faten., Ksouri Riadh., ATIK Fawzia.
- 23/04/ 2014 **Journée des doctorants**
Oran Activités biologiques de quelque plantes médicinales d'origine de Sahara
Algérienne.
Chaouche Tarik M., Haddouchi Farah., ATIK Fawzia, Ksouri Riadh.
- 03/06/2014 **1^{ère} Journée Scientifique des Sciences de l'Agriculture, Environnement et Santé**
Tlemcen Le potentiel antiradicalaire du Cade et l'identification des composés actifs par
LC-ESI-MS
CHAOUCHE Tarik Mohammed., HADDOUCHI Farah., KSOURI Riadh., ATIK-BEKARA Fouzia., LARBAT Romain.
-

Article original

Pharmacognosie

In vitro evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*

T.M. Chaouche¹, F. Haddouchi¹, R. Ksouri², F. Medini², F. Atik-Bekara¹

¹Laboratory of Natural Products, Department of Biology, Faculty of Sciences, Abou Bekr Belkaid University, B.P119, 13000, Tlemcen, Algeria

²Laboratory of Plant Adaptation to Abiotic Stress, Borj Cedria Biotechnology Centre (CBBC), Borj Cedria Ecopark, B.P. 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisia

Correspondance : kiratcqa@yahoo.fr

Abstract: Polyphenols are bioactive molecules with much scientific attention because of their multiple biological activities. This study aims to compare the phenolic content in the extracts hydro-methanolic needles and roots bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* and their antioxidant activity by five different methods (total antioxidant capacity, DPPH, ABTS, β -carotene and ferric reducing power). Results showed that needles extract exhibited the highest polyphenol (133.08 ± 4.1 GAE.g⁻¹DW) flavonoid (61.52 ± 3.1 CEF.g⁻¹DW) and tannin (26.43 ± 2.6 CEF.g⁻¹DW) contents. Both of extracts revealed a significant antioxidant activity. However, the roots bark extract displayed the highest capacity with the lowest IC₅₀ value (2.9 ± 0.2 μ g mL⁻¹) in DPPH scavenging method. Overall, this paper established that the roots bark possess high *in vitro* antioxidant potency although they possess less phenolic compounds than needles. Therefore, our results can confirm that the high content of total phenols in the extracts does not explain the strong antioxidant properties. The nature of these compounds and synergistic interactions can influence this ability.

Keywords: *Juniperus oxycedrus* – Needles – Roots bark – Quantification of phenolic classes – Antioxidant activity – Hydro-methanolic extracts

Évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante d'extraits hydro-méthanoliques de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*

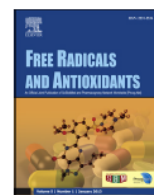
Résumé: Les polyphénols sont des molécules recherchées scientifiquement à cause de leurs multiples activités biologiques. Cette étude vise à comparer le contenu phénolique dans les extraits hydro-méthanoliques d'écorces de racines et d'aiguilles de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* et leurs activités antioxydantes par cinq méthodes différentes (la capacité antioxydante totale, DPPH, ABTS, β -carotène et le pouvoir réducteur). Les résultats ont montré que l'extrait d'aiguilles a des teneurs les plus élevées en polyphénols ($133,08 \pm 4,1$ GAE/g

matière sèche), en flavonoïdes ($61,5 \pm 3,1$ CEF/g MS) et en tanins ($26,43 \pm 2,6$ CEF/g MS). Les deux extraits ont révélé une activité antioxydante significative. Cependant, l'extrait d'écorces de racines a la plus grande capacité avec une plus faible valeur d'IC₅₀ ($2,9 \pm 0,2$ μ g mL⁻¹) en piégeant le radical DPPH. Dans l'ensemble, cette étude a établi que les écorces de racines possèdent un grand pouvoir antioxydant malgré qu'elles aient moins de composés phénoliques que les aiguilles. Donc, nos résultats peuvent confirmer que la teneur élevée en phénols totaux dans les extraits n'explique pas les fortes propriétés antioxydantes. La nature de ces composés et les interactions synergiques peuvent aussi influencer cette capacité.

Mots clés : *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* – Aiguilles – Écorce des racines – Extrait hydro-méthanolique – Quantification des classes phénoliques – Activité antioxydante

Introduction

Reactive oxygen species (ROS), are chemically reactive molecules due to the presence of unpaired electrons, which include superoxide anion radicals (O₂^{•-}), hydroxyl radicals (OH[•]), hydroperoxyl radicals (HOO[•]), peroxy (ROO[•]) and non-free radical species such as hydrogen peroxide (H₂O₂), ozone (O₃), and singlet oxygen (¹O₂). The uncontrolled production of ROS and the unbalanced mechanism of antioxidant protection system, can lead to many diseases as atherosclerosis, coronary heart diseases, aging and cancer [2,10,12]. In order to decrease harmful effects of ROS, synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG), and tert-butylhydroquinone (TBHQ) can be used. However, the use of the synthetic molecules have suspected of being responsible for liver damage and carcinogenesis. Natural antioxidants obtained from plants can protect the human



Short communication

Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of phenolic extract of *Prasium majus* L

Tarik Md. Chaouche^{a,*}, Farah Haddouchi^a, Riadh Ksour^b, Faten Medini^b, Imad A. El-Haci^a, Zahia Boucherit^c, Fatima Zohra Sekkal^d, Fawzia Atik-Bekara^a

^aLaboratory of Natural Products, Department of Biology, Faculty of Sciences, Tlemcen University, Tlemcen, Algeria

^bLaboratory of Extremophile Plants, Borj Cedria Biotechnology Centre (CBBC), Hammam-Lif 2050, Tunisia

^cAntibiotics Antifungal Laboratory: Physical-Chemistry, Synthesis and Biological Activity, Department of Biology, Faculty of Sciences, Tlemcen University, Tlemcen, Algeria

^dDepartment of Biotechnology, Faculty of Natural Science and Life, Abdelel Hamid Ibn Badiss University, Mostaganem 27000, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 March 2013

Accepted 18 March 2013

Available online 28 March 2013

Keywords:

Prasium majus

Quantification of phenolic classes

Antioxidant activity

ABSTRACT

Introduction: Phytochemicals are extensively found at different levels in many medicinal plants. To investigate the phenolic compound content and *in vitro* antioxidant activity of phenolic extract from *Prasium majus* L (Lamiaceae).

Methods: The present investigation comprises, estimation of total polyphenol, flavonoid, tannin, *in vitro* antioxidant assays such as total antioxidant capacity, DPPH, ABTS, β -carotene and ferric reducing power. **Results:** *P. majus* exhibited 64.25 mg GAE g⁻¹ extract of polyphenol phenol content, and better scavenging activity of DPPH (IC₅₀ = 7.95 μ g mL⁻¹), ABTS^{•+} (IC₅₀ = 373.78 μ g mL⁻¹), and β -carotene (IC₅₀ = 122.56 μ g mL⁻¹).

Conclusion: Our results clearly demonstrated that phenolic extract *P. majus* has antioxidant capacity. Therefore is a valuable source of natural antioxidants.

Copyright © 2013, SciBiolMed.Org and Phcog.Net, Published by Reed Elsevier India Pvt. Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The family of Lamiaceae consists of about 233 genera and 6900 species worldwide. Many species of the Lamiaceae family are considered of high importance because of their uses in medicine, culinary and cosmetics. *Prasium majus* L. is a wildflower species belonging to this family. An infusion of the leaves and flowers of the plant is used for gastrointestinal diseases.¹ In this paper we screen the phenolic extract for their free radical scavenging and antioxidant activity. That should complement to their therapeutic value and improve the popularization of the species. To the best of our knowledge, we were among the first to provide data on the antioxidant effect of the phenolic extract of *P. majus* by five methods.

2. Material and methods

2.1. Phenolic extraction

P. majus was harvested in April 2012 from northwest of Algeria (Tlemcen). It was identified in the Laboratory of Natural

Products, Department of Biology, University of Tlemcen (Algeria). Voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Laboratory.

The powder of plant dried (2 g) was first extracted by 25 mL hexane to remove lipids and chlorophylls. After centrifugation, the pellet was resuspended in 25 mL methanol/water (80:20, v:v) for 24 h. The obtained extract was filtered through a Whatman N° 4 filter paper and evaporated at 45 °C under reduced pressure, re-dissolved in methanol at a concentration of 1 mg mL⁻¹.²

2.2. Quantification of phenolic classes

2.2.1. Total polyphenol quantification

Total polyphenol content of the plant extract was determined using Folin–Ciocalteu reagent (FC),² using gallic acid as a standard. An aliquot (250 μ L) of diluted sample extract was added to 0.5 mL of distilled water and 0.125 mL of the FC. The mixture was shaken and allowed to stand for 6 min, before addition of 1.25 mL of 7% Na₂CO₃. The solution was then adjusted with distilled water to a final volume of 3 mL and mixed thoroughly, and held in dark for 90 min at ambient temperature. After incubation, the absorbance at 760 nm was recorded. Total polyphenol content of plant parts was expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of dry weight

* Corresponding author. Tel.: +213 772735216.

E-mail address: kiratcqa@yahoo.fr (T.Md. Chaouche).



Original Article

Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria

Tarik Mohammed Chaouche ^{a,*}, Farah Haddouchi ^a, Riadh Ksouri ^b, Fouzia Atik-Bekkara ^a

^aLaboratory of Natural Products, Department of Biology, Faculty of Sciences, Abou Bekr Belkaid University, Tlemcen, Algeria

^bLaboratory of Extremophile Plant, Biotechnologic Center in Borj-Cedria Technopol (CBBC), Hammam-Lif, Tunisia

Received July 18, 2013; accepted November 14, 2013

Abstract

Background: Phytochemicals are found in abundance at different levels in many medicinal plants. It is important to measure the total phenolic compounds correctly in such medicinal plants, the better to assess their antioxidant capacity.

Methods: Our study sought to evaluate the total phenolic, flavonoid, and tannin contents of three Algerian medicinal plants: *Echium pycnanthum* Pomet, *Haloxylon articulatum* Boiss, and *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce. We employed six different testing methods to help ascertain whether these compounds have an antioxidant capacity, including total antioxidant capacity, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*, 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid⁺⁺, β -carotene, reducing, and chelating assays.

Results: Our study showed that these medicinal plants exhibited significantly different total polyphenol contents varying from 27.3 ± 2.1 mg to 120.3 ± 5.6 mg gallic acid equivalents/g dry weight. The phenolic content in *H. articulatum* was superior to those in *E. pycnanthum* and *S. oleifolium*. The same tendency was observed for the relative amounts of flavonoids and condensed tannins in the three medicinal plants. The antioxidant activities varied greatly among the different plants used in this study. Indeed, *H. articulatum* shoots exhibited the strongest antioxidant activity, with the lowest IC₅₀ (6.3 ± 0.25 μ g/mL) and EC₅₀ (0.21 ± 0.01 mg/mL) values for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* and iron reducing tests, respectively. In addition, the superiority of this plant was more marked as compared to positive controls. Strong and positive correlations were found between phenolic classes and antioxidant activities with a correlation coefficient reaching $R \geq 0.99$.

Conclusion: This investigation confirmed that several medicinal herbs from South Algeria possess high *in vitro* antioxidant potency. Overall, our results can be considered very promising in the continuing effort to utilize plant species successfully for medicinal purposes in humans, providing further justification for the hypothesis that phenolic compounds in these plants can provide substantial antioxidant activity. Copyright © 2014 Elsevier Taiwan LLC and the Chinese Medical Association. All rights reserved.

Keywords: antioxidant activity; correlation coefficients; extracts; medicinal plants; percentage inhibition; quantification of phenolics

1. Introduction

There is ample evidence that reactive oxygen species (ROS) generated in the human body can cause oxidative damage associated with many degenerative diseases such as

atherosclerosis, coronary heart diseases, aging, and cancer. It is well understood that ROS such as superoxide radical, hydroxyl radical, peroxy radical, and nitric oxide radical attack biological molecules such as lipids, proteins, enzymes, DNA, and RNA, leading to cell or tissue injury. ROS can induce peroxidation of lipids generating secondary oxidants such as heptanol and hexanal, which contributes to oxidative rancidity, deteriorating the flavor of food. These not only cause a loss in food quality but are also believed to be associated with carcinogenesis, mutagenesis, arthritis, diabetes, inflammation, cancer, and genotoxicity. To overcome these problems a wide range of synthetic antioxidants [butylated hydroxytoluene

Conflicts of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest related to the subject matter or materials discussed in this article.

* Corresponding author. Dr. Tarik Mohammed Chaouche, Department of Biology, Faculty of Sciences, Abou Bekr Belkaid University, B.P 119, Tlemcen 13000, Algeria.

E-mail address: kiratcqa@yahoo.fr (T.M. Chaouche).

1726-4901/\$ - see front matter Copyright © 2014 Elsevier Taiwan LLC and the Chinese Medical Association. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2014.01.009>

Please cite this article in press as: Chaouche TM, et al., Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria, Journal of the Chinese Medical Association (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2014.01.009>

الغرض من هذا البحث هو دراسة تقدير النشاطات المضادة للأوكسدة والمضادة للميكروبات لمستخلصات لبعض النباتات في الجزائر *Echium* و *Juniperus oxycedrus* subsp *oxycedrus* و *Prasium majus* L. و *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce. و *pyncanthum* Pomel

تم تحديد المحتوى الكمي للمركبات الفينولية بواسطة تقنيات طيفية، وكذا تم تحديد أنشطة مضادة للأوكسدة، من خلال الطرق التالية: القدرة الإجمالية لمضادة للأوكسدة، و تثبيط جذر DPPH⁺ و ABTS⁺، و تثبيط تبيض β كاروتين، و قوة إرجاع و تثبيط الحديد، و تثبيط O_2^- و $O_2^{\cdot-}$ و OH^{\cdot} . تم إجراء تحديد نشاط مضادات الميكروبات، من خلال طريقة نشر الأقراص في وسط جامد، والتخفيفات في وسط السائل على السلالات البكتيرية والفطرية، لمعرفة قيمة الحد الأدنى للتركيز المثبط. تم فحص المستخلصات بواسطة تقنية HPLC Orbitrap-MS[®]. تحتوي مستخلصات الميثانول للإبر ولحاء الجذور *J. oxycedrus*، على أعلى تركيزات المركبات الفينولية وأهم نشاطات مضادة للأوكسدة مقارنة بالنباتات الأخرى، و مضاد الأوكسدة النموذجي (BHT)، وهذا من خلال تثبيط جذر DPPH⁺ (قيم IC₅₀ للإبر 2.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ وللحاء الجذور 10.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$). هذه المستخلصات هي أكثر نشاطا ضد بعض أنواع البكتيريا والخميرة *Candida albicans*، ومع ذلك لم يتبين أي نشاط ضد السلالات الفطرية بعد اختبار جميع المستخلصات. بعض المستخلصات أعدت من الإبر ولحاء الجذور *J. oxycedrus* عن طريق الإستخلاص المتعقب بمذيبات مختلفة (الهكسان، ثنائي كلوروميثان، الميثانول والماء). تبين أن المستخلصات القطبية (الميثانول والماء) كانت الأكثر تركيزا بالمركبات الفينولية، و الأكثر نشاطا مع قيمة IC₅₀ لتثبيط جذر DPPH⁺ مقدرة بـ 1.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$ لمستخلص الميثانول للحاء الجذور. فيما يخص اختبار قوة تثبيط الحديد، كل المستخلصات كانت ضعيفة مقارنة بمضاد الأوكسدة النموذجي (EDTA). أظهرت نتائج مستخلصات الميثانول نشاطا ضد البكتيريا (*Acinetobacter baumannii*، و *Proteus mirabilis*، و *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus*)، حيث أن قيمة الحد الأدنى للتركيز المثبط هي 0.78 mg/ml . المستخلصات المائية غير فعالة تماما، في حين أن المستخلصان الهكسان وثنائي كلوروميثان لهما نشاط ضد *C. albicans* حيث تركيز المثبطين مقدرين بـ 0.39 و 0.78 mg/ml ، على التوالي. أما النسب المئوية للإنحلال الدم لمستخلصات الميثانول والماء كانت أقل من 5٪، مما يميز بتسمم خلوي ضعيف. ساعدت تحاليل مستخلصات الميثانول بواسطة تقنية HPLC Orbitrap-MS[®] على وجود العنصر الثنائي، الميريسيتين-3-O-جلوكوسيد، الكيريسيتين، الروتين وامينتوفلافون في الإبر. و أيضا وجود العنصر الثنائي، التلا في و الرباعي، كاتشين، كيريسيتين هيكسوز، إزرومنتين-3-O-جلوكوزونيد في لحاء الجذور *J. oxycedrus*. الكلمات المفتاحية: النباتات الطبية، المركبات الفينولية، نشاط مضاد للأوكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، انحلال الدم HPLC Orbitrap-MS[®].

Résumé Le but de ce travail est d'étudier les capacités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quatre plantes originaires de l'Algérie. Il s'agit d'*Echium pycnanthum* Pomel., *Prasium majus* L., *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* et *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce.

Les teneurs en polyphénols ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. Les activités antioxydantes ont été déterminées, in vitro, à travers les tests d'évaluation suivants: capacité antioxydante totale, DPPH⁺, ABTS⁺, pouvoirs de réduction et de chélation du fer, inhibition de blanchiment du β -carotène, anion superoxyde, radical hydroxyle et oxygène singulet. En outre, la détermination de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé et celle des dilutions en milieu liquide. L'analyse des extraits actifs a été réalisée par CLHP Orbitrap-MS[®].

Les extraits hydro-méthanoliques des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus* et celui de *P. majus* sont les plus riches en composés phénoliques et ont une activité antioxydante très importante par comparaison avec les autres espèces. La meilleure activité, par rapport à l'antioxydant de synthèse (BHT), est obtenue en piégeant le radical DPPH⁺ avec des valeurs de CI₅₀ de 2.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour les écorces de racines et de 10.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour les aiguilles. De même, ces extraits sont les plus actifs contre *Candida albicans* et quelques bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*). Cependant, tous les extraits ne montrent aucune activité vis-à-vis de toutes les souches de moisissures.

Des extractions successives par des solvants de polarité croissante (hexane, dichlorométhane, méthanol et aqueux), ont été réalisées à partir des aiguilles et des écorces de racines de *J. oxycedrus*. Ce sont les extraits méthanoliques et aqueux, qui se sont montrés les plus riches en composés phénoliques et qui ont été les plus actifs pour leurs potentiel antioxydant. La valeur de CI₅₀ de l'extrait méthanolique des écorces de racines, en piégeant le radical DPPH⁺, est de 1.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cependant, pour le test de chélation du fer, tous les extraits ont montré une activité plus faible à celles d'antioxydant de synthèse (EDTA). En outre, les extraits méthanoliques ont montré l'efficacité antibactérienne la plus importante contre *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, avec une valeur de CMI de 0.78 mg/ml . Les extraits aqueux sont totalement inactifs, alors que ceux préparés à partir de l'hexane et du dichlorométhane ont montré une activité modérée contre *C. albicans* par rapport aux autres extraits, avec des valeurs respectives de CMI de 0.39 et 0.78 mg/ml . Pour tous les extraits méthanoliques et aqueux, les pourcentages d'hémolyse sont inférieurs à 5%, ce qui caractérise une hémolyse mineure. L'analyse des extraits actifs par CLHP Orbitrap-MS[®] a permis de mettre en évidence la présence de la proanthocyanine dimère, de la myricétine 3-O-glucoside, de la quercétine, de la rutine et de l'amentoflavone dans les aiguilles et de la proanthocyanine dimère, trimère et tetramère, de la catechine, de la quercétine hexose et de l'isorhamnétine-3-O-glucoside dans les écorces de racines de *J. oxycedrus*.

Mots clés: plantes médicinales, composés phénoliques, activité antioxydante, capacité antimicrobienne, hémolyse, CLHP Orbitrap-MS[®].

Abstract The purpose of this study is to investigate the antioxidant and antimicrobial effects of extracts of some plants from Algeria. This is *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Prasium majus* L., *Echium pycnanthum* Pomel and *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce.

The phenolic contents were determined by spectrophotometric techniques. The antioxidant activities were determined in vitro, through the following methods: total antioxidant capacity, DPPH⁺, ABTS⁺, inhibition of bleaching β -carotene, singlet oxygen, superoxide anion, hydroxyl radical, reducing power and iron chelation. The determination of the antimicrobial activity was performed by the method of diffusion in agar discs and the dilutions in liquid media. Analysis of active extracts was performed by HPLC Orbitrap-MS[®]. The hydro-methanolic extracts of the needles and bark of the roots of *J. oxycedrus* are rich in phenolic compounds and have a very interesting antioxidant activity. The best activity, compared to the synthesis antioxidant (BHT), is by DPPH⁺ radical scavenging, with IC₅₀ values of 2.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, for the root bark and 10.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$, for needles. Also, these extracts are more active against some *Candida albicans* and bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*). Though, all the extracts showed no activity on all strains of fungi. The extracts of needles and root bark of *J. Oxycedrus* were prepared by successive extractions with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, methanol and aqueous). The methanolic and aqueous extracts are the richest in phenolic compounds and the most active. The IC₅₀ value of the DPPH test in the methanolic extract of the root bark is 1.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$. However, for the test of iron chelation, no extracts has shown comparable to those of the synthesis antioxidant (EDTA). The methanol extracts showed the greatest antibacterial activity with a MIC which value 0.78 mg/ml , against *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. The aqueous extracts were completely inactive, while the hexane and dichloromethane extracts showed activity against *C. albicans* with MIC values of 0.39 and 0.78 mg/ml , respectively. The percentages of haemolysis, are less than 5%, for all extracts, so are characterized by cytotoxicity minor. The analysis of active extracts by HPLC Orbitrap-MS[®] characterized the presence of proanthocyanin dimer, myricetin 3-O-glucoside, quercetin, rutin and amentoflavone in the needles and dimer, trimer and tetramer proanthocyanin, catechin, quercetin hexose and isorhamnnetin-3-O-glucoside in the bark of *J. oxycedrus*.

Keywords: medicinal plants, compounds phenolics, antioxidant activity, antimicrobial activity, haemolysis assay, HPLC Orbitrap-MS[®].