

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou-Bakr-Belkaïd Tlemcen

Faculté des Sciences

Département de Biologie moléculaire et cellulaire

Inscrit Sous le N°:
Date de:
Code: 4377

*Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimique, Synthèse et Activité
Biologique.*

Mémoire de Magister en Biologie

Option : Biochimie appliquée.

Présenté par M^r

Chaouche Tarik Mohammed

**Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques
(antioxydantes et antibactériennes) des extraits de la plante
d'*Echium pycnanthum* Pomel (*Hemimch*).**

Jury :

· M ^{me} Boucherit Z.	<i>Maître de conférences</i>	Présidente
· M ^{me} Bekhechi C.	<i>Maître de conférences</i>	Examinatrice
· M ^r Lazouni H.A.	<i>Maître de conférences</i>	Examineur
· M ^r Djaziri R.	<i>Maître de conférences</i>	Examineur
· M ^{me} Atik Bekkara F.	<i>Professeur</i>	Promotrice

Année Universitaire : 2009-2010.

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et des activités antioxydantes et antibactérienne d'une plante endémique, *Echium pycnanthum* de la famille des Borraginacées, largement répandue dans la région du Sebdou (Tlemcen). Elle fait partie de la panoplie des plantes médicinales de la région.

Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les feuilles et les racines de cette plante.

Les extractions des extraits bruts, flavonoïdes, tanins et saponosides à partir des deux parties de la plante et des quinones à partir des racines ont été effectuées par des méthodes d'extractions par des solvants spécifiques pour chaque extrait. Les rendements sont plus importants dans les feuilles par rapport aux racines.

L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits, montre qu'il y a une certaine conformité entre la méthode de la réduction du fer FRAP et celle de piégeage du radical libre DPPH. L'extrait brut des feuilles et les extraits contenant les composés phénoliques possèdent un pouvoir antioxydant important comparé à ceux de l'acide ascorbique et de BHT. Les saponosides ont révélés une faible activité.

L'étude de l'activité de ces extraits sur des souches bactériennes montre que le pouvoir antibactérien de l'extrait brut des feuilles est plus important comparé à celui des autres extraits. La souche de *Pseudomonas aeruginosa* s'est révélée la plus sensible à tous les extraits.

Les quinones des racines, responsables de la couleur rouge, ont été identifiées par RMN ^1H et ^{13}C . Il s'agit d'un dérivé de shikonine, *Angelylshikonine*. Ce résultat confirme l'appartenance de notre espèce à la famille des Borraginacées.

Mots clés: *Echium pycnanthum*, Activité antioxydante, DPPH, FRAP, Activité antibactérienne, RMN ^1H , ^{13}C .

Remerciements

À Dieu Tout puissant qui a permis que je sois ce que je suis au jour d'aujourd'hui. Car l'homme propose, mais Dieu dispose. Seigneur, veille toujours diriger mes pas.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche dans le laboratoire des "*Produits Naturels*" et celui d'*Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimique, Synthèse et Activité Biologique*, sous la direction respective de M^f **Chaabane Sari D.** et M^f **Boucherit K.** Messieurs, je vous en suis très reconnaissant, pour votre accueil et votre sympathie.

Ma première pensée va tout naturellement à mon encadreur M^{me} **Atik-Bekkara F.**, Professeur au département de Biologie moléculaire et Cellulaire (BMC), Faculté des Sciences Naturelles et Vie, de la Terre et de l'Univers (SNVTU), Université de Tlemcen, pour avoir suivi ce travail avec disponibilité et patience. Je la remercie pour ses qualités humaines et la confiance qu'elle m'a témoignée.

J'exprime ma vive reconnaissance à M^{me} **Boucherit Z.**, Maître de conférences au département de BMC, Faculté des SNVTU, Université de Tlemcen, pour m'avoir apporté un appui constant au cours du développement de ce travail et de me faire l'honneur de présider notre jury.

M^{me} **Bekhechi C.**, Maître de conférences au département de BMC, Faculté des SNVTU, Université de Tlemcen, je vous suis reconnaissant d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier M^f **Lazouni H.A.**, Maître de conférences au département d'Ecologie et Environnement, Faculté des SNVTU, Université de Tlemcen de m'avoir fait l'honneur de participer au jury en tant qu'examinateur.

M^f **Djaziri R.**, Maître de conférences au département de BMC, Faculté des SNVTU, Université de Tlemcen je vous remercie d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.

Scientifiquement parlant, je remercie M^f le professeur **Casanova J.**, et tous les personnels du laboratoire de chimie et biomasse (CNRS) de l'université de Corse pour les analyses des quinones.

Mes remerciements vont également à M^{me} **Chaouche- Haddouchi F.**, pour son aide et pour les discussions enrichissantes qui ont contribué à ce travail, ainsi qu'à M^f **El-Haci A.I.**

Mes remerciements vont également, à M^f **Rahmoun N.** et M^f **Azzi R.**, pour leurs aides.

Je remercie ma promotion de magister 2007 chacun et chacune à ca manière, **Seddiki M., Halla N., Ayad A., Djelloul-daouadji S., Merghach D., Mesli E. et Zeryouh H.**

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier ma famille pour leur soutien moral et leur encouragement.

Merci à tous.

Abréviations

%	: Micro
[]	: American Type Culture Collection
°C	: Chlorure d'aluminium
μ	: Acide Désoxyribonucléique
ATCC	: Adénosine tri-phosphate
$AlCl_3$: Butylhydroxytoluène
ADN	: Centimètre
ATP	: Chromatographie sur couche mince
BHT	: Chloroforme
cm	: Diméthyl Sulfoxyde
CCM	: Densité optique
$CHCl_3$: Chloroforme
DMSO	: Diméthyl Sulfoxyde
DO	: Densité optique
DPPH [•]	: Radical 2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
<i>et al.</i>	: et autres auteurs
Fe^{2+}	: Ions ferreux
Fe^{3+}	: Ions ferriques
$FeCl_3$: Chlorure de fer
fig	: Figure
FRAP	: Ferric reducing antioxidant power
g	: Gramme
h	: Heure
H_2O	: Eau distillée.
H_2SO_4	: Acide Sulfurique
HCl	: Acide chlorhydrique
I%	: Pourcentage d'inhibition
IM	: Indice de mousse
IC50	: Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH
$K_3Fe(CN)_6$: Ferricyanure de potassium
Kg	: Kilogramme
M	: Molarité
m	: Mètre
mg	: Milligramme
mn	: Minutes
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
N	: Normalité
Na_2CO_3	: Carbonate de sodium
NH_4OH	: Ammoniaque
NaOH	: Soude
nm	: Nanomètre
ppm	: Partie par million
Rf	: Facteur de rétention (CCM)
RMN 1H	: Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire de proton
RMN ^{13}C	: Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire de carbone 13
rpm	: Rotation par minute
s	: Seconde
tab	: Tableau
UFC	: Unité Formant Colonie

3.1. Classification botanique (Quezel *et al.*, 1963) :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobiontae

Division : Magnoliophytae

Classe : Magnoliopsidae

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Boraginaceae

Genre : *Echium*

Espèce : *pycnanthum* Pomel (Photos 01 et 02)



Photo 01 : la plante « *Echium pycnanthum* Pomel ».



Photo 02 : Les racines de la plante.

II. LES METABOLITES SECONDAIRES :

1. Introduction :

Les plantes sont connues pour produire un grand nombre de composés à faible poids moléculaire dont leurs structures ont été identifiées, malgré leur exploitation et leur utilisation, depuis toujours, comme médicaments ou aliments (**Rhodes, 1994**).

2. Définition et fonctions des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont des composés biosynthétisés naturellement par les végétaux, mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal. Ils peuvent être spécifiques aux ordres, aux familles, aux espèces, et parfois même aux taxa (**Laitinen et al., 2000**).

Ces métabolites jouent un rôle très important dans plusieurs fonctions biologiques. Ils sont connus non seulement en raison de leur rôle protecteur contre les effets nocifs de la lumière U.V ou d'autres facteurs abiotiques, mais également en tant que défenseurs contre les herbivores et les microorganismes pathogènes. De plus, ils sont reconnus pour aider au processus de pollinisation et comme de signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à l'environnement (**Graglia et al., 2001**).

3. Classification des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires dépassant actuellement 200000 substances identifiées appartiennent à 3 classes principales (**Vermerris et al., 2006**) :

3.1. Les composés phénoliques (dérivés des glucides) :

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes (tab. 01) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées extrêmement complexes), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, ...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, ...) (**Harborne et al., 1998**).

Tableau 01: Classification des composés phénoliques (Vermerris *et al.*, 2006).

Structure	Classe	Structure	Classe
C6	phénols simples	C30	biflavonyls
C6 - C1	acide phénolique,	C6-C1-C6,	benzophenones,
C6 - C2	acetophénones, acide phenylacetique	C6-C2-C6	xanthones, stilbènes
C6 - C3	acide cinnamique, cinnamyl aldehyde, cinnamyl alcohol	C6, C10, C14	quinones
	coumarine, isocoumarine, chromones	C18	betacyanines
C15	chalcones, aurones, dihydrochalcones	Lignans,	dimères ou oligomères
	flavanes, flavones, flavanones	neolignans	polymères
	flavanonols, anthocyanidins,	Lignin	oligomères ou polymères
	anthocyanins	Tannins	polymères
		Phlobaphenes	polymères

3.1.1. Acides phénoliques :

Ils appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques, dérivés de l'acide benzoïque, ont une structure de base de type C6-C1 et les acides hydroxycinnamiques dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique (fig. 01) (Vermerris *et al.*, 2006).

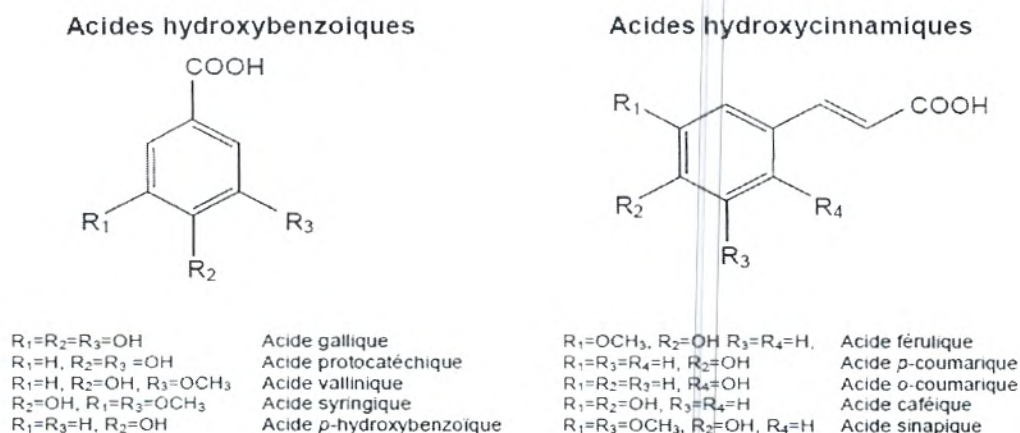


Figure 01: Les deux groupes de l'acide phénol (Vermerris *et al.*, 2006).

3.1.2. Tanins (C15)_n :

Ce sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau, capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines (Vermerris *et al.*, 2006).

Ils sont très répandus dans le monde végétal, leur teneur et leur nature varient d'une espèce à l'autre. (Harborne, 1988).

Khanbabaee et Van Ree, (2001) ont divisé les tanins en deux groupes principaux d'après leurs structures et leurs propriétés, les tanins condensés et les tanins hydrolysables (fig. 02).

- *Les tanins hydrolysés*, essentiellement localisés dans les dicotylédones des angiospermes (Haslam, 1981), 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

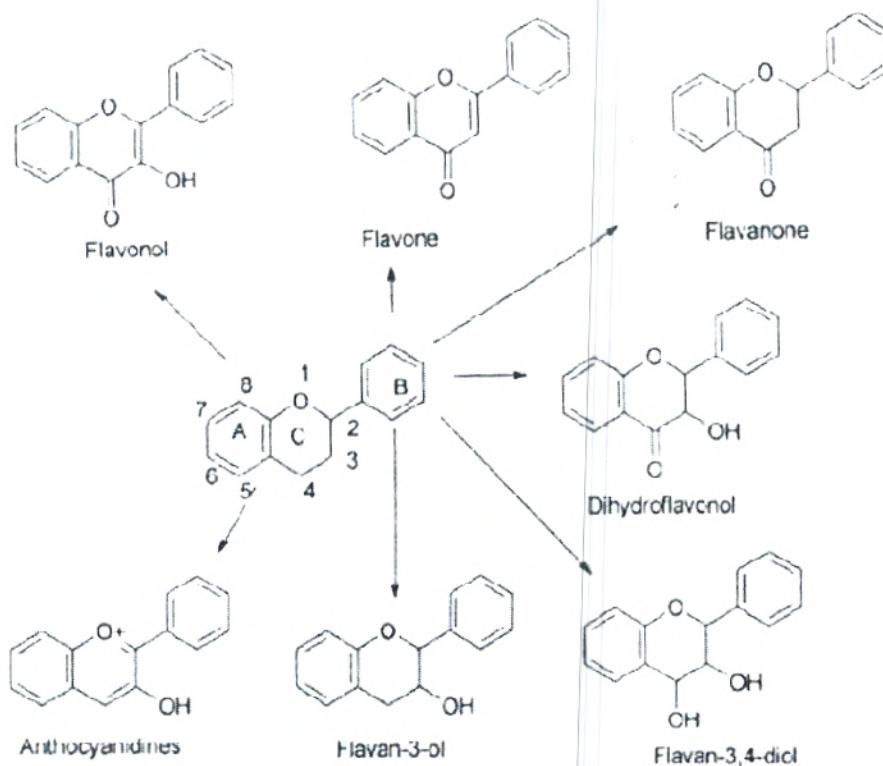


Figure 04: Familles des Flavonoïdes (Grotewold, 2006).

3.1.4. Phénylpropanoïdes :

Ils dérivent de l'acide aminé phénylalanine et peuvent contenir un ou plusieurs résidus C_6-C_3 . Parmi les phénylpropanoïdes, on trouve :

- *L'acide hydroxy- cinnamique* (dérivés par estérification) qui est le plus répandu ; Formés à partir de l'acide cinnamique ou p-coumarique, ils sont à l'origine des voies de synthèse de nombreuses substances telles que les lignines, les flavonoïdes, les stilbènes.
- *Les coumarines* (dérivés par cyclisation) sont des lactones des acides 2- hydroxy- Z- cinnamiques (Bruneton, 1999). Elles possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette. Ses dérivés dont plus de 300 structures sont connues. On les divise en coumarines simples et coumarines complexes (furocoumarines, pyranocoumarines) (Paris et al., 1981).

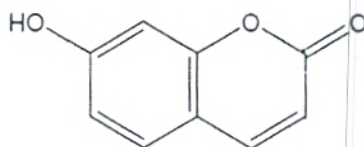


Figure 05: Structure de coumarine.

- *Les phénylpropènes* contribuent à la saveur parfumée et l'odeur des plantes.
- *Les lignanes* « dimères $(C_6-C_3)_2$ » (Harborne, 1998).

3.1.5. Quinones et Emodoles :

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) ;
- Anthraquinones (assez répandues) : Ce sont des composés combinés à des sucres, colorés en orangé rouge.

Les émodoles sont des dérivés hydroxyanthracéniques.

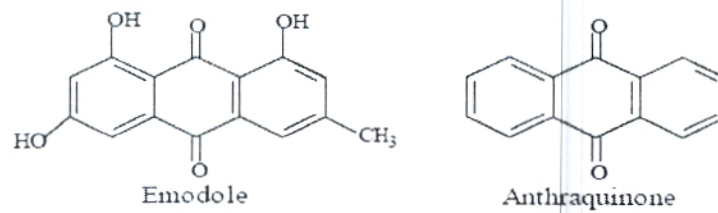


Figure 06: Structure d'Emodole et de Quinone.

3.2. Les isoprénoïdes (dérivés des lipides) : *Stéroïdes et Terpénoïdes*

Les terpènes sont classés en fonction du nombre d'unités d'isoprènes à cinq atomes de carbone dont ils sont issus (tab. 02) (Harborne, 1998):

Tableau 02: Les différentes classes des terpénoïdes. (Bruneton, 1999 ; Harborne, 1998 ; Paris *et al.*, 1981).

e d'unité de carbone	Classes	Différents types		
2	C ₁₀	Monoterpénoïdes	Ils constituent la majeure partie des huiles essentielles	
3	C ₁₅	Sesquiterpénoïdes	Sesquiterpènes (constituants des huiles essentielles), Lactones sesquiterpéniques, Abscissines (acide abscissique)	
4	C ₂₀	Diterpénoïdes	Diterpènes résinoïdes, Diterpènes toxiques, Gibbérellines (acide gibbérellique).	
5	C ₂₅	Sesterpénoïdes		
6	C ₃₀	Triterpénoïdes	A l'état libre	Triterpènes
				Phytostérols
			Sous forme d'hétérosides	Saponines : <ul style="list-style-type: none"> • Ce sont des glycosides de triterpènes et stérols. • Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives et moussantes. • Selon la nature de leurs génines, on distingue deux groupes de saponosides, stéroïdiques et triterpéniques.
				Glycosides cardiaques
8	C ₄₀	Tétraterpénoïdes	Caroténoïdes	
n	C _n	Polyterpénoïdes	Caoutchouc	

3.3. Les composés azotés (dérivés des acides aminés) : *Alcaloïdes*

Les alcaloïdes dérivent d'une sous famille de composés azotés, qui désignent l'ensemble des composés azotés produits par les plantes qui ne sont pas classés dans les sous familles suivantes : peptides, acides aminés, glycosides cyanogéniques, glucosinolates, cofacteurs, phytohormones (Robinson *et al*, 1989). Ce groupe contient plus de 10 000 composés classés selon leurs hétérocycles (Amrit P.S., 2002): Pyridine (Nicotine), Isoquinoline (Papavérine), Pyrrolidine (Atropine), Quinoline (Quinine), Phénanthrène (Codéine).

1. Eau et éther de pétrole: extraction des huiles fixes, des huiles essentielles et des stéroles.
2. Chloroforme et éther di-éthylique : extraction des alcaloïdes.
3. Eau et alcools: extraction des glycosides.
4. Alcools et acétate d'éthyle: extraction des composés phénoliques.

Le liquide obtenu est concentré par évaporation pour avoir un extrait liquide ou concentré par séchage pour avoir un extrait solide.

La séparation se fait par des méthodes chromatographiques ou par l'électrophorèse. L'identification se fait par Spectrométrie ultra-violet, Infrarouge, spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire (Harborne, 1998).

6. Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont recherchés parce qu'ils sont reconnus pour leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques, gastro-intestinales, antioxydantes.... Les métabolites les plus importants au plan pharmacologique sont cités dans le tableau 03 (Harborne, 1998 ; Bruneton, 1999).

Tableau 03 : Les propriétés pharmacologiques de quelques métabolites secondaires.

<i>principales familles</i>		<i>Propriétés pharmacologiques</i>
Saponosides		Diurétiques Désinfectants des voies urinaires
Anthraquinones		Puissants laxatifs et purgatifs
Terpènes	Huiles essentielles	Anti-infectieux
	Diterpène (Taxol)	Anticancéreux
	Triterpène (Digitaline)	Contre l'insuffisance cardiaque
Alcaloïdes		Antalgiques majeurs (morphine), Stimulants de système nerveux central, diurétique doux (nicotine), Antipaludique (quinine), Antifibrillants (quinidine), Amœbicides (émitine), Combattre l'excès d'acide urique (colchicine), Stupéfiants, anesthésiques locaux (cocaïne, mescaline), Cholinergique (pilocarpine), Anticancéreux (vinblastine, vincristine).
Tanins		Antimicrobiens, Antiviraux, Hypoglycémiant, Antiinflammatoire, Réduire l'irritabilité et la douleur, arrêter les petits saignements dus à leur caractère astringent.
Coumarines		Augmentation de la résistance des vaisseaux sanguins Soins des hémorroïdes et des varices Anti-œdémateux
Flavonoïdes		Antimicrobiens, Antiviraux, Hypoglycémiant, Antioxydant, Vasculoprotecteur, Antihépatotoxique, Antiallergique, Antiinflammatoire.
Anthocyanosides		Anti-œdémateux

III. LES OXYDANTS ET LES ANTIOXYDANTS :

1. Introduction :

Ce que certaines recherches scientifiques récentes ont mis en évidence, c'est qu'il y aurait des facteurs communs responsables aussi bien du vieillissement que du cancer, des maladies cardiaques, de l'arthrite, du parkinson, d'Alzheimer, et peut être même de certaines allergies et d'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'*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 » qui inclut « les radicaux libres » de l'oxygène proprement dit, mais aussi certain dérivé oxygéné réactif non radicalaire dont la toxicité est importante (Cohen, 2002 ; Novelli, 1997).

L'organisme est équipé pour lutter contre les ERO, un énorme système de défense est en permanence en place, avec des systèmes enzymatiques et/ou des systèmes de régénération de complexes mettant en jeu par exemple l'acide ascorbique (vitamine C) ou le glutathion, ce sont « Les composés antioxydants ».

Mais 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. « Stress oxydatif » (Le Cren, 2004).

2. Les oxydants :

Ce sont des molécules instables, en quête d'électrons, et donc susceptibles de réagir immédiatement avec tous les constituants de la cellule (ADN, protéines, lipides) et de provoquer de graves altérations voire la mort de la cellule.

Un radical peut être :

- *Neutre* : Il s'agit d'un électron excité de la même molécule qui a changé d'orbite, mais sans changer d'atome.
- *Positif* : Perdu un électron (chargé négativement)
- *Négatif* : Gagné un électron (chargé positivement). En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électrons à partir de l' O_2 (Droge, 2002).

Il existe d'autres bases de radicaux libres suivant l'atome majeur qui est présent, tels que : le radical carbone, azote ou le soufre

On distingue deux grandes classes de radicaux libres : les radicaux libres primaires « $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2^-$ » (tab. 04), directement formés à partir de l'oxygène et les radicaux libres secondaires ou organiques générés par l'action des radicaux libres primaires (**Le Cren, 2004**).

2.1. Les radicaux libres primaires :

Les principaux radicaux libres primaires sont représentés dans le tableau 04.

Tableau 04 : Les principaux radicaux libres primaires (**Le Cren, 2004**).

Radicaux Libres	réaction	Antioxydants naturels
Ion superoxyde « $\cdot\text{O}_2^-$ »	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).	Neutralisé par SOD (superoxyde-dismutase) qui se trouve sous trois formes (Mn-SOD, Fe-SOD, Cu-SOD)
Peroxyde d'hydrogène « H_2O_2 »	Provient d'une réaction entre deux Ion superoxyde " $\text{O}_2^{\cdot-}$ ". Leur rôle dans la peroxydation lipidique (endommager les membranes cellulaires)	Neutralisé par GPX (glutathion peroxydase), sélénium, L-cystéine.
Radical hydroxyle « $\cdot\text{OH}$ »	Formé dans la cellule à partir $\text{O}_2^{\cdot-}$, et H_2O_2 , il est très puissant et attaque toutes les cibles cellulaires (acides nucléiques, acides gras et protéines) et crée des dégâts très importants.	Neutralisé par GPX, sélénium, vitamines B1 et B2.
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 au cours de la peroxydation lipidique.	

2.2. Les radicaux libres secondaires :

Ils ne sont pas formés spontanément. Ils sont formés par l'action d'un radical libre primaire sur un composant cellulaire (acides nucléiques, lipides membranaires, protéines).

Par exemple, le radical peroxyde ($\text{R-OO}\cdot$) est formé après que $\cdot\text{O}_2^-$ ou $\cdot\text{OH}$ ait agi sur un acide gras insaturé (peroxydation lipidique).

$\cdot\text{O}_2^-$ peut réagir aussi avec l'oxyde d'azote (NO), et produire le peroxyde d'azote ($\text{ONOO}\cdot$) qui peut inhiber la chaîne respiratoire (**Shiva et al., 2004**) et endommager différents composants mitochondriaux (complexe de la chaîne respiratoire, membrane, ADN). (**Bohr, 2002; Stevnsner et al., 2008**).

2.3. Les dérivés réactifs de l'oxygène :

Les espèces réactives ne sont pas uniquement produites en réponse d'un stress (pollution, fumée de tabac, fibres d'amiante, rayons Ultra-violet, pesticides...), mais également produites 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 :

2.3.1. Production endogène :

Les dérivés réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours de six types de réaction biochimique (fig. 08) (Goode *et al.*, 1993; Oldham *et al.*, 1998).

- La **respiration** : Au niveau des mitochondries, au cours du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) est produit (Hadi, 2004)
- Les cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages) possèdent une enzyme membranaire, la **NADPH oxydase**, qui est spécialisée dans la fabrication du radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), pour tuer les bactéries ou les virus.
- La **xanthine oxydase** est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP.
- Les **ions métalliques** comme le fer et le cuivre sont de remarquables promoteurs de processus radicalaire: ils transforment H_2O_2 en radical hydroxyle (OH^{\cdot}), encore plus toxique,
- Des radicaux libres sont produits au décours de la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes ainsi que durant le catabolisme de certains xénobiotiques.
- Des cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) à partir d'arginine et d'oxygène, dans une réaction catalysée par la NO-synthase. À forte concentration, le monoxyde d'azote réagit avec un radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) pour former un puissant oxydant : le peroxynitrite (ONOO^-). En outre, le peroxynitrite peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants (NO_2^{\cdot} , OH^{\cdot} ,... etc.).

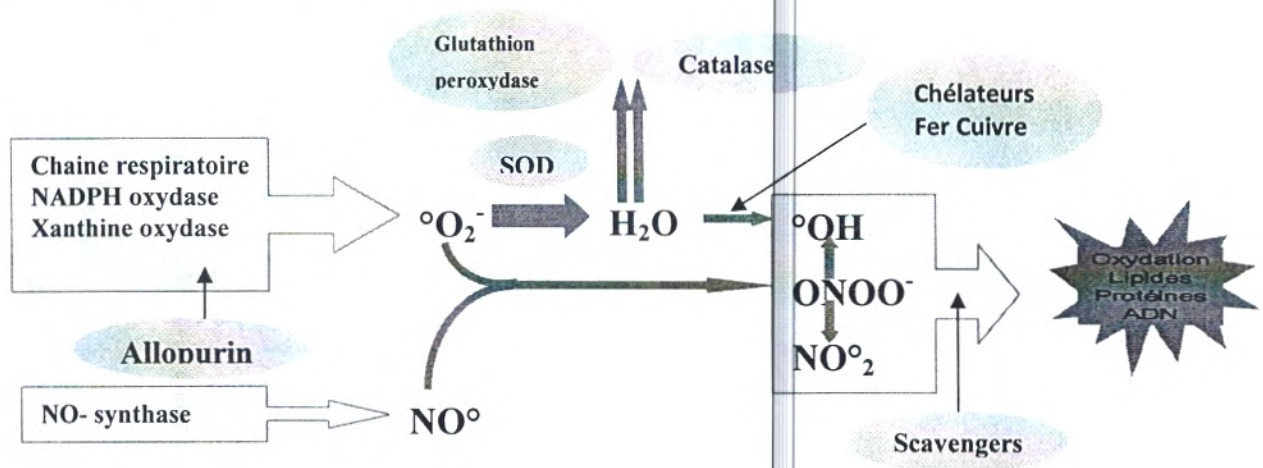


Figure 08 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène (Goode *et al.*, 1993; Oldham *et al.*, 1998).

2.3.2. Production exogène :

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Le tabac, la pollution, goudron, du soleil, de rayons ultra-violet, les radiations ionisantes, un effort physique intense, le stress, une mauvaise alimentation, l'ingestion d'alcool, etc... (Afonso *et al.*, 2007).

2.4. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques :

Les radicaux libres attaquent différents endroits du corps, mais ils ont trois grandes cibles privilégiées : les lipides, les protéines et les acides nucléiques. (Hadi, 2004).

2.4.1. Lipides :

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

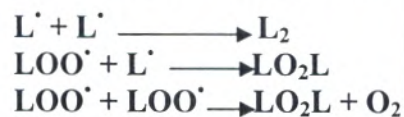
- *L'initiation* où se forme un premier radical libre « L' ». L'arrachement du proton « H » de la chaîne d'un acide gras « LH », qui est un composé radicalaire très réactif vis-à-vis de l'oxygène et qui va donc se transformer en radical peroxyde. « LOO' ».



- 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 ».



2.4.2. 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) (Morin *et al.*, 1998). 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).

2.4.3. 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 dans le vieillissement cellulaire (**Hochberg et al., 2006**).

3. Les antioxydants :

Les antioxydants peuvent être définis comme étant une substance qui, présente 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 antioxydants proviennent de l'alimentation comme les vitamines, les polyphénols. D'autres enfin 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 CoQ10 (**Pincemail et al., 1996**).

Dans l'alimentation, on trouve facilement tous les antioxydants qui font partie des trois groupes (les vitamines, les minéraux et les métabolites secondaires). La raison tient probablement au fait que les aliments contiennent une plus grande hétérogénéité d'antioxydants. De plus, les antioxydants synthétiques 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 synthétique bloque en fait l'activité de cette vitamine naturelle au niveau cellulaire (**Pelli et al., 2003**).

Il y a actuellement un regain d'intérêt en composés phytochimiques comme de nouvelles sources d'antioxydants naturels. L'objectif est de les utiliser dans les aliments et préparations pharmaceutiques afin de remplacer des antioxydants synthétiques, qui sont limités à cause de leurs risques potentiels pour la santé et la toxicité et qui ont été testés quant à leurs effets carcinogènes ou mutagènes (**Le Cren, 2004**).

3.1. Les moyens de défense :

3.1.1. Défense endogène (Les antioxydants primaires : la détoxification active) :

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces (l'élimination des radicaux libres primaires de façon permanente) (**Avissar et al., 1989**) (fig. 08).

3.1.2. Défense 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 phytonutriments.

Nous établissons ci-dessous un tableau (05) récapitulatif sur les principales substances utilisables pour lutter contre toute forme d'oxydation (Le Cren, 2004).

Tableau 05 : Principales substances antioxydantes (Le Cren, 2004):

Antioxydants primaires	Antioxydants secondaires (organiques) naturelles				Antioxydants de synthèse
	Vitamines	Minéraux	A Aminés et protéines	Phytochimiques	
Glutathion peroxydase (GPX)	Vitamines C vitamines E (Tocophérols)	Sélénium Zinc Manganèse	Cystéine Acide lipoïque Acide urique	Indoles Terpènes Polyphénols	-BHT (3,5ditertobutyl-4hydroxytoluène), -BHA(3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole)
Glutathion réductase (GRD)	Vitamines Q (ubiquinone) Vitamines A (rétinol, caroténoïdes)	Cuivre Magnésium Anhydride sulfureux (ou dioxyde de soufre SO ₂)	Bilirubine (pigment jaune de la bile) Glutathion (GSH)	Colorant Conservateur : Acide benzoïque et dérivés (E210-E219).	-TBHQ (tertiobutylhydroxyquinone) - PG (gallate de propyle) -le gallate de propyle (E310) -le gallate d'octyle (E311) -le gallate de dodécyle (E312)
Glutathion transférase (GRT)	Vitamines B5 (acide pantothénique)	(Just et al., 2005).			(Just et al., 2005).
Superoxyde dismutase (SOD)					
Catalase (Hadi, 2004 ; Cohen, 2002).					

3.2. Mécanisme d'action :

Les antioxydants de type phénolique réagissent selon un mécanisme proposé dès 1976 par **Sherwin**: l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être 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 (fig. 09).

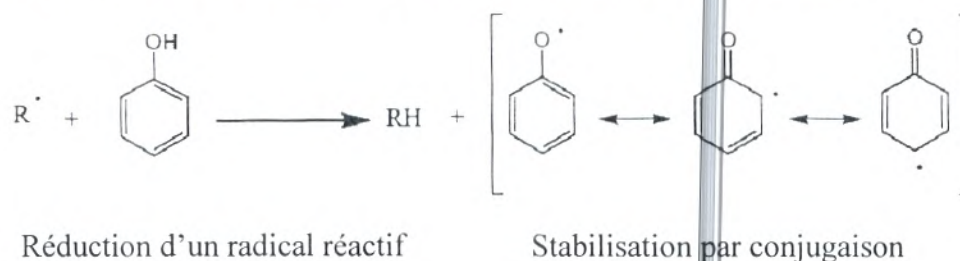


Figure 09 : Propriétés réductrices des polyphénols (Sherwin., 1976).

3.3. Mesure de l'activité antioxydante :

À l'heure actuelle, la capacité antioxydante des produits naturels contenant des polyphénols constitue un sujet de recherche très étudié. L'intérêt pour les antioxydants naturels a commencé depuis les années 1990 où on a largement identifié l'influence de plusieurs produits alimentaires et boissons sur la santé humaine qui s'avère être étroitement associée à la capacité antioxydante de polyphénols contenus. Ce dernier a stimulé le développement de méthodes efficaces et fiables afin de déterminer la capacité antioxydante de ces produits.

La détermination de la capacité antioxydante des produits naturels peut s'orienter dans deux directions. La première direction consiste à évaluer *in vitro* les propriétés intrinsèques des produits, c'est-à-dire l'étude du potentiel antioxydant, qui est déterminée par la quantité relative de composés antioxydants contenus dans les extraits et les propriétés antioxydantes de chacun des constituants. La seconde direction consiste à déterminer, *in vivo*, les propriétés antioxydantes sur des cellules, des enzymes ou l'organisme humain, en tenant compte de leur biodisponibilité. Le premier peut être examiné en utilisant des méthodes à l'aide d'outils physico-chimiques tandis que le second met en jeu des systèmes biologiques (**Roginski et al., 2005**).

Étant donné le vaste domaine du sujet, nous allons uniquement nous intéresser à la mesure de l'activité antioxydante des extraits végétaux par des méthodes physico-chimiques.

Les méthodes biologiques ne seront pas traitées dans le cadre de ce mémoire.

3.3.1. Le β -carotène comme indicateur d'oxydation : Le β -carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation ; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation. L'absorbance du β -carotène est mesurée à 470 nm avec et sans antioxydant (Goupy *et al.*, 2003).

3.3.2. Le test Rancimat : Ce test consiste à mesurer la dégradation d'un corps gras face à une autooxydation accélérée, dans un appareil automatisé qui chauffe les solutions à 100°C avec un apport d'air constant. Cet appareil détecte les composés volatils libérés, indiquant indirectement le degré d'oxydation des huiles (Mendez *et al.*, 1996).

3.3.3. Dosage des TBARS : Ce test dose les TBARS, "thiobarbituric acid reactive substances". Il permet de quantifier la peroxydation lipidique, dans le plasma, dans les aliments, en mesurant la libération du malondialdéhyde (MDA), un des produits majeurs de dégradation des lipides (Botsoglou *et al.*, 1994).

3.3.4. Le test FRAP : C'est une réaction chimique de réduction du Fer (III) présent dans le complexe K_3Fe en Fe (II). L'absorbance est déterminée à 700 nm. (Benzie *et al.*, 1996).

3.3.5. Test de réduction du radical stable, DPPH : Le composé à doser est ajouté à une solution de DPPH. La réaction de transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers le DPPH est suivie par spectroscopie visible en enregistrant la décroissance de la bande d'absorption du DPPH à 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995).

4. Conclusion :

On peut donc se rendre compte de la diversité des circonstances dans lesquelles se forment les radicaux libres. Cette production radicalaire est constante et entretenue par des éléments comme le fer et surtout par l'oxygène dont l'affinité pour les électrons célibataires est élevée. Ces radicaux libres sont à l'origine d'une certaine toxicité cellulaire (altération de l'ADN, de macromolécules et des membranes).

Comme nous l'avons mentionné, l'organisme dispose d'un système de défense cellulaire très élaboré et très efficace contre l'agression radicalaire, complété par les apports alimentaires en substances antioxydantes telles que la vitamine E, les caroténoïdes et les flavonoïdes essentiellement. Il en résulte, grâce à ces agents protecteurs, une certaine tolérance de l'organisme vis-à-vis du stress oxydatif. Les flavonoïdes sont actuellement d'ailleurs très étudiés dans le domaine des thérapeutiques antioxydantes, pour compenser l'insuffisance des moyens naturels de protection dans certains désordres comme le vieillissement physiologique et pathologique.

IV. LE POUVOIR ANTIMICROBIEN :

1. Introduction :

L'utilisation des plantes pour se soigner date de la préhistoire et tous les peuples sur tous les continents ont cette vieille tradition. Plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicale (Cowan, 1999).

Dans le but de trouver de nouvelles activités antimicrobiennes, plusieurs travaux ont été publiés sur les extraits de plantes (Ayşe *et al.*, 2004 ; Ponce *et al.*, 2003). Ils revêtent une grande importance et ils contribuent à l'orientation de nos populations vers les plantes ayant un réel pouvoir de guérison, leur offrant ainsi des remèdes à faible coût.

Ces travaux, en étudiant les principes actifs des plantes ou nouveaux agents antimicrobiens, offrent un grand avantage pour l'antibiothérapie qui, dans sa bataille contre les microbes pathogènes, doit disposer de nouvelles molécules biologiques pour lutter contre le phénomène d'apparition des résistances à l'usage fréquent des antibiotiques (Penge, 1992).

2. Techniques d'études des antibactériens :

L'étude des effets antibactériens des extraits de plantes se fait par la mesure des diamètres d'inhibition en milieu solide et par la détermination des Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) par la technique de dilution en milieu liquide couplée à l'étalement sur milieu solide telle que décrite par Chabert. Les milieux solide et liquide utilisés sont respectivement l'agar de MüllerHinton et le bouillon Müller-Hinton (Chabbert *et al.* , 1985).

3. Sites d'action des métabolites secondaires :

Les Sites d'action des classes majeures de composés antimicrobiens sont représentés dans le tableau 06 (Cowan, 1999).

Tableau 06 : Les classes majeures de composés antimicrobiens à partir de plantes (Cowan, 1999).

Classe	Sous-classe	Mécanisme
Les composés phénoliques	Les phénols simples	- Rupture de la membrane
	Les acides phénoliques	
	Les quinones	- Liaison à adhésines - Complexations avec la paroi cellulaire, d'inactiver les enzymes
	Les flavonoïdes	- Liaison à adhésines
	Les flavones	- Complexes avec la paroi cellulaire - Inactivation des enzymes - Inhibition de la transcriptase inverse du VIH
	Les tanins	- Se lient aux protéines - Lier à adhésines - Inhibition de l'enzyme - Complexations avec la paroi cellulaire - Rupture de la membrane - Complexations d'ions métalliques
	Les coumarines	- Interaction avec l'ADN chez les eucaryotes
Les terpénoïdes		- Rupture de la membrane
Les alcaloïdes		- S'insérer dans la paroi cellulaire et /ou de l'ADN

I. PROVENANCE DE LA PLANTE ETUDIEE :

La plante a été récoltée dans son habitat naturel dans la région de SEBDOU à environ 28 km au sud de Tlemcen (fig.10), durant le mois de Janvier 2009. Les paramètres géographiques de cette région sont représentés dans le tableau 07.

Tableau 07: Situation géographique de la station d'étude.

Station	Longitudes Ouest	Latitudes Nord	Altitudes (mètres)
Sebdou	1° 20'	34° 38'	720

La plante a été identifiée par les botanistes de Laboratoire *d'Ecologie et de Gestion des Ecosystèmes Naturels* au département de Biologie, Ecologie et Environnement, de l'université de Tlemcen.

Le matériel végétal est lavé à l'eau, séché à l'air libre et à l'obscurité pendant dix à quinze jours. Les racines et les feuilles ont été concassées séparément dans un mortier traditionnel, pulvérisées au broyeur, puis soumises à différentes extractions.

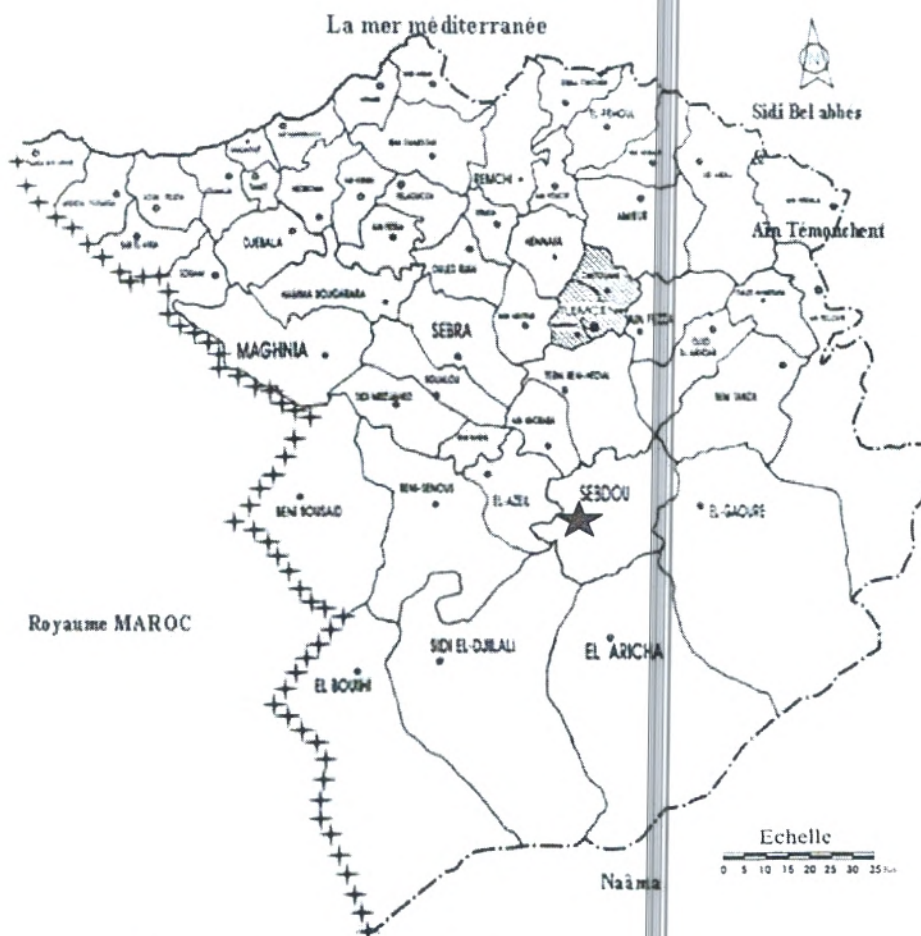


Figure 10 : Carte de localisation de la station de récolte.

II. LES TESTS PHYTOCHIMIQUES:

1. Substances polyphénoliques :

Pour les tests des tanins, flavonoïdes et anthocyanes, nous avons préparé un infusé à 5%, en projetant 5 g de poudre végétale dans 100 ml d'eau bouillante, pendant 15 minutes. Nous avons filtré les extraits sur du papier filtre et rincé avec de l'eau chaude de manière à obtenir 100 ml (Paris *et al.*, 1969).

1.1. Tanins :

Dans un tube à essai, nous avons introduit 5 ml d'infusé aqueux à 5% et 1 ml de solution aqueuse de FeCl_3 à 1%. La présence de tanin gallique ou catéchique se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée, noirâtre ou verdâtre.

Ainsi pour faire la différenciation entre les tanins nous avons utilisé le réactif de Stiasny dont le principe est le suivant:

A 30 ml d'infusé, nous avons ajouté 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40% + 5 ml de HCl concentré). Nous avons chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes. L'obtention de précipité indique la présence de tanin catéchique.

Nous avons filtré et saturé le filtrat avec de l'acétate de sodium pulvérisé. Le développement d'une teinte bleu noir après addition de quelques gouttes de FeCl_3 à 1% montre la présence de tanin gallique (Paris *et al.*, 1969).

1.2. Flavonoïdes :

2 ml d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 ml d'alcool chlorhydrique et 0,2 g de poudre de magnésium. Une coloration orange à rouge apparaît en présence des flavonoïdes (Debray *et al.*, 1971; Paris *et al.*, 1969).

Pour se confirmer, un deuxième test a été réalisé :

2 ml d'infusé aqueux sont ajoutés à une solution d'ammoniac dilué et de H_2SO_4 . La coloration jaune confirme la présence des flavonoïdes (Edeoga *et al.*, 2005).

1.3. Anthocyanes :

2 ml d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 ml de HCl 2 N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (Debray *et al.*, 1971; Paris *et al.*, 1969).

1.4. Dérivés anthracéniques:

Nous avons préparé un extrait chloroformique pour le test des anthracéniques libres et un hydrolysât pour les tests des anthracéniques combinés (Paris *et al.*, 1969).

- ♦ **Extrait chloroformique** : Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 g 2g de poudre végétale et 10 ml de CHCl_3 , fermer le tube. Après chauffage au bain-marie bouillant pendant 1 minute et filtration sur papier buvard, nous complétons à 10 ml avec du CHCl_3 .
- ♦ **Hydrolysât** : le résidu de poudre épuisé par le CHCl_3 est additionné de 10 ml d'eau distillée et 1 ml de HCl concentré. Après un chauffage au bain-marie bouillant pendant 15 minutes, nous avons refroidi la solution sous un courant d'eau et filtré. Le filtrat a été complété à 10 ml avec de l'eau distillée.

1.4.1. Anthracéniques libres: quinones :

La coloration plus ou moins rouge de l'extrait chloroformique (1 ml) additionné de NH_4OH dilué au demi, indique la présence d'anthraquinones libres.

1.4.2. Anthracéniques combinés :

♦ O-hétéroside (Anthraquinones) :

Nous avons fait un mélange à volume égal de 1ml d'hydrolysât et de CHCl_3 . Ensuite nous avons agité la solution. Après une décantation de la solution, nous avons soutiré la phase organique qui a été mise dans un tube à essai. Cette phase organique a été agitée avec 1 ml de NH_4OH dilué au demi.

La présence d'anthraquinone est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.

♦ Hétérosides à génine réduite :

Dans un tube à essai nous avons introduit 5 ml d'hydrolysât et 3 à 4 gouttes de FeCl_3 à 10%. Le tout est porté au bain-marie bouillant pendant 5 minutes puis refroidit sous courant d'eau. Nous avons agité la solution avec 5 ml de CHCl_3 . La phase chloroformique a été soutirée et agitée avec 1 ml de NH_4OH dilué au demi. En présence de produit d'oxydation anthranol, anthrone, la coloration rouge sera plus intense que précédemment.

♦ C-hétérosides (Anthracénosides) :

La phase aqueuse a été additionnée à 1 ml de FeCl_3 à 10% puis chauffé au bain-marie pendant 30 minutes. Après refroidissement sous courant d'eau, nous avons agité la solution avec 5 ml de CHCl_3 . La phase chloroformique soutirée a été agitée avec 1 ml de NH_4OH dilué. L'existence des C-hétérosides est confirmée par la coloration plus ou moins rouge après agitation.

1.5. Coumarines :

1 g de poudre végétale est placé dans un tube, en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous ultra-violet (Rizk, 1982).

2. Alcaloïdes :

Nous avons procédé à une macération de 24 heures, 2g de poudre végétale avec un mélange de 50 ml de H₂SO₄ dilué au demi et de l'eau distillée. Nous avons filtré le mélange et rincé à l'eau de manière à obtenir 50 ml de filtrat. Ensuite nous avons pris deux tubes à essai dans lesquels nous avons introduit 1 ml du macéré. Nous avons ajouté dans le tube 1 : 5 gouttes de réactif de Mayer et dans le tube 2 : 5 gouttes de réactif de Wagner.

La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (Paris *et al.*, 1969).

♦ Réactif de Mayer :

Dissoudre 1,358 g de HgCl₂ dans 60 ml d'eau distillée. Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau distillée. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un trouble plus un précipité blanc.

♦ Réactif de Wagner :

Dissoudre 2 g de KI et 1,27 g d'I₂ dans 75 ml d'eau distillée. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau distillée. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

3. Stérols et Terpénoïdes :

3.1. Saponosides (Dohou *et al.*, 2003) :

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Nous avons procédé à une décoction, 2g de poudre végétale avec 100 ml d'eau distillée. On porte à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3 cm de diamètre interne) avec 1, 2, ... 10 ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en

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

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

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

3.2. Stérols et triterpènes :

5g de poudre végétale, sont ajoutés à 100 ml d'eau distillée. Le tout est soumis sous reflux pendant 1h. 10ml de l'extrait aqueux sont évaporées. Le résidu est dissout par 0.5ml d'anhydride acétique et 0.5ml de CHCl₃. Mettre le tout dans un tube, ajouter 2ml de H₂SO₄. Un anneau rouge brun ou violet dans la zone de contact avec le surnageant ou une couleur violette indique la présence des stérols et triterpènes (Trease *et al.*, 1987).

III. LES EXTRACTIONS SELECTIVES :

1. Préparation des extraits bruts :

2 g de poudre végétale est mise à macérer dans un mélange hydro alcoolique (méthanol/eau ; 70/30 v/v), sous reflux pendant 2 heures. Après filtration, les solutions hydro-méthanoliques sont concentrées à sec sous pression réduite et à une température 60°C (Harborne., 1998).

2. Extraction des deux fractions de flavonoïdes:

Les résidus secs obtenus après évaporation du filtrat méthanolique, sont repris dans 20 ml d'acétate d'éthyle et le même volume d'eau distillée dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée (l'opération est répétée deux fois), puis séchée par un évaporateur rotatif sous pression réduite à 60 °C. Le résidu sec est repris, par quelques millilitres de méthanol ou DMSO. *Cette fraction est la phase d'acétate d'éthyle.*

La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est reprise dans 20 ml du n-butanol. (l'opération est répétée deux fois). La phase n-butanol est séchée au rotavapor à 60°C (Bekkara *et al.* 1998).

3. Extraction des Tanins :

10 g de poudre végétale sont ajoutés à 20 ml d'eau distillée et à 50 ml d'acétone. Laisse macérer pendant 4 jours à la température ambiante. Filtrer et extraire la solution 2x50 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Décapter et extraire la phase aqueuse 4x50 ml d'acétate d'éthyle, ensuite évaporer le solvant à sec (**Harborne., 1998**).

4. Extraction des saponosides :

10g de poudre végétale sont ajoutés à 30 ml d'eau distillée et 20 ml d'éthanol 96%. L'ensemble est porté à reflux pendant 4h. Filtrer le marc et extraire le filtrat avec 4x50 ml de n-butanol. Evaporer l'éthanol et l'eau. Concentrer la phase organique et précipiter les saponosides par l'ajout de 15 ml d'éther diéthylique (**Harborne., 1998**).

5. Extraction des quinones :

5g de poudre végétale, sont humectés par quelques gouttes d'acide chlorhydrique dilué et sont placés dans une fiole conique bouchée avec 30 ml du mélange éther-chloroforme. Après 24 heures de macération, le solvant est filtré, ensuite évaporer à sec (**Harborne., 1998**).

6. Calcul des rendements en extraits secs :

Nous pouvons déterminer le rendement des plantes en extrait sec en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt \%} = \frac{[P_1 - P_2]}{P_3} * 100$$

P1 : Poids du ballon après évaporation ; **P2** : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la matière végétale de départ.

L'extrait sec est pesé et 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 antibactérienne.

IV. DOSAGE DES POLYPHENOLS:

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (Boizot *et al.*, 2006).

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par Vermerris *et al*, 2006 : 0,1 ml de l'extrait brut méthanolique est mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 min, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 min à la température ambiante et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif. Les concentrations utilisées sont 3. 6. 9. 12. 14. 17. 19 µg/ml.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g).

V. ÉTUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE :

1. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Pan et al., 2008**, basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} . Cette capacité réductrice peut servir comme un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle d'un composé. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm.

1 ml de l'échantillon à différentes concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1mg/ml), est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5 ml d'une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidis à la température ambiante. 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. 2.5 ml du surnageant sont ajoutés à 2.5 ml d'eau distillée et 500 μl d'une solution de $(\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O})$ à 0.1% sont ajoutés au mélange.

La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique et le Butylhydroxytoluène (BHT) sont utilisés comme contrôles positifs dans cette expérience, aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

2. Piégeage du radical libre DPPH:

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) 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. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (**Bozin et al., 2008**).

La méthode de DPPH présente plusieurs avantages du fait qu'elle soit indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire le radical DPPH. La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde.

Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH, est celui de **Blois, 1958** et **Benhammou *et al.*, 2007** :

À différentes concentrations, 50 µl de chaque extrait méthanolique, sont ajoutés à 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à $6,34 \cdot 10^{-5}$ M (0.002g dans 100ml méthanol), pour chaque concentration un blanc est préparé. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution.

La lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

♦ *Calcul des pourcentages d'inhibition :*

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante:

$$I\% = [(AC - AT) / AC] * 100$$

AC : Absorbance du contrôle ;

AT : Absorbance du test effectué.

♦ *Calcul des IC50 :*

IC50 (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC50 (*Efficient concentration50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC50 sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés.

VI. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE:

1. Les souches utilisées :

Les tests de l'évaluation de l'activité antibactérienne ont été réalisés dans le laboratoire *Produits Naturels* «LAPRONA ». Les quatre souches bactériennes testées ont été fournies par l'équipe de microbiologie du laboratoire Antibiotique, Antifongique en Novembre 2007. Les bactéries utilisées sont des souches de références (tab 08):

Tableau 08 : Les souches bactériennes étudiées.

Souches utilisées			
Bactéries	Gram négatif	<i>Bacilles</i>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
	Gram positif	<i>Coccies</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)
			<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)

2. Préparation de l'inoculum:

Chaque culture doit être ensemencée en stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies isolées. Après une incubation à 37°C pendant 24h, choisir 4 à 5 colonies bien isolées et les transférer avec une anse dans un tube de bouillon nutritif (ou eau physiologique 0,9 %). Incuber le bouillon à 37°C jusqu'à ce qu'il devienne trouble et ensuite ajuster la turbidité à la bonne densité au standard McFarland 0,5 (équivalent à 10⁸ UFC/ml) à l'aide d'un spectrophotomètre, ce qui correspond à une densité optique entre 0,08 à 0,1 lue à 625nm (EUCAST, 2003).

3. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide :

- ♦ L'inoculum ainsi préparé est dilué au 1/100^{ème} dans l'eau physiologique. La densité finale de l'inoculum obtenue est équivalente à 10⁶ UFC/ ml.
- ♦ Les boîtes de pétri contenant le milieu gélosé (Muller Hinton) sont inoculées par 3 à 4ml de l'inoculum (10⁶ UFC/ml) par inondation pendant 30 mn. Les boîtes de pétri sont ensuite mises à sécher 15 mn à 37°C (Joffin, 2006).
- ♦ Les supports des extraits sont des disques de papier filtre (wattman n°3) de 6 mm de diamètre. Ces disques sont imprégnés par 3µl d'extrait à testé (tab.10). Les disques témoins sont imprégnés par 3µl l'eau distillée et de DMSO pur.

- ♦ Les disques sont déposés aseptiquement sur la gélose inoculée. Les boîtes sont incubées 24h à 37 °C. L'activité antibactérienne est déterminée par la mesure du diamètre des zones d'inhibitions autour des disques, à l'aide d'une règle transparente.
- ♦ L'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide au tour de disque identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré et exprimé soit en centimètre soit en millimètre (Joffin, 2006).

4. Nature de l'activité antibactérienne :

Afin de déterminer la nature de l'activité antibactérienne (Bactéricide ou Bactériostatique) d'un extrait actif, un prélèvement d'un disque d'agar à partir de la zone d'inhibition a été effectué. On le dépose sur la surface d'une gélose nutritive. Les boîtes sont placées dans l'étuve à 37°C pendant 24 h (fig. 11). La présence d'une croissance bactérienne indique que l'extrait à testé est bactériostatique. Dans le cas contraire, l'extrait est bactéricide (Joffin, 2006).

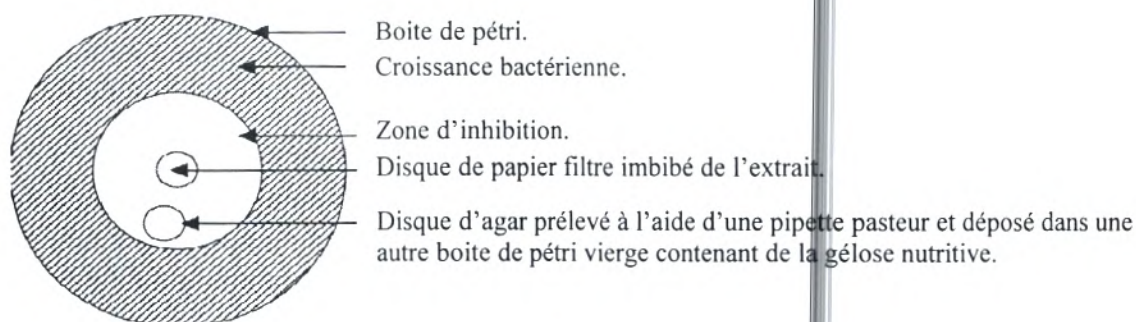


Figure 11 : Prélèvement d'un disque à partir de la zone d'inhibition.

5. Concentration Minimale Inhibitrice sur milieu liquide :

Une plaque à 96 puits permet la détermination de la CMI de 8 extraits végétaux vis-à-vis d'une même souche.

- ♦ Dans les cupules des colonnes 1 à 12, introduire, à l'aide d'une micropipette à embout stérile, 100 µl de bouillon Mueller- Hinton.
- ♦ puis introduire 100 µl de l'extrait végétal dans le premier puits.
- ♦ reporter de puits en puits, de 1 à 12, à l'aide d'une micropipette de 100 µl. donc sera des dilutions sériées (le facteur de dilution $\frac{1}{2}$ est prit en considération dans le calcul de concentrations des produits à tester).donc les puits contient 100 µl de bouillon et le produit tester en dilution.

♦ redistribuer 100 µl de l'inoculum (10^6 UFC/ml) dans les 96 puits. La microplaque est couverte est incubée à 37°C pendant 24h. Le DMSO doit être à raison de 2% au maximum. La lecture est effectuée à l'œil nu et la CMI est la plus faible concentration de la substance testée, auquel aucun trouble visuel n'est observé. (fig. 12) (CaSfm, 2008).

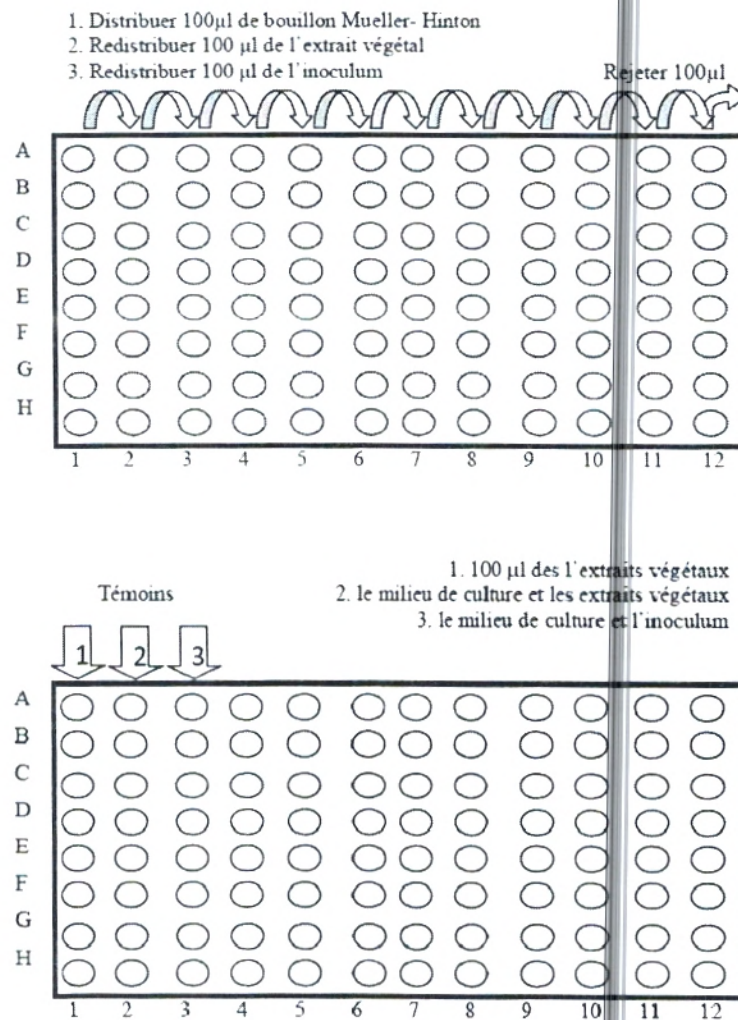


Figure 12 : Schéma d'utilisation d'une microplaque.

Chapitre3 : *Résultats et discussion*

I. LES TESTS PHYTOCHIMIQUES :

1. Introduction :

Les constituants de la plante issus de métabolisme secondaire, permettent une excellente identification de la drogue. Pour les plantes dont la composition chimique n'est pas connue, et pour avoir une idée sur leur activité, nous devons chercher à identifier certains principes actifs.

Dans le présent travail, nous avons recherché quelques métabolites secondaires dans la plante « *Echium pycnanthum* ».

Les tests phytochimiques sont réalisés sur différents extraits préparés à partir des feuilles et racines, séchées et broyées, en utilisant deux solvants de polarités différentes : Eau et Chloroforme. Ils sont généralement simples, rapides à mettre en œuvre, réalisés le plus souvent en tubes à essai. La méthode de détection des différentes familles de composés chimiques co- existantes, consiste en une réaction de précipitation, de turbidité, de floculation ou une coloration par des réactifs spécifiques.

Les résultats sont classés selon:

- Réaction positive: présence.
- Réaction négative: absence.

2. Résultats et discussion :

Les résultats expérimentaux mentionnés dans le tableau 09, montrent que les **tanins**, les **flavonoïdes**, les **anthracénosides**, les **saponosides** et les **stérols et triterpènes** sont présents dans les feuilles et les racines d'*Echium pycnanthum*, avec des intensités variables.

Les tanins sont présents avec une intensité importante dans les feuilles par rapport aux racines. Sa présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique donnant une coloration verte foncée, il s'agit donc des tanins catéchiques.

Selon la hauteur de la mousse, les racines apparaît être plus riches en saponosides par rapport au feuilles. Ce résultat est confirmé quantitativement par le calcul de l'indice de mousse qui doit être supérieur à 100. Ces indices (tab.09) confirment la présence des soponosides dans les feuilles et les racines de la plante avec des indices de 250 et 350 respectivement. Cependant, le témoin saponaire (*Saponaria officinalis*) a un indice (IM=395) proche de celui des racines et supérieur de celui des feuilles (Dohou *et al.*, 2003) .

Enfin, nous avons pu remarquer la présence des **quinones** dans les racines, des **alcaloïdes** et des **hétérosides à génines réduite** dans les feuilles, et l'absence totale des **coumarines**, des **anthraquinones** et des **anthocyanes** dans les deux parties des la plante.

II. LES RENDEMENTS EN EXTRAITS :

Les extractions des extraits bruts, flavonoïdes, tanins et saponosides à partir des deux parties de la plante et des quinones à partir des racines ont été réalisées en utilisant des méthodes d'extractions solide/liquide et liquide/liquide par des solvants spécifiques pour chaque extrait. Les différents rendements obtenus, sont représentés dans le tableau 10 et la figure 13.

Tableau 10: Les rendements en extraits obtenus à partir des deux parties de la plante.

Les extraits	Les solvants utilisés	Rendement %		
		Feuilles	Racines	<i>E. vulgare</i>
Extrait brut	Méthanol/Eau	21.3	5	7.5 (Filomena et al. 2009)
Flavonoïdes : fraction Acétate d'éthyle	Acétate d'éthyle	2.1	1.6	
Flavonoïdes : fraction butanolique	Butanol	5.64	1.98	
Saponosides	Ether diéthylique	3.46	4.6	
Tanins	Acétone	3.61	1.00	
Quinones	Ether/Chloroforme	-	1.51	

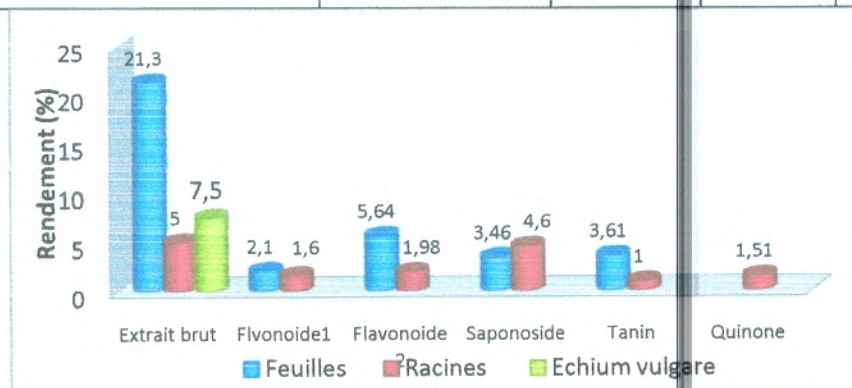


Figure 13 : Les rendements en extraits obtenus à partir des deux parties de la plante.

Les résultats obtenus, montrent que les rendements en extraits des deux parties de la plante sont plus ou moins variables, et sont plus importants dans les feuilles par rapport aux racines. Pour les deux parties de la plante, le plus grand rendement trouvé est raisonnablement celui de l'extrait brut. Ces rendements viennent confirmer les intensités des résultats des tests phytochimiques.

Une extraction hydroalcoolique faite par **Filomena et al. (2009)** montre que le rendement de l'extrait brut des feuilles d'*Echium vulgare* qui est de « 7.50% », est largement inférieur à celui de l'extrait brut des feuilles de notre plante.

III. DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX:

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées par ce qu'ils sont réputés pour leurs excellentes propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

Pour ces raisons, un dosage de ces composés a été effectué pour les deux parties de la plante étudiée, et ce par la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-Ciocalteu. Les teneurs obtenues sont exprimées en mg, équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (fig. 14).

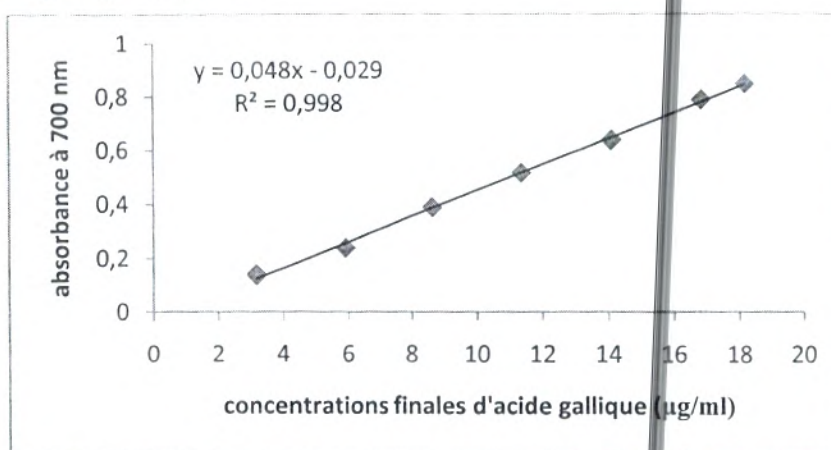


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Nous avons pu constater que la teneur en polyphénols totaux dans les feuilles est la plus élevée avec une concentration de **262,98** mg GAE/g. Pour les racines, elle est de **100,08** mg GAE/g. Ces résultats sont en corrélation avec les rendements en extrait sec.

Ces résultats sont comparés avec ceux de l'étude faite par **Filomena et al., (2009)**, qui montre que *Echium vulgare* présente une faible teneur en polyphénols totaux 68 ± 0.73 mg GAE/g par rapport à nos extraits.

Conclusion :

La détermination de la teneur en phénols totaux donne une idée du potentiel antioxydant des extraits, mais elle ne peut pas être utilisée pour prédire le comportement antioxydant. En effet, il s'agit d'une méthode générale qui ne donne pas d'information concernant la nature des molécules phénoliques qui se trouvent dans les extraits. Par conséquent, on ne pourra pas établir de relations *a priori* entre la quantité des phénols et l'effet antioxydant (**Martha, 2008**). Cela nous a conduits à faire une étude du pouvoir antioxydant par des méthodes spécifiques, réduction de fer et piégeage de DPPH.

IV. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE :

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

- L'extrait brut des racines et feuilles ;
- Les deux fractions de flavonoïde acétate d'éthyle et butanol des racines et feuilles ;
- Tanins des racines et feuilles ;
- Saponosides des racines et feuilles ;
- Quinones des racines.

L'acide ascorbique et le BHT sont connus pour leurs propriétés anti-oxydantes et sont utilisés comme contrôles positifs.

1. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :

Nous avons étudié l'activité antioxydante des extraits de la plante *Echium pycnanthum*, par la méthode de réduction de Fer, afin de tester et localiser l'extrait le plus actif de chaque partie de la plante étudiée.

Par des dilutions en cascade des différents composés à tester, ainsi que des substances de référence, l'acide ascorbique et le BHT, nous obtenons une gamme de concentrations allant de 1 à 0,1 mg/ml. Pour chaque concentration, nous mesurons les densités optiques à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Ozturk et al., 2007 ; Su et al., 2008 ; Liu et al., 2009**).

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats, représentés dans les figures 15-20, nous a permis de déduire que pour tous les extraits testés une augmentation de la réduction du fer est proportionnelle avec les concentrations utilisées.

1.1. Extraits bruts :

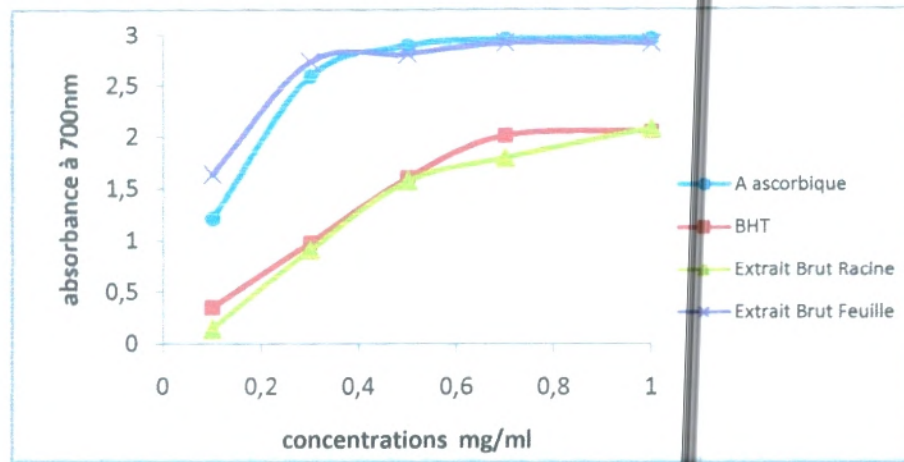


Figure 15: Pouvoirs réducteurs des extraits bruts, de BHT et de l'acide ascorbique.

Les résultats expérimentaux représentés dans la figure 15, montrent que la capacité à réduire le fer est presque la même pour l'extrait brut des feuilles d'*Echium Pycnanthum* et l'antioxydant de référence l'acide ascorbique. Il est presque totalement réduit à partir d'une concentration de 0,5 mg/ml (début de la phase stationnaire).

La même remarque est observée pour l'extrait brut des racines et l'antioxydant synthétique le BHT, mais le Fer est presque totalement réduit à partir d'une concentration de 0,7 mg/ml.

1.2. Flavonoïdes :

1.2.1. Fraction d'acétate d'éthyle :

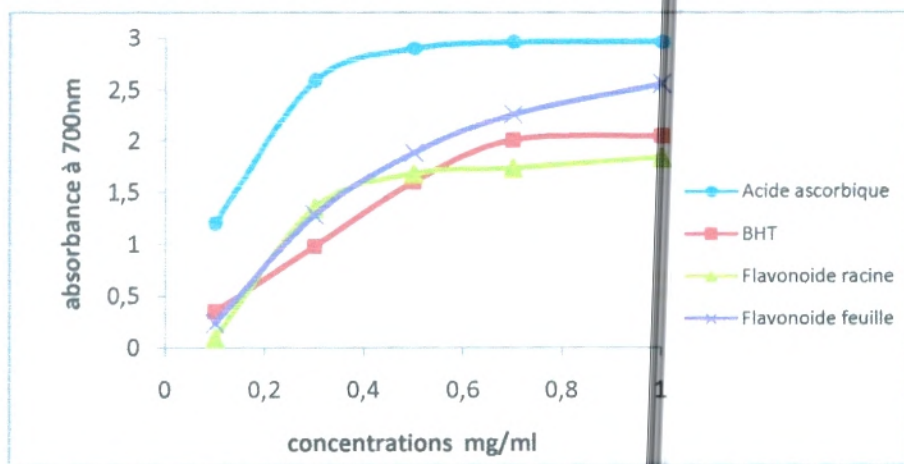
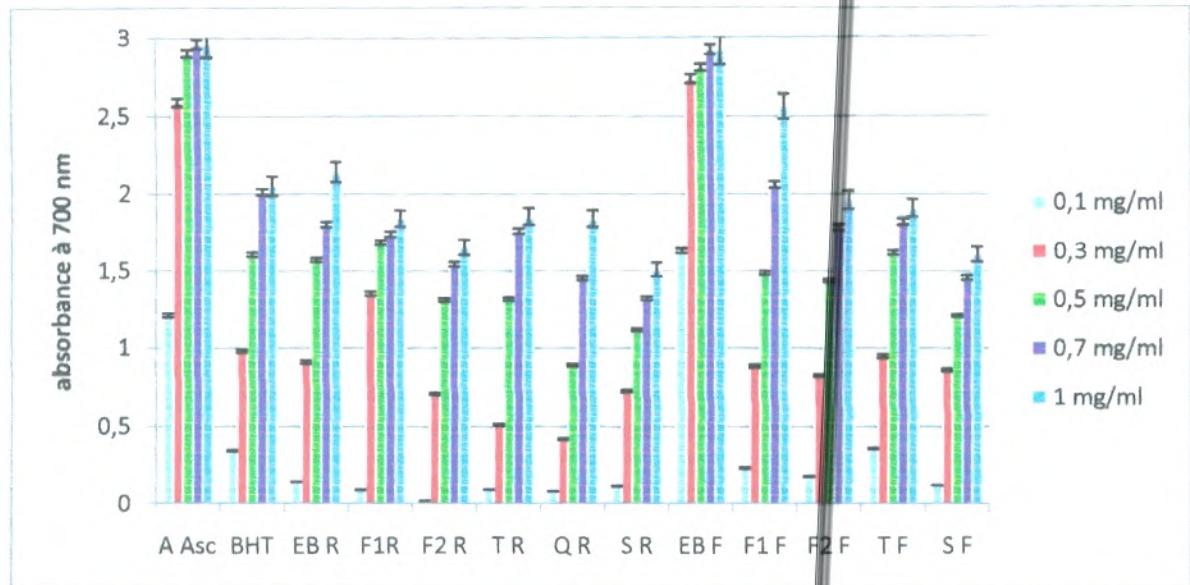


Figure 16 : Pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction d'acétate d'éthyle), de BHT et de l'acide ascorbique.

La fraction d'acétate d'éthyle des feuilles a montré une capacité à réduire le fer intermédiaire entre celles de l'acide ascorbique et du BHT.

Par contre, la fraction d'acétate d'éthyle des racines a montré une capacité à réduire le fer inférieure à celle de l'acide ascorbique. Elle est presque similaire à celle de BHT à une

La capacité à réduire le fer de l'extrait des quinones des racines est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique. Elle est inférieure à celle de BHT et deviennent plus ou moins proche à une concentration de 1mg/ml (DO= 1,843. DO= 2,052 respectivement) (fig. 20).



AAS : Acide Ascorbique

EBF : Extraits Bruts des Feuilles

F1F : Fractions d'acétate d'éthyle des Feuilles

F1R : Fractions d'acétate d'éthyle des Racines

TF : Tanins des Feuilles

SF : Saponosides des Feuilles

QR : Quinones des Racines

BHT : Butylhydroxytoluène

EBR : Extraits Bruts des Racines

F2F : Fraction Butanoliques des Feuilles

F2R : Fraction Butanolique des Racines

TR : Tanins des Racines

SR : Saponosides des Racines

Figure 21 : Pouvoir réducteur de tous les extraits de la plante.

Le pouvoir réducteur de tous les extraits de la plante est présenté sous forme d'histogramme (fig.21). Il montre que le profil de réduction du fer change pour les deux parties de la plante étudiée, avec une capacité plus importante pour les extraits des feuilles.

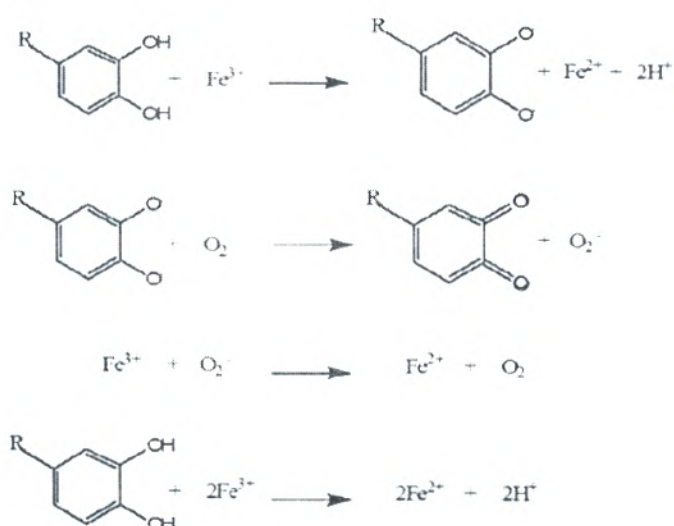
Nous pouvons classer la puissance de réduction du fer des différents extraits, à la concentration de 1mg/ml, comme suit : Extraits bruts des feuilles > **Acide Ascorbique** > Fractions d'acétate d'éthyle des Feuilles > Extraits Bruts des Racines > **BHT** > Fraction Butanoliques des Feuilles > Tanins des Feuilles > Tanins des Racines > Fractions d'acétate d'éthyle des Racines > Quinones des Racines > Fraction Butanolique des Racines > Saponosides des Feuilles > Saponosides des Racines.

De ce classement, nous pouvons déduire que l'activité antioxydante remarquable de l'extrait brut des feuilles peut être due à l'effet synergique entre les composés de cet extrait. Les flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle) des feuilles et l'extrait brut des racines ont une capacité intermédiaire entre l'acide ascorbique et le BHT, alors que tous les autres extraits ont montré une capacité inférieure à celle de ces deux substances de référence.

En revanche, les saponosides des feuilles et des racines présentent une faible activité, ce qui confirme le rôle des composés polyphénoliques dans la réduction de fer.

Une étude récente faite sur la capacité de réduction de fer par les composés polyphénoliques des plantes a indiqué que le noyau catéchol est la seule structure qui est associée positivement dans le pouvoir réducteur et selon cette étude, cette structure augmente le pouvoir réducteur d'un composé à 36% par rapport à un autre qui n'en contient pas. Ils ont suggéré que cette activité a été due à la participation des groupements $-OH$ liés au noyau catéchol (DeGraft *et al.*, 2007).

La réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} par les groupes $-OH$ du catéchol peut être décrite par les quatre réactions suivantes :



L'oxydation initiale du catéchol par Fe^{3+} conduit à la génération de Fe^{2+} et une structure en semi-quinone (**réaction A**). La semi-quinone peut réagir avec l' O_2 dissout dans le mélange réactionnel avec une libération ultérieure d'ions superoxydes (**réaction B**). L'ion superoxyde peut également réduire l'ion Fe^{3+} (**réaction C**). Ainsi, l'oxydation de 2 groupements $-OH$ peut résulter de la réduction de 2 ions Fe^{3+} (**réaction D**). L'activité des groupements $-OH$ du catéchol peut être modulée par une variété de substituant sur le noyau aromatique. Par exemple, la substitution sur le noyau phénolique d'un groupement donneur d'électron ($-CH_3$, $-CH_2-CH_3$, ou d'autre substituant aliphatiques) promouvrai des réactions dans lesquelles les noyaux phénoliques acquièrent une tendance de donner des électrons via un groupement $-OH$, et finalement augmentent leur capacité de réagir comme des réducteurs. D'autre part, la double liaison dans le substituant aliphatique conjuguée avec le noyau aromatique diminue la réactivité du groupement $-OH$ (DeGraft *et al.*, 2007).

2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :

Nous avons étudié l'activité antioxydante des extraits des deux parties de la plante *Echium pycnanthum*, par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, afin de localiser l'extrait qui présente le plus d'activité.

Par des dilutions en cascade des différents composés à tester, ainsi que des substances de référence, l'acide ascorbique et le BHT, nous obtenons une gamme de concentrations allant de 5 à 0,01 mg/ml. Pour chaque concentration, nous mesurons les densités optiques à 517nm.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire. À partir de ces courbes nous pouvons déterminer le % de DPPH restant et la valeur de l'IC50.

Les résultats expérimentaux sont représentés dans les figures 22-29. Ils montrent que les pourcentages d'inhibition sont importants à différentes concentrations, ce qui reflète la présence des composés qui peuvent réduire le radical DPPH.

2.1. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour les substances de référence:

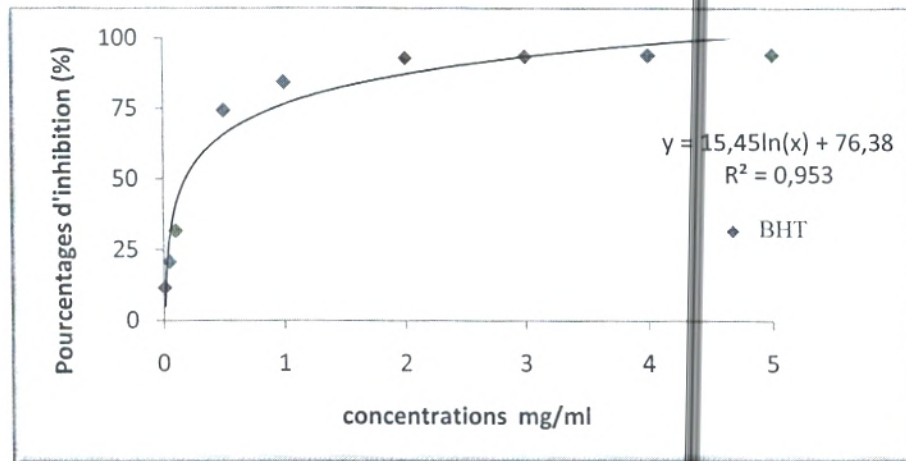


Figure 22 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour le BHT.

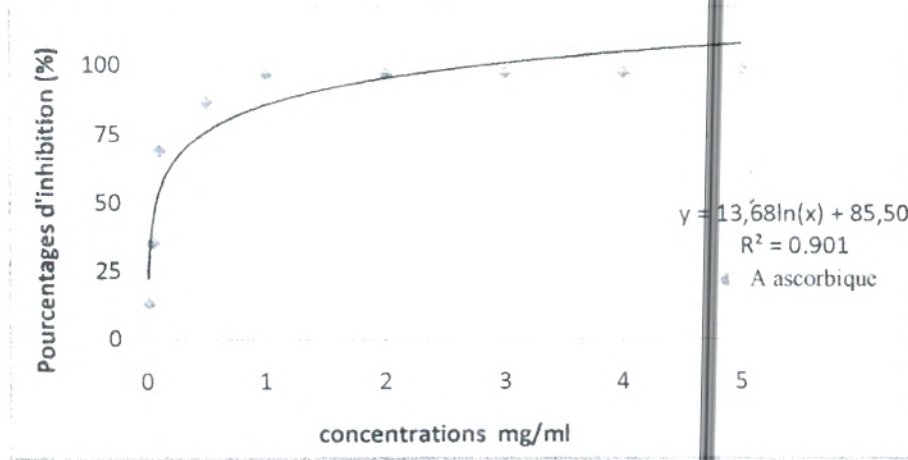
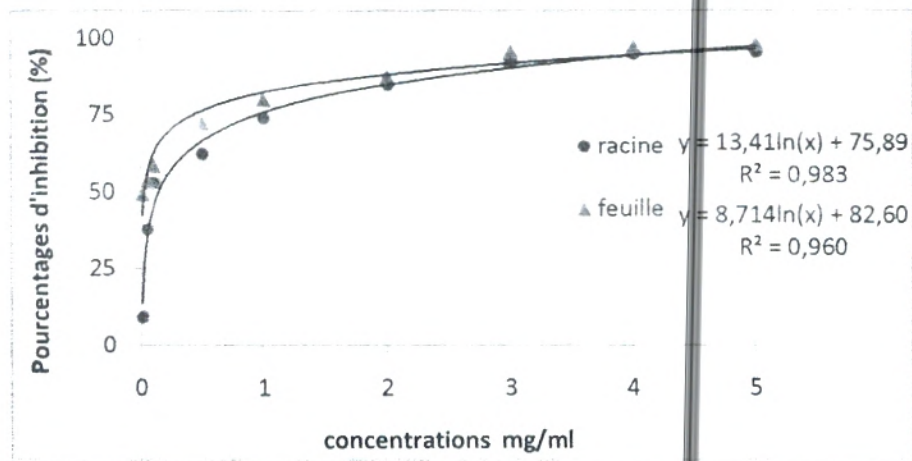


Figure 23 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.

2.2. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour les extraits testés :

2.2.1. Extraits bruts :



EBF : Extraits Bruts des Feuilles, EBR : Extraits Bruts des Racines

Figure 24 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits bruts de deux parties étudiées d'*Echinium pycnanthum*.

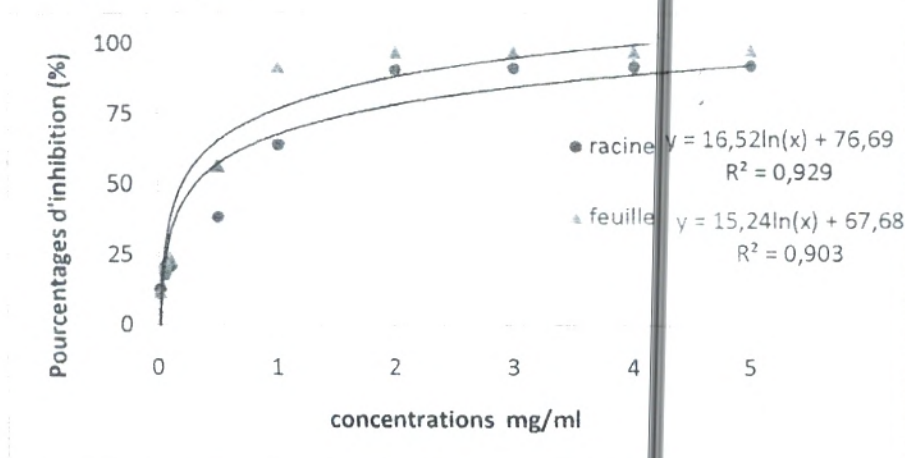
L'extrait brut des feuilles a montré un pouvoir de piégeage du DPPH un peu plus important par rapport à celui de l'extrait brut des racines. Ces deux extraits ont présenté à très faibles concentrations des pourcentages d'inhibition élevés.

Pour l'extrait brut des feuilles le pouvoir de piégeage du DPPH est important même à des concentrations inférieures à 0,5 mg/ml.

A une concentration de 3 mg/ml, les pourcentages d'inhibition sont de l'ordre de 95,83 % ± 1.25 et de 92,53 % ± 1.23 pour l'extrait brut des feuilles et des racines respectivement. La réduction du DPPH est presque totale à partir de cette concentration (la phase stationnaire) (fig. 24).

2.2.2. Flavonoïdes :

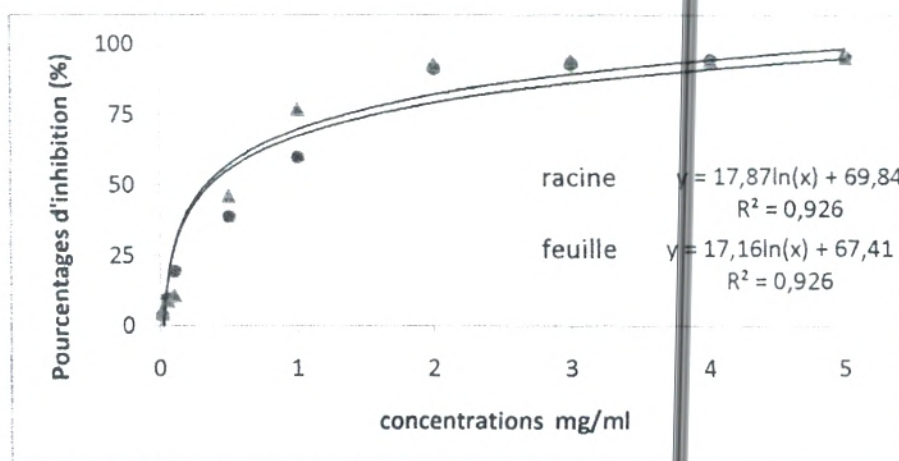
A. Fractions d'acétate d'éthyle :



FIF : Fractions d'acétate d'éthyle des Feuilles, FIR : Fractions d'acétate d'éthyle des Racines
Figure 25 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions d'acétate d'éthyle de deux parties étudiées d'Echium pycnanthum.

Pour la phase d'acétate d'éthyle, l'extrait des feuilles a révélé une activité de piégeage du DPPH plus élevée par rapport à celui des racines. Son pourcentage d'inhibition est de l'ordre de $91,56\% \pm 1,25$, à une concentration de 1 mg/ml. Celui des racines est de $90,62\% \pm 0,10$ à une concentration de 2 mg/ml (fig. 25).

B. Fractions butanoliques :



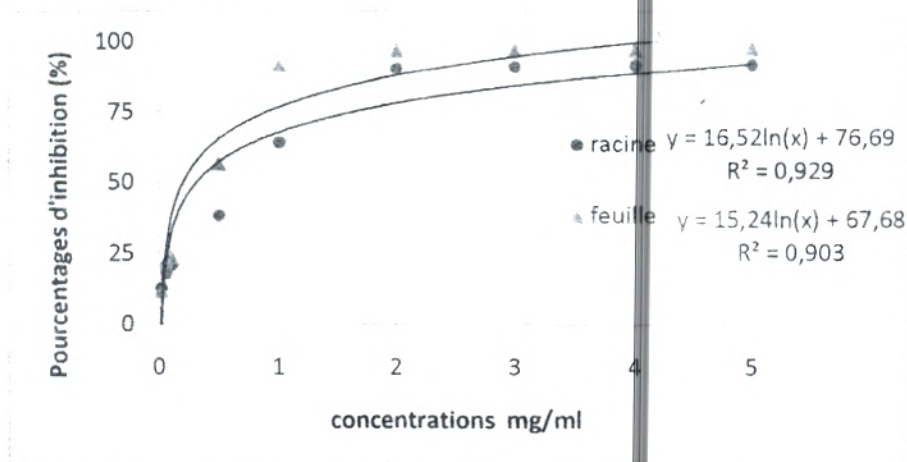
F2F : Fraction Butanoliques des Feuilles, F2R : Fraction Butanolique des Racines

Figure 26 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions butanoliques de deux parties étudiées d'Echium pycnanthum.

A des concentrations inférieures à 2 mg/ml, les pourcentages d'inhibition du DPPH sont un peu plus importants pour la fraction butanolique des feuilles par rapport à celle des racines. Au-delà de cette concentration, les pourcentages sont graphiquement presque en superposition.

2.2.2. Flavonoïdes :

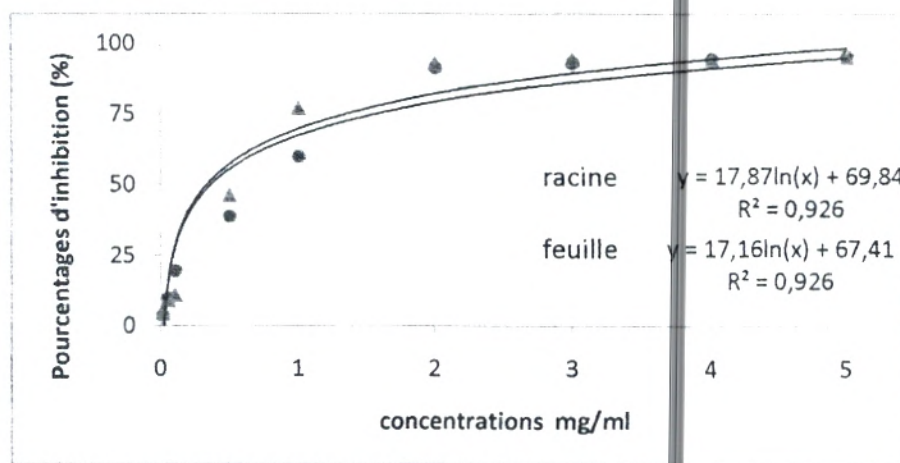
A. Fractions d'acétate d'éthyle :



F1F : Fractions d'acétate d'éthyle des Feuilles, F1R : Fractions d'acétate d'éthyle des Racines
Figure 25 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions d'acétate d'éthyle de deux parties étudiées d'Echium pycnanthum.

Pour la phase d'acétate d'éthyle, l'extrait des feuilles a révélé une activité de piégeage du DPPH plus élevée par rapport à celui des racines. Son pourcentage d'inhibition est de l'ordre de $91,56\% \pm 1,25$, à une concentration de 1 mg/ml. Celui des racines est de $90,62\% \pm 0,10$ à une concentration de 2 mg/ml (fig. 25).

B. Fractions butanoliques :



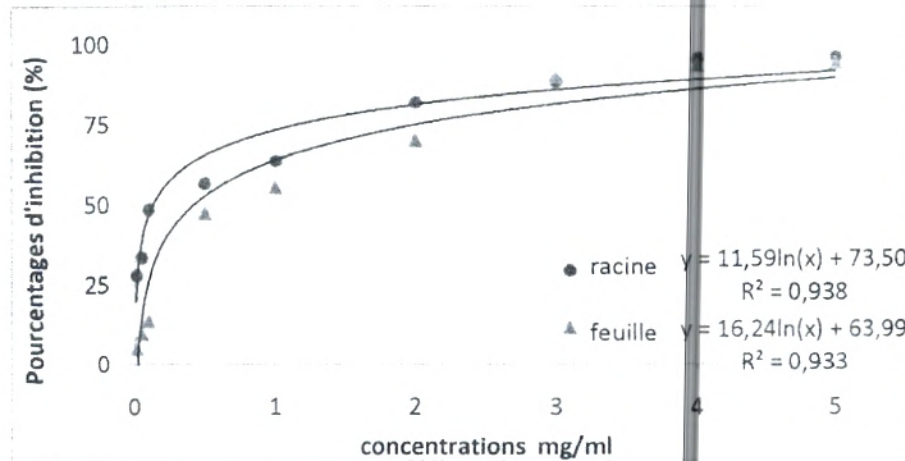
F2F : Fraction Butanoliques des Feuilles, F2R : Fraction Butanolique des Racines

Figure 26 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions butanoliques de deux parties étudiées d'Echium pycnanthum.

A des concentrations inférieures à 2 mg/ml, les pourcentages d'inhibition du DPPH sont un peu plus importants pour la fraction butanolique des feuilles par rapport à celle des racines. Au-delà de cette concentration, les pourcentages sont graphiquement presque en superposition.

A une concentration de 2 mg/ml, les pourcentages d'inhibition sont de l'ordre de $92,87 \% \pm 0,25$ et $91,54 \% \pm 0,5$ pour la fraction butanolique des feuilles et la fraction butanolique des racines respectivement. La réduction du DPPH est presque totale à partir de cette concentration (fig. 26).

2.2.3. Tanins :

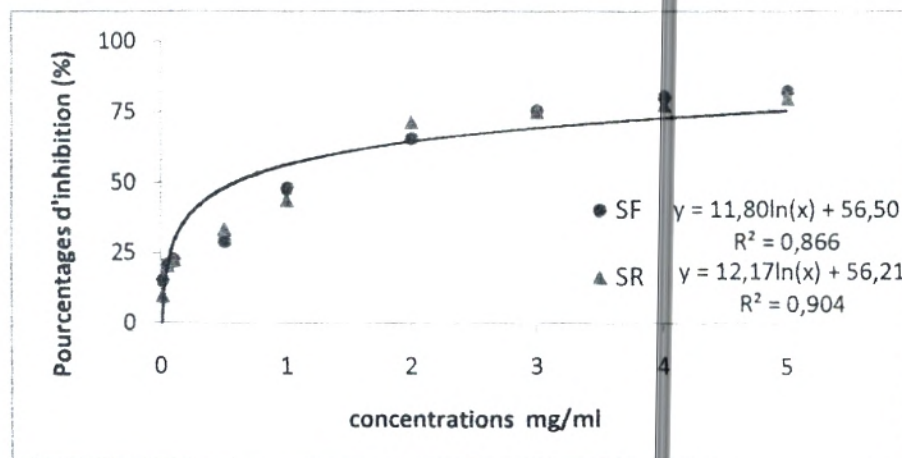


TF : Tanins des Feuilles, TR : Tanins des Racines

Figure 27 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les tanins de deux parties étudiées d'Echium pycnanthum.

Les tanins des racines ont montré un pouvoir de piégeage du DPPH plus élevé par rapport à celui des tanins des feuilles, à des concentrations inférieures à 3 mg/ml. A une concentration de 3 mg/ml, les pourcentages d'inhibition sont de l'ordre de $90,51 \% \pm 1,25$ et $88,92 \% \pm 1,2$ pour les tanins des feuilles et des racines respectivement. La réduction du DPPH est presque totale à partir de cette concentration (fig. 27).

2.2.4. Saponosides :

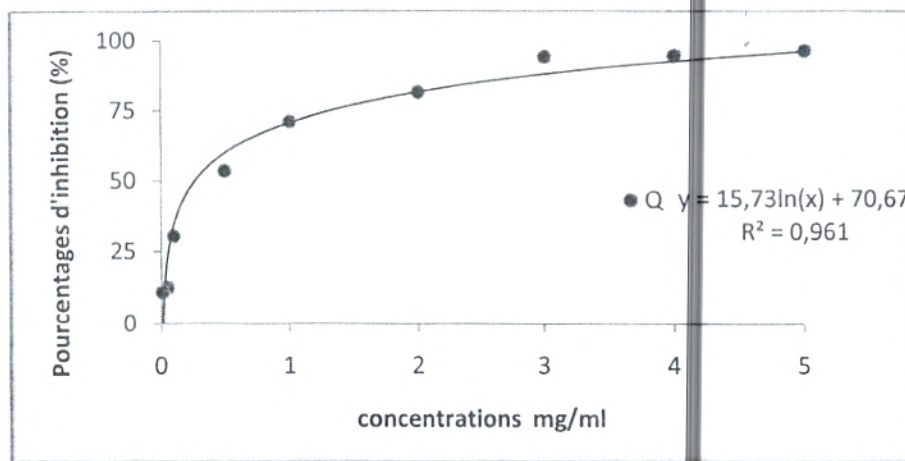


SF : Saponosides des Feuilles, ST : Saponosides des Racines

Figure 28 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les saponosides de deux parties étudiées d'Echium pycnanthum.

Les saponosides des feuilles et des racines ont montré un pouvoir de piégeage du DPPH presque similaire (fig. 28).

2.2.5. Quinones :



QR : Quinones des Racines

Figure 29 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait des quinones d'*Echium pycnanthum*.

Les quinones des racines ont révélé un pouvoir de piégeage du DPPH important. La réduction est presque totale du DPPH à partir de 3mg/ml avec un pourcentage d'inhibition de 94,11 mg/ml (fig. 29).

2.3. Calcul des IC50 :

La capacité anti-oxydante de nos différents extraits a été déterminée à partir des IC50. C'est la concentration en produit nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Plus la valeur de l'IC50 est petite, plus l'activité antioxydante de l'extrait testé est grande (Pokorny J., et al 2001).

Pour chaque extrait, y compris les références, l'IC50 peut être calculée en faisant une projection directe dans les courbes. L'utilisation de l'équation logarithmique de chacune donne des valeurs plus précises. Les valeurs des IC50, trouvées pour tous les extraits, sont représentées dans le tableau 11 et dans la figure 30 sous forme d'histogramme, dont les valeurs sont exprimées en concentrations finales $\mu\text{g/ml}$.

Tableau 11: Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits des deux parties de la plante étudiée.

<i>Echium pycnanthum</i>														<i>E. vulgare</i> (Filomena et al., 2009).
	AAS	BHT	EBR	EBF	F1R	F1F	F2R	F2F	TR	TF	SR	SF	QR	EB
IC50 mg/ml	0,07	0,16	0,14	0,02	0,331	0,19	0,36	0,32	0,13	0,42	0,61	0,57	0,26	
IC50 µg/ml [C finales]	1,79	4,10	3,59	0,56	8,27	4,75	9,03	8,10	3,33	10,62	15,38	14,25	6,66	34

De ces résultats, nous pouvons déduire que la réduction de 50% du DPPH a été atteinte pour tous les extraits testés.

L'IC50 de l'acide ascorbique (1,79 µg/ml) est proche de celle trouvée par **Conforti et al., (2008)**, qui est de l'ordre de 2 µg/ml.

Les extraits des feuilles ont des valeurs d'IC50 inférieures à celles des extraits des racines, c'est-à-dire une activité plus importante à l'exception des extraits des tanins où c'est l'inverse.

L'activité antioxydante de la phase acétate d'éthyle des flavonoïdes présente plus d'activité par rapport à la phase butanolique. Nos résultats confirment ceux publiés par **Tian et al. (2009)** et **Fabri et al. (2009)**.

Nos extraits ont un pouvoir antioxydant puissant par rapport à celui d'*Echium vulgare* qui a une IC50 de 34µg/ml (**Filomena et al., 2009**).

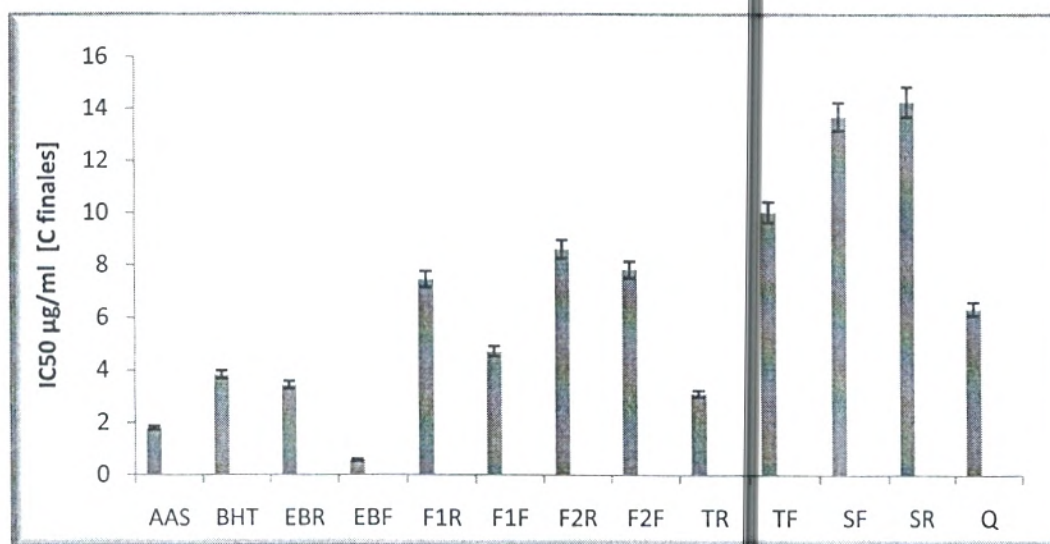


Figure 30 : Histogramme des valeurs des concentrations finales inhibitrices 50 des différents extraits en µg/ml.

AAS : Acide Ascorbique

EBF : Extraits Bruts des Feuilles

F1F : Fractions d'acétate d'éthyle des Feuilles

F1R : Fractions d'acétate d'éthyle des Racines

TF : Tanins des Feuilles

SF : Saponosides des Feuilles

QR : Quinones des Racines

BHT : Butylhydroxytoluène

EBR : Extraits Bruts des Racines

F2F : Fraction Butanoliques des Feuilles

F2R : Fraction Butanolique des Racines

TR : Tanins des Racines

SR : Saponosides des Racines

D'après cet histogramme, nous pouvons classer les extraits par ordre de réactivité décroissante : Extraits bruts des feuilles > **Acide Ascorbique** > Tanins des Racines > Extraits Bruts des Racines > **BHT** > Fractions d'acétate d'éthyle des Feuilles > Quinones des Racines > Fraction Butanoliques des Feuilles > Fractions d'acétate d'éthyle des Racines > Fraction Butanolique des Racines > Tanins des Feuilles > Saponosides des Feuilles > Saponosides des Racines.

Nous remarquons que l'extrait brut des feuilles, présente l'activité antioxydante la plus importante avec une IC50 de 0,564 µg/ml. Cette valeur est inférieure à celle de l'acide ascorbique (IC50 = 1,79 µg/ml). Ce résultat confirme que les extraits végétaux contenant plusieurs familles de métabolites secondaires présentent une forte activité antioxydante, suggérant qu'une majeure partie de cette activité soit due à la combinaison de plusieurs substances (**Liu, 2004**).

L'extrait brut et les tanins extraits à partir des racines, possèdent une activité antioxydante intéressante avec des valeurs d'IC50 (3,59 µg/ml et 3,33 µg/ml respectivement). Elles sont proche de celle du BHT (4.10 µg/ml) et supérieures à celle de l'acide ascorbique.

Les extraits des saponosides des feuilles et des racines ont une faible activité avec des valeurs d'IC50 élevées. La faible activité des extraits des saponosides confirme que se sont les composés phénoliques qui possèdent le grand pouvoir antioxydant. (**Fabri et al. 2009**).

Les autres extraits possèdent une activité remarquable avec des IC50 comprises entre 4,75 et 10,62 µg/ml.

Des travaux antérieurs confirment le rôle majeur du groupement phénolique dans l'activité antioxydante, ce qui est en accord avec nos résultats.

De même, ils montrent que la capacité de ces groupements à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leur structure. Il existe quelques composés qui réagissent rapidement avec le radical DPPH, cela peut être expliqué par la présence des groupements hydroxyles dans la structure de ces molécules, en particulier les substitutions 3-OH dans le cas des flavonoïdes, qui peuvent donner un hydrogène réduiront le DPPH qui est un radical accepteur d'hydrogène. La réaction peut se résumer de la façon suivante (fig.31) (**Dangles et al., 1999**):

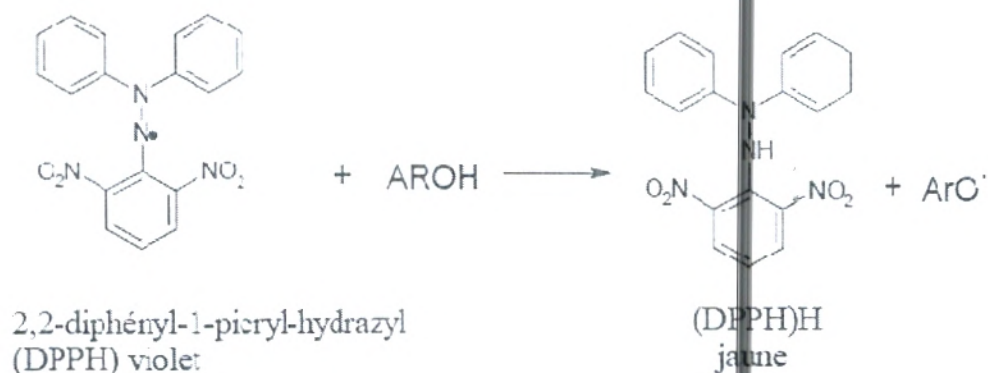


Figure 31 : Réaction d'un donneur d'hydrogène avec le radical DPPH.

Le même auteur suggère que la présence de la double liaison C=C est responsable de la délocalisation des électrons, (Sharififar *et al.*, 2009), les groupements ortho-diphénoliques favorisent ainsi le pouvoir antioxydant.

3. Conclusion :

A la lumière de ces résultats nous pouvons conclure que :

- La capacité anti-oxydante de la plupart des extraits est comparable à celle de l'acide ascorbique et le BHT, des antioxydants puissants. Par ailleurs, les saponosides ont un faible pouvoir antioxydant.
- Nos extraits contenant les composés phénoliques possèdent un pouvoir antioxydant important, c.-à-d. un pouvoir remarquable pour donner des électrons aux radicaux libres réactifs et pour les convertir en espèces non-réactives plus stables. Ce résultat confirme que les fonctions hydroxyles, les doubles liaisons sont primordiales pour l'activité.
- Même si la comparaison entre les deux méthodes de l'activité antioxydante *in vitro* (réduction de fer et DPPH) est difficile (Magalhaes *et al.*, 2008), nos résultats montrent qu'il y a une certaine conformité au classement entre les résultats obtenus par l'analyse FRAP et ceux trouvés par la méthode au DPPH. Tian *et al.*, (2009), El-Haci *et al.*, (2009), ont pu trouver une corrélation entre les résultats obtenus par ces deux analyses.

V. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE:

1. Introduction :

Notre étude consiste à la recherche de l'activité antibactérienne des extraits de la plante *Echium pycnanthum* vis-à-vis de quatre souches bactériennes, choisies en fonction de leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leurs pathogénicités (tab. 09).

2. Les extraits de la plante :

Les extraits d'*Echium pycnanthum* dissouts dans le DMSO et les concentrations qui leur sont appropriées sont représentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Les extraits testés et leurs concentrations en mg/ml.

		Feuilles	Racines
Extrait brut		15,02	15,33
Extraits des flavonoïdes	phase acétate d'éthyle	1,26	11,65
	phase butanolique	1,05	15
Extraits des Saponosides		4,03	9,4
Extraits des Tanins		3,96	7,11

3. Étude du pouvoir antibactérien d'*Echium pycnanthum* Pomel :

L'étude de l'activité antibactérienne de la plante *Echium pycnanthum* Pomel a été réalisée par deux techniques :

- La technique de diffusion des disques sur milieu solide, qui est une technique qualitative basée sur la mesure des diamètres d'inhibitions en mm. Cette mesure est transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (tab.13) (Ponce *et al.*, 2003 ; Duraffourd *et al.*, 1990 ; Biyiti *et al.*, 2004).

Tableau 13 : Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D).

Inhibition	Transcription	Sensibilité
D < 8mm	-	Résistante
9mm ≥ D ≤ 14	+	Sensible
15mm ≥ D ≤ 19mm	++	Assez sensible
D > 20mm	+++	Très sensible

Diamètre de disque inclus.

- La technique des dilutions sur milieu liquide, qui est une méthode quantitative basée sur la recherche de la plus basse concentration qui inhibe la croissance bactérienne appelée couramment : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Dans un premier temps, nos tests ont été réalisés vis-à-vis de toutes les souches. Les extraits qui semblent être actifs, résultat révélé par l'apparition de zones d'inhibitions importantes, ont fait l'objet d'une étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

3.1. Méthode des disques :

Les diamètres d'inhibition sont consignés dans le tableau 14.

Tableau 14: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des différents extraits.

Souches	extraits	Racines			Feuilles		
		Diamètre (mm)	Transcription	Sensibilité	Diamètre (mm)	Transcription	Sensibilité
S. aureus	EB	10	+	S	10	+	S
	F1	/	/	R	10	+	S
	F2	/	/	R	/	/	R
	S	/	/	R	10	+	S
	T	/	/	R	09	+	S
E. faecalis	EB	/	/	R	/	/	R
	F1	/	/	R	/	/	R
	F2	/	/	R	/	/	R
	S	8	-	R	8	-	R
	T	/	/	R	/	/	R
E. coli	EB	10	+	S	11	+	S
	F1	/	/	R	09	+	S
	F2	/	/	R	/	/	R
	S	/	/	R	09	+	S
	T	/	/	R	09	+	S
P. aeruginosa	EB	19	++	A S	35	+++	T S
	F1	15	++	A S	20	+++	T S
	F2	10	+	A S	11	+	S
	S	18	++	A S	24	+++	T S
	T	16	++	A S	17	++	A S

Diamètre de disque inclus.

R : Résistante. S : Sensible. A S : Assez Sensible. T S : Très Sensible. / - Pas d'effet

EB : extraits bruts F1 : flavonoïdes, fraction d'acétate d'éthyle F2 : flavonoïdes, fraction butanolique,
S : saponosides T : tanins.

3.2. Nature de l'activité antibactérienne:

Pour la souche de *P. aeruginosa* qui montre des zones d'inhibition importantes, un prélèvement sur la surface de la gélose nutritive a été effectué. Cette souche a été incubée une deuxième fois et les résultats sont représentés dans le tableau 15.

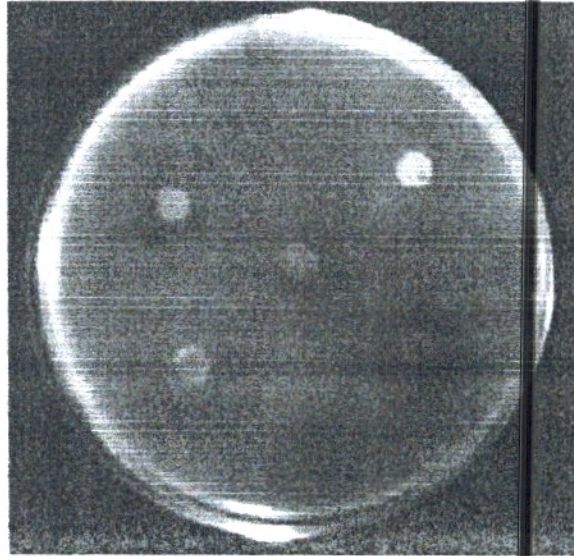


Photo 03 : Méthodes des disques des extraits de feuilles testés sur la souche *P.aeruginosa*.



Photo 04 : Nature de l'activité antibactérienne des extraits des feuilles vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 15: Nature de l'activité antibactérienne des extraits des racines et des feuilles d'*Echium pycnanthum* vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

Diamètres en mm			
Extraits	Racines	Feuilles	Nature de l'activité
EB	10	9	Bactériostatique
F1	8	10	
F2	8	9	
S	10	9	
T	9	8	

Le diamètre du disque de la gélose inclus (6mm).

EB : extraits bruts F1 : flavonoïdes, fraction d'acétate d'éthyle F2 : flavonoïdes, fraction butanolique, S : saponosides T : tanins.

3.3. Discussion:

Les résultats représentés dans le tableau 15 montrent que chacun des extraits a une activité assez bien définie sur la croissance d'au moins une des bactéries testées. Les diamètres d'inhibitions varient entre 8 à 35 mm. Un extrait est considéré comme actif lorsqu'il révèle une zone d'inhibition supérieure ou égale à 9 mm (Biyiti *et al.*, 2004).

La souche *E. faecalis* s'est révélée résistante à tous les extraits testés.

Les extraits bruts de la plante exercent une activité inhibitrice sur toutes les souches bactériennes testées (à l'exception d'*E. faecalis*) avec des diamètres d'inhibitions qui varient de 10 mm vis-à-vis de *S.aureus* à 35 mm vis-à-vis de *P.aeruginosa*.

Au terme de l'analyse phytochimique des extraits bruts, plusieurs groupes de composés chimiques tels que les polyphénols, ont été détectés. L'activité de ces extraits est probablement due à la synergie de ces groupes de substances dont leur activité antimicrobienne a été déjà signalée par plusieurs auteurs (Bruneton, 1999; Cowan, 1999).

Les extraits des feuilles ont montré une activité antibactérienne plus élevée par rapport à ceux des racines contre la souche de *P.aeruginosa*, avec des diamètres d'inhibition compris entre 11-35mm et 10-19mm respectivement (Photo 03).

Pour les trois autres souches les extraits des feuilles ont exercé une faible activité avec des diamètres compris entre 08 et 10mm alors que les extraits des racines sont quasiment inactifs.

La présence d'une croissance bactérienne (Photo 04), montrent que les extraits des racines et des feuilles d'*Echium pycnanthum* ont une activité bactériostatique vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosa* (tab. 15).

4.4. CMI sur milieu liquide :

L'étude de la CMI des extraits, vis-à-vis de la souche de *P.aeruginosa*, a été réalisée par la méthode des dilutions sur milieu liquide dans une microplaque stérile. Les résultats obtenus dans la photo 05 et le tableau 16.

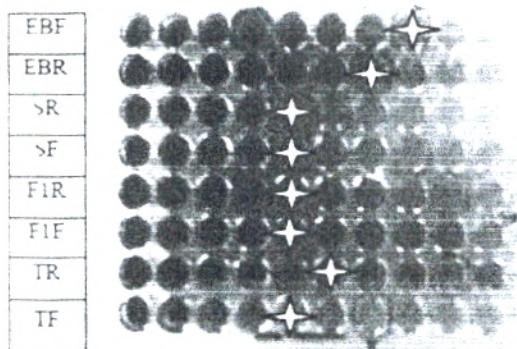


Photo 05: Résultats des CMI sur microplaque des extraits végétaux vis-à-vis de la souche *P.aeruginosa*.

Tableau 16 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de la plante relative à la souche *P.aeruginosa*.

	Extraits	Concentration des extraits. mg/ml	CMI (µg/ml)
Feuilles	EB	15,02	120
	F1	1,26	220
	S	4,03	250
	T	3,96	240
Racines	EB	15,33	240
	F1	11,65	720
	S	9,4	580
	T	7,11	220
Normes	NCCLS		256

EB : extraits bruts F1 : flavonoïdes, fraction d'acétate d'éthyle F2 : flavonoïdes, fraction butanolique, S : saponosides T : tanins.

Les concentrations minimales inhibitrices des extraits sont proches aux normes du National Comity for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) : 256 µg/ml (Ferron A,1979 ; John A,1991) à l'exception des extraits de flavonoïdes d'acétate d'éthyle et de saponosides

des racines dont les CMI sont largement supérieures aux normes avec des valeurs de 720 et 580 µg /ml respectivement.

L'extrait brut des feuilles a une CMI de 120 µg /ml. Il s'est montré le plus actif par rapport aux autres extraits.

Une étude faite par *Ayşe et al (2004)*, montre que l'activité antimicrobienne des extraits bruts d'*Echium vulgare* contre des microorganismes testés (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*) n'étaient pas significatives (CMI> 1mg/ml). Ce résultat est en contradiction avec le nôtre.

4. Conclusion :

De ces résultats, nous pouvons conclure que :

- La souche d'*E. faecalis* s'est montrée la souche la plus résistante à tous les extraits de notre plante testés.
- La souche de *P. aeruginosa* s'est révélée sensible à tous les extraits testés. Elle apparaît donc comme une exception comparativement parlant à la plupart des souches de cette espèce qui possèdent, selon plusieurs travaux antérieurs, une résistance à une large gamme de biocides (*Mann et al, 2000*).
- Les extraits bruts des racines et des feuilles, les flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle), les saponosides et les tanins des feuilles ont une activité moyenne vis-à-vis de *S. aureus* et *E. coli*.

VI. ÉTUDE CHIMIQUE DES QUINONES :

1. Introduction :

La Shikonine, son énantiomère alkanine et leurs esters dérivés sont les métabolites secondaires les plus communément trouvés dans les racines de plusieurs Borraginacées (Fig. 32) (Han *et al.*, 2008). Ces naphtoquinones sont caractérisées par une couleur rouge et sont utilisées comme colorants alimentaires, en cosmétique et en pharmacologie (Papageorgiou *et al.*, 1999).

Les Naphtoquinones présentes dans les racines d'*Echium italicum* L. sont séparées et identifiées par plusieurs méthodes analytiques (CCM, HPLC, RMN). Ses composés sont des dérivés de shikonine et non pas d'alkanine communément associés aux espèces Européennes de Borraginacées. Neuf dérivés de shikonine sont identifiés : shikonine (S), acetylshikonine (AS), propionylshikonine (PS), isobutyrylshikonine (IBS), tiglylshikonine (TS), 3,3-dimethylacrylshikonine (DAS), angelylshikonine (ANS), 2-méthyl-nbutyrylshikonine (MBS) et isovalerylshikonine (IVS). MBS/IVS et TS/DAS/ANS sont des isomères positionnels et TS/ANS sont des isomères géométriques (Fig. 35) (Albrecht *et al.*, 2009).

Afin de connaître la nature des quinones responsables de la couleur rouge des racines d'*Echium pycnanthum*, nous avons fait une analyse chimique à partir d'une technique analytique, la RMN (^{13}C et ^1H) selon une méthode mise au point et développée par le laboratoire de *Chimie et Biomasse* de l'Université de Corse.

2. Caractérisation des quinones :

Une chromatographie sur couche mince a été choisie, pour caractériser les quinones extraites. Le solvant utilisé est un mélange hexane-acétate d'éthyle (80/20). Le dépôt était sous forme d'une bande, déposée sur toute la largeur de la plaque. L'apparition de plusieurs bandes de Rf et de couleurs différentes, a été observée. Nous avons gratté la bande rouge ayant un Rf de 0,75 et nous l'avons dissout dans le méthanol. L'extrait est filtré afin de se débarrasser du gel de silice. Nous avons établi une deuxième chromatographie de l'extrait obtenu, de la même manière que la première, pour le purifier. L'obtention d'une seule bande de même Rf a confirmé la pureté de notre échantillon.

3. Étude chimique Par la RMN- ^{13}C et ^1H :

Les spectres RMN (^{13}C , ^1H) de composé pur ont été enregistrés sur un instrument de type Bruker dans le Chloroforme deutéré et les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au TMS (Tétra- méthyle silicium) pris comme référence interne.

L'identification des composés est basée sur la comparaison des déplacements chimiques RMN- ^{13}C et ^1H de notre échantillon avec ceux des naphtoquinones présentes dans les racines d'*Echium italicum* composés cités dans la littérature (Albrecht *et al.*, 2009).

4. Résultats et discussion :

Les spectres du ^{13}C et ^1H sont représentés dans le tableau 17 et les figure 33 et 34. Ils sont comparés avec les déplacements chimiques des énantiomères shikonine et alkanine (Cheng *et al.*, 1995) (tab. 18) et avec les résultats publiés par Albrecht *et al.*, en 2009 (tab.19) sur les quinones extraites à partir d'une espèce du même genre (*Echium italicum* L.).

Tableau 17 : Spectres du ^{13}C et ^1H pour l'échantillon des quinones extraites à partir d'*Echium pycnanthum*.

Nombre d'atomes	Les déplacements chimiques (δ) en ppm	
	^1H	^{13}C
1	-	
2	6.96 d	131.5
3	-	
4	-	
5	12.60 s	
6	7.19 s	132.6
7	7.19 s	132.7
8	12.43 s	
9	-	
10	-	
11	6.08 ddd	69.2
12	2.51m, 2.66 m	32.9
13	5.15 m	117.9
14	-	
15	1.58d	25.8
16	1.69 d	17.9
1'	-	
2'	-	139.9
3'	6.17 qq	
4'	2.01 dq	15.8
5'	1.96 m	20.5

s : singulier d : doublet q : quadruplet m : multiple

Pour les spectres du proton, il n'y a que les déplacements chimiques comparables avec les valeurs du tableau 18.

Tableau 18 : Spectres du ^{13}C et du ^1H des deux énantiomères shikonine et alkanine.

N° du carbone	shikonine / alkanine	
	RMN- ^1H	RMN- ^{13}C
1		179,66
2		151,47
3	H-3 7.16d	131,91
4		180,44
5	OH-5 12.48 s	165,73
6	H-6 7.19 s	132,35
7	H-7 7.19s	132,35
8	OH-8 12.58 s	165,09
9		112,09
10		111,60
11	H-11 4.91 ddd	68,43
12	H-12 2.35 br td 2.65 ddd	35,73
13	H-13 5.20 qut	118,54
14		137,27
15	H-15 1.65 br s	18,07
16	H-16 1.76 br s	25,91

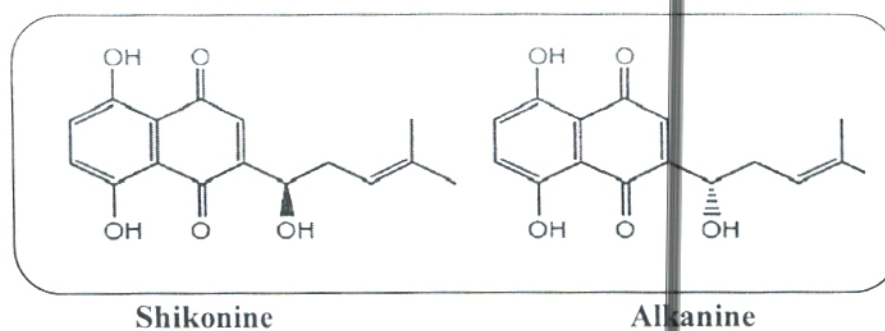


Figure 32 : Structure de Shikonine et d'Alkanine.

Tableau 19 : Spectres du ^{13}C et du ^1H pour cinq dérivés de shikonine.

N° du carbone	Déplacements chimiques δ (ppm) ^a									
	AS		IBS		ANS		MBS		IVS	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	-	176.6	-	176.8	-	177.0	-	176.7	-	176.7g
2	6.99	131.4	6.98 d	131.3	6.96 d	131.5	6.98 d	131.3	6.99d	131.4
3	-	148.1	-	148.5	-	148.7	-	148.6	-	148.5
4	-	178.1	-	178.3	-	178.5	-	178.2	-	178.2g
5	12.58 s	166.9	12.59 s	166.8	12.60 s	166.7	12.59 s	166.9	12.59 S ^b	166.9f
6	7.18 s	132.6	7.19 s	132.7	7.19 s	132.6	7.19 s	132.7	7.18s	132.7 ^e
7	7.18 s	132.8	7.19 s	132.8	7.19 s	132.7	7.19 s	132.8	7.18s	132.8 ^e
8	12.42 s	167.4	12.43 s	167.4	12.43 s	167.2	12.42 s	164.4	12.42 S ^b	167.4f
9	-	111.5	-	111.6	-	111.6	-	111.6	-	111.6d
10	-	111.7	-	111.8	-	111.8	-	111.8	-	111.8d
11	6.03 ddd	69.4	6.02 ddd	69.0	6.08 ddd	69.2	6.04 ddd	69.0	6.04ddd	69.2
12	2.47 m 2.62	32.8	2.47 m, 2.69m	32.9	2.52 m, 2.66m	32.9	2.47m, 2.62m,	33.0	2.47m, 2.61m,	33.0
13	m	117.6	5.12 m	117.6	5.15 m	117.9	5.13 m	117.8	5.12m	117.8
14	5.12 m	136.0	-	136.0	-	135.9	-	135.9	-	136.0
15	-	25.7	1.58 d	25.7	1.58 d	25.8	1.59 d	25.7	1.58 d ^e	25.7
16	1.58 d	17.9	1.3.69 d	17.9	1.69 d	17.9	1.69 d	17.9	1.68 d ^e	17.9
1'	1.69 d	169.7	-	175.8	-	166.5	-	175.4	-	171.8
2'	-	20.9	2.64 m	34.0	-	139.9	2.47 m	41.2	2.27m, 2.28m,	43.4
3'	2.14 s	-	1.21 d	18.8	6.17 qq	127.1	1.50 m	26.6	2.13m	25.8
4'	-	-	1.20 d	19	2.01 dq	15.8	0.92 t	11.6	0.98d	22.3 ^f
5'	-	-	-	-	1.96 m	20.5	1.20 d	18.4	0.98d	22.4 ^f

^a Par rapport au TMS

Figure 33: Le spectre du RMN ^{13}C des quinones.

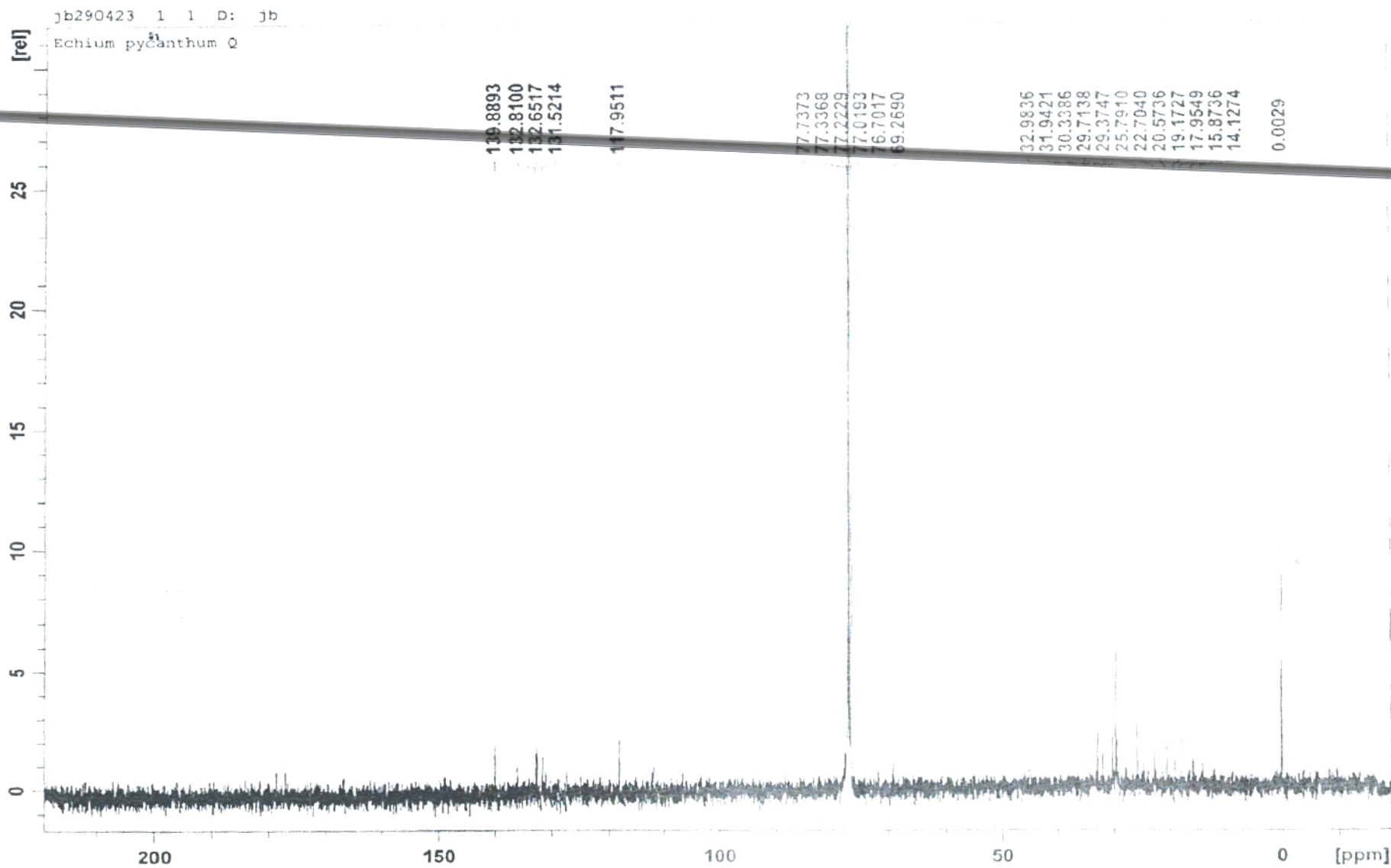
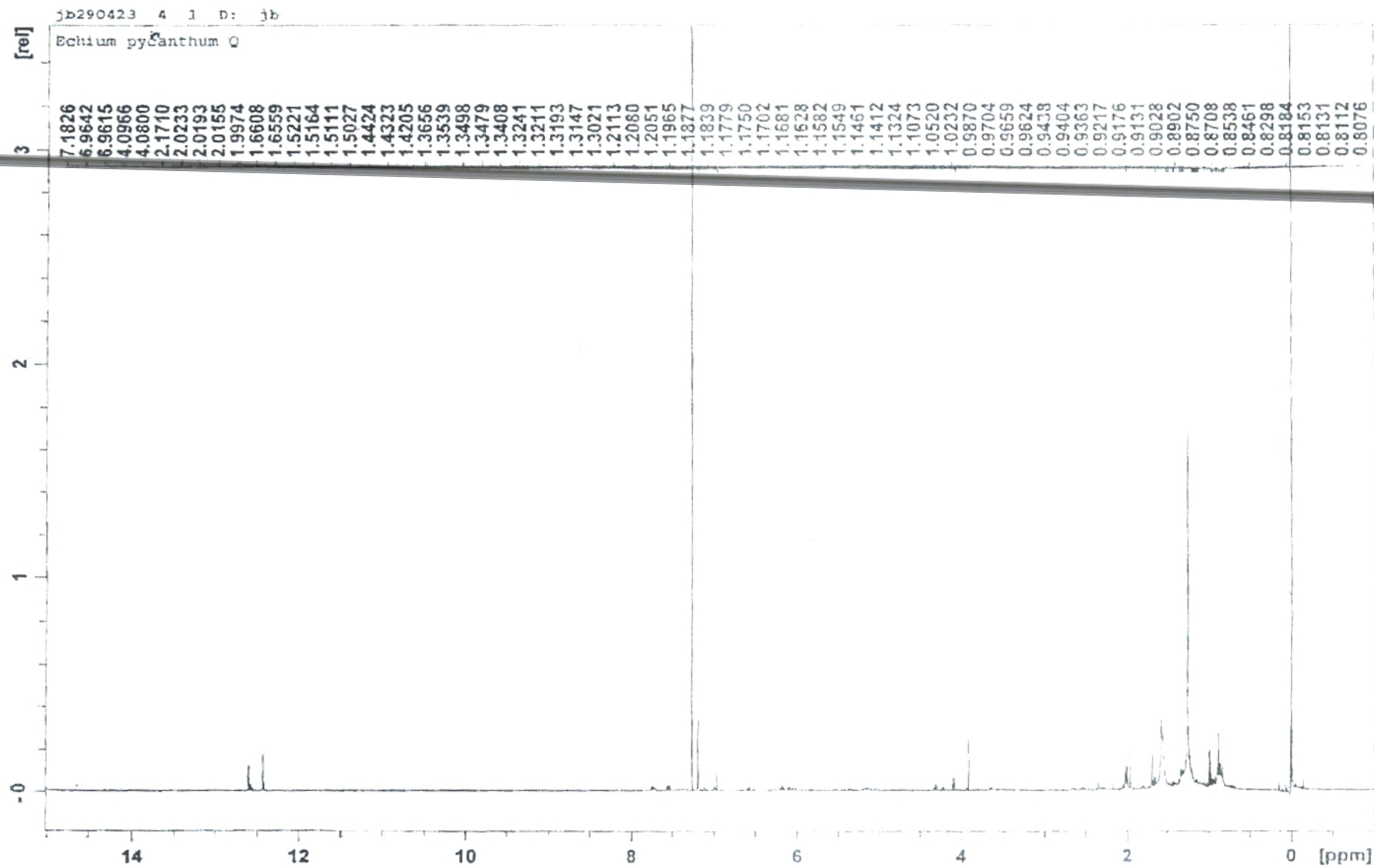


Figure 34: Le spectre du RMN 1H des quinones.



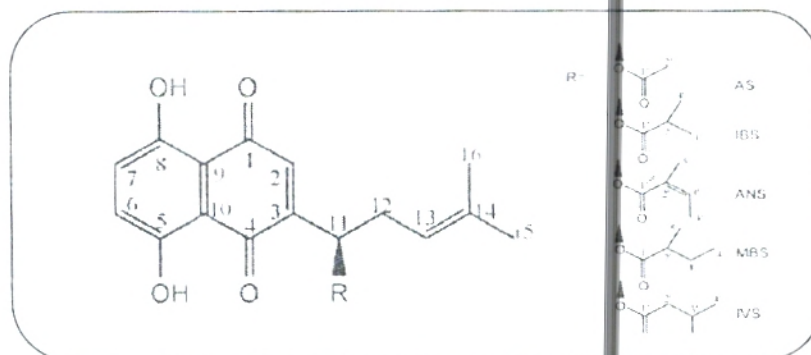


Figure 35 : Cinq dérivés de shikonine extraits à partir d'*Echium italicum*.

Les déplacements chimiques du RMN ^1H et ^{13}C de notre échantillon correspondent avec les valeurs d'angelylshikonine (ANS) représentées dans le tableau 19 et la figure 36 (Albrecht *et al.*, 2009). Les déplacements chimiques pour les atomes de carbones n° 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 14 et 1' n'apparaissent pas dans le spectre de notre échantillon par ce qu'il s'agit des carbones quaternaires dont l'intensité est faible par rapport aux autres carbones (de l'ordre de 1/3).

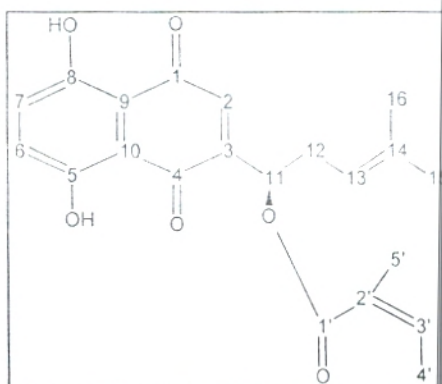


Figure 36 : La molécule d'Angelylshikonine extraite à partir de notre échantillon.

5. Conclusion :

Comme c'est le cas pour *Echium italicum*, les quinones présentes dans les racines d'*Echium pycnanthum* sont des dérivés de shikonine. Il s'agit d'Angelylshikonine, responsable de la couleur rouge des racines de cette plante.

Conclusion Générale

Ce travail s'intéresse à caractériser une espèce végétale par des tests phytochimiques et à étudier les activités antioxydantes et antibactériennes de ses extraits. Il s'agit d'*Echium pycnanthum* de la famille des Borraginacées, qui pousse à l'état sauvage dans la région de Tlemcen (Sebdou). Cette plante est utilisée dans la pharmacopée traditionnelle de la région, pour le traitement de plusieurs pathologies, en particulier l'hépatite.

Pour mieux connaître cette espèce, des extraits de métabolites secondaires, des feuilles et des racines, ont été évalués par des méthodes chimiques et biologiques.

Les tests phytochimiques menés sur cette plante ont montré une richesse remarquable en métabolites secondaires. L'épuisement des feuilles et des racines par des solvants de polarités différentes et par des révélateurs différents a révélé :

- La présence des tanins, des flavonoïdes et des saponosides dans les deux parties de la plante, feuilles et racines.
- La présence des quinones dans les racines.
- La présence des alcaloïdes dans les feuilles.
- L'absence totale des coumarines, des anthracynosides dans la plante étudiée.

Les deux parties de la plante ont présenté des rendements variables en extraits secs des métabolites secondaires. Les plus élevés sont ceux des extraits bruts, surtout des feuilles 21.3%. Ainsi la teneur en composés phénoliques des feuilles (262,98 mg GAE/g de matière végétale sèche) est plus élevée par rapport à celle des racines (100,08 mg GAE/g).

L'étude de l'activité antioxydante des extraits varie d'un extrait à un autre. L'extrait brut des feuilles s'est révélé le plus actif contre le radical DPPH (IC₅₀ : 0,564 µg/ml). Il est beaucoup plus puissant qu'aux antioxydants utilisés dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, l'Acide ascorbique (IC₅₀: 1,79 µg/ml) et le BHT (IC₅₀ : 4,1 µg/ml). Ce même extrait a présenté une activité similaire à celle de l'acide ascorbique selon la méthode de FRAP. La synergie des métabolites secondaires peut être à l'origine de cette grande activité.

Cependant, Les extraits contenant les composés phénoliques ont un pouvoir anti-oxydant important contrairement aux saponosides qui ont révélés une faible activité.

Il y a une certaine conformité dans le classement de pouvoir antioxydant entre les résultats obtenus par l'analyse FRAP et ceux trouvés par la méthode au DPPH.

1. Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases, *Revue du Rhumatisme*, 74: 636–643.
2. Ahmad M., Yousuf S., Khan M.B., Hoda M.N., Ahmad A.S., Ansari M.A., Ishrat T., Agrawal A.K., Islam F. (2006). Attenuation by *Nardostachys jatamansi* of 6 hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical, and immunohistochemical studies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Elsevier, 83: 150-160.
3. Albrecht A., Vovk I., Simonovska B. et Srbinoska M. (2009). Identification of Shikonin and its ester derivatives from the roots of *Echium italicum* L. *Journal of Chromatography A*, Elsevier, 1216: 3156-3162.
4. Amrit Pal Singh. (2002). A Treatise On Phytochemistry. B.Sc, B.A.M.S, M.D. (Alternative Medicine). Edition. Emedia Science Ltd. ISBN-10: 0954430204. ISBN-13: 978-0954430207.
5. Anderson O.M., Markham K.R. (2006). FLAVONOIDS: Chemistry, Biochemistry and Applications, Edition. Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press, 01(32):397-425.
6. Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z. (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 2: 15850-15855.
7. Ayşe Kuruüzüm-Uz, Zuhâl Güvenalp, Karsten Ströck, L. Ömür Demirezer, Axel Zeek. (2004). Phytochemical and antimicrobial investigation of *Echium vulgare* growing in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 833–836.
8. Azzi R., Djaziri R., Lahfa F. (2009). Recherche des effets anti hyperglycémiant des glycosides cucurbitacines extraits des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sur des rats wistar normaux et rendus diabétiques par la streptozotocine. *Revue des Substances Naturelles et Innovation Thérapeutiques*, 1: 50-52. ISSN: 2170-0079.
9. Bekkara F., Jay M., Viricel M.R. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seedtannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, *Journal Plant and Soil*, 203: 27-36.
10. Benhammou N., Atik Bekkara F., Kadifkova Panovska T. (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf, *Advances in Food Sciences*, 29 (3): 155-161.
11. Benzie I. F. F., Strain J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
12. Béraud J. (2004). Le technicien d'analyses biologiques, guide théorique et pratique. Edition Tec et Doc.
13. Biyiti L.F, Meko'o DJ.L, Tamzic v, Amvam Zollo P.H. (2004). Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Traditional pharmacology and medicine in Africa*, 13: 11-20.
14. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
15. Bohr, V. A. (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 32: 804-812.
16. Boizot N., Charpentier J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, Le Cahier des Techniques de l'Inra, 79-82.
17. Botsoglou N. A., Fletouris D. J., Papageorgiou G. E., Vassilopoulos G. E., Mantis A. J., Trakatellis A. G. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissues, food and feedstuff samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42: 1931-1937.
18. Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Ijic R. (2008). Phenolics as

- antioxydants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111: 925–929.
19. **Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30.
 20. **Brigham LA, Michaels PJ, Flores HE. (1999).** Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Journal of Plant Physiology*, 119: 417-428.
 21. **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 3^{ème} Edition. *Tec& Doc Lavoisier*. Paris, p. 1120.
 22. **CaSfm, (2008).** Comité de l'antibiogramme, société Française de Microbiologie.
 23. **Chabbert Y.A., Daguët G. L., 1985.** Techniques en bactériologie: antibiotiques en bactériologie médicale. *Editeur: Flammarion, Médecine & Sciences, Sérologie bactérienne*. 244 p.
 24. **Cheng Hui-Wen., Chen Fu-An., Hsu Hsing-Chu., Chen Chau-Yang. (1995).** Photochemical de composition of alkannin/shikonin enantiomers. *International Journal of Pharmaceutics*. 120: 137-144
 25. **Cohen M. (2002).** Stress oxydant, glycation protéique, vieillissement et maladies liées à l'âge. *La Phytothérapie Européenne*, 6 : 18-26.
 26. **Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti G.A., Uzunov D., Tubaro A., Menichini F., Loggia R.D. (2008).** *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 144–151.
 27. **Contin A., van der Heijden R., Lefeber A.W.M., Verpoorte R. (1998).** The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate /pyruvate pathway in *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Letters*, 434 :413-41.
 28. **Cowan M M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology review*, 12(4): 564-582.
 29. **Dangles O., Fargeix G., Dufour C. (1999).** One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions*, 2: 1387-1395.
 30. **Debray M, Jacquemin H, Razafindrambo R. (1971).** Travaux et documents de l'Orstom.(Paris, N°8).
 31. **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: 345-352.
 32. **Di Paola-Naranjo R. D., Sánchez-Sánchez J., González-Paramás A. M., Rivas-Gonzalo J C. (2004).** Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum*. *Journal of Chromatography A*, 1054: 205–210.
 33. **Diouf P.N. (2003).** Étude comparative de méthodes de mesure de l'activité antioxydante. Applications aux extractibles de bois. Liens avec la stabilité de la couleur du bois. Thèse doctorat. Université Henri Poincaré. Nancy France.
 34. **Dohou N., Yamni K., Tahrouch S. Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique Ibéro- Marocaine, *Thymeleae lythroïdes*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 142 : 61-78.
 35. **Dorman H. J. D., Deans S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (2): 308-316.
 36. **Droge W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Reviews of Physiology*, 82: 47-95.
 37. **Duraffourd C., D'Hervicourt L., Lapraz J.C. (1990).** Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique *Eléments Thérapeutiques Synergiques*. 2^{ème} Edition *Masson*. Paris, p87
 38. **Edeoga H.O., Okwu D.E. et Mbaebie B.O. (2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4 (7):685- 688.

39. **El-Haci I.A., Didi A., Atik Bekkara F., Gherib M. (2009).** In vitro antioxidant and total phenolic contents in methanol crude extracts from the algerian medicinal plant *Limoniastrum feei*, *Scientific study and research*, 4:329-336.
40. **El-shazly A., Sarg T., Ateya A., Abdel aziz E., El-dahmy S., Witte L. et Wlyk M. (1996).** Pyrrolizidine and tetrahydroisoquinoline alkaloids from *Echium humile*. *Phytochemistry*. Elsevier Science, 42(1): 225-230.
41. **El-Shazly A., Abdel-All M., Tei A., Wink M. (1999).** Pyrrolizidine alkaloids from *Echium rauwolfii* and *Echium horridum* (Boraginaceae). *Z. Naturforsch*, 54: 295–300.
42. **El-Shazly A., Sarg T., Ateya A., Abdel Aziz E., El-Dahmy S., Witte L., Wink M. (1996a).** Pyrrolizidine alkaloids from *Echium setosum* and *Echium vulgare*. *Journal of Natural Products*, 59: 310–313.
43. **El-Shazly A., Sarg T., Ateya A., Abdel Aziz E., El-Dahmy S., Witte L., Wink M. (1996b).** Pyrrolizidine and tetrahydroisoquinoline alkaloids from *Echium humile*. *Phytochemistry*, 42: 225–230.
44. **EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing). (2003).** of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Euclid).
45. **Fabri R.L., Nogueira M.S., Braga F.G., Coimbra E.S., Scio E. (2009).** *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects, *Bioresource Technology*, 100: 428-433.
46. **Ferron A.(1979).** Bactériologie médical à usage des étudiants en médecine. Edition. Grouan et Roques, Paris.
47. **Filomena Conforti, Silvio Sosa, Mariangela Marrelli, Federica Menichini, Giancarlo A. Statti Dimitar Uzunov, Aurelia Tubaro, Francesco Menichini. (2009).** The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chemistry*, 112: 587–594.
48. **Le Cren Frédéric. (2004).** les antioxydants, la révolution du XXI^e siècle, 2^{ème} édition. ISBN 2-7640-0888.
49. **Fukui H., Tsukađa M., Mizukami H. et Tabata M. (1982).** Formation of stereoisomeric mixtures of naphthoquinone derivatives in *Echium lycopsis* Callus cultures. *Phytochemistry* 22(2): 252-258.
50. **Goode HF., Webster NR. (1993).** Free radicals and antioxidants in sepsis. *Critical Care Medicine*, 21: 1770-6.
51. **Goupy P., Dufour C., Loonis M. et Dangles O. (2003).** Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 615-622.
52. **Graglia E, R Julkunen-Tüto, G R Shaver. (2001).** Environmental control and intersite variations of phenolics in *Betula nana* in tundra ecosystems. *New Phytologist*, 151: 227-236.
53. **Gritz D.C., Srinivasan M., Smith S.D., Kim U., Lietman T.M., Wilkins J.H., Priyadharshini B., John R.K., Aravind S., Prajna N.V., Duraisami Thulasiraj R., Whitcher J.P. (2006).** The Antioxidants in Prevention of Cataracts Study: effects of antioxidant supplements on cataract progression in South India. *Br. J. Ophtalmol*, 90: 847-851.
54. **Grotewold E. (2006).** The Science of Flavonoids, Edited by Springer Science. ISBN-10: 0-387-28821-X.
55. **Gurib-Fakim A. (2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27:1-93.
56. **Haddouchi F., Lazouni H.A., Meziane A., Benmansour A. (2009).** Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science*. 05(2) : 246- 259. ISSN 1813-548X
57. **Hadi M. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du

- grade de Docteur en Sciences. Université Louis Pasteur. Strasbourg.
58. **Han J., Weng X., Bi K. (2008).** Antioxidants from a Chinese medicinal herb- *Lithospermum erythrorhizon*. *Food Chemistry*, 106: 2–10.
 59. **Harborne J.B. (1998).** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. *Third Edition*. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).
 60. **Harborne J. B. and Simmonds N. W. (1964).** Biochemistry of Phenolic Compounds, *Academic Press, London*, p. 101.
 61. **Harborne J. B. (1988).** Introduction to ecological biochemistry. *New York: Academic Press*. ISBN 978-0-12-324683-7.
 62. **Harborne J.B. (1982).** Introduction to ecological biochemistry. *Academic Press, London*. 2^{ème} Edition. ISBN 978-0-12-324680-6
 63. **Haslam E. (1981).** The Biochemistry of Plants. *New York: Academic Pres*, 7:527-544.
 64. **Havsteen B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology Therapiae*, 96(2): 67-202.
 65. **Hochberg M., Kohen R., Enk C.D. (2006).** Role of antioxidants in prevention of pyrimidine dimer formation in UVB irradiated human HaCaT keratinocytes. *Biomedical of Pharmacother*, 60: 233-237.
 66. **Inoue K., Garner C., Ackermann B.L., Oe T., Blair I.A. (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: 911-918.
 67. **Joffin J.N., Leyral G. (2006).** Microbiologie Technique. Tome 1, Dictionnaire des techniques. 4^e édition, ISBN 2-86617-515-8.
 68. **John A. (1991).** Manual of clinical Microbiology. 4^{ème} Edition A.S.M. Washington II, p967-971.
 69. **Just N., Nyunga M., Lelong J., Wallaert B. (2005).** Allergie immédiate aux glucocorticoïdes de synthèse oraux. *La Revue de Médecine Interne*, 26 : 331-334.
 70. **Khanbabae K., Van Ree T. (2001).** Tannins: Classification and definition, *Natural Products Reports*, 18: 641-649.
 71. **Laitinen M.L., Julkunen-Tiitto R., Rousi M. (2000).** Variation in phenolic compounds within a birch (*Bétula pendula*) population. *Journal of Chemical Ecology*, 26 (7): 1609-1622.
 72. **Liu R. (2004).** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutritional*, 134:3479-3485.
 73. **Liu L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H., Zeng X. (2009).** Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng, *Food Chemistry*, 112: 35-4.
 74. **Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J. (2008).** Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta*, 613: 01–19.
 75. **Mann C. M., Cox S. D. (2000).** The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30(4): 294-297.
 76. **Martha Estrella Garcia Pérez. (2008).** Caractérisation de composés phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune : étude de leur capacité antioxydante. Diplôme de maitre es sciences du bois. Département des sciences du bois et de la forêt. Faculté de foresterie et géomatique. Université Laval. Québec
 77. **Marvin Edeas. (2005).** Les antioxydants dans la tourmente. *Phytothérapie*, 6: 271-273.
 78. **Méndez E., Sanhueza J., Speisky H., Valenzuela A. (1996).** Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils. *Journal of American Oil Chemical Society*, 73 : 1033-1037.
 79. **Mérat F.J., Adrien Jacques de Lens. (1837).** Dictionnaire universel de matière médicinale et de thérapeutique générale. p182.
 80. **Mitkov S., Obreshkova D., Ilieva I., Pangarova T., Pencheva I. (2002).** Phenolcarboxylic acids in *Echium vulgare* L. *Acta Pharmacology Turcica*, 44: 43–48.

81. **Morin B., Bubb W.A., Davies M.J., Dean R.T., Fu S. (1998).** 3-hydroxylysine, a potential marker for studying radical induced protein oxidation. *Chemistry and Toxicology of Research*, 11: 1265-1273.
82. **Muriel Vellutini., Nicolas Baldovini., Dominique de Rocca Serra., Félix Tomi., Joseph Casanova. (2005).** β -Cyclolavandulyl and b-isocyclolavandulyl esters from *Peucedanum paniculatum* L., an endemic species to Corsica. *Phytochemistry*. 66:1956–1962.
83. **NCCLS (National Clinical Committee Laboratory Standards). (2003).** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. *Approved Standard-Eight Edition*, 23: 2-8.
84. **Novelli GP. (1997).** Role of free radicals in septic shock. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 48: 517-27.
85. **Oldham KM, Bowen PE. (1998).** Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial. *Journal of the American Diet Association*, 98: 1001-8.
86. **Ozturk M., Aydogmus-Ozturk F., Duru M.E., Topçu G. (2007).** Antioxidant activity of stem and root extracts of rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant. *Food Chemistry*, 103: 623–630.
87. **Pan Y., Wang K., Huang S., Wang H., Mu X., He C., Ji X., Zhang J., Huang F. (2008).** Antioxydant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel, *Food Chemistry*, 106: 1264-1270.
88. **Papageorgiou V.P., Assimopoulou A.N., Couladouros E.A., Hepworth D., Nicolaou K.C. (1999).** Chemistry and Biology of Alkannins, Shikonins and Related Naphthazarin Natural Products. Review article, *Angewandte Chemie, International Edition*, 38(3): 270-301
89. **Pardo F., Perich F., Torres R., Monache FD. (2000).** Stigmast-4-ene-3,6-dione an unusual phytotoxic sterone from the roots of *Echium vulgare* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 911-913.
90. **Paris M., Hurabielle M. (1981).** Abrégé de matière médicale- Pharmacognosie. Tome 1. *Edition Masson*, Paris. ISBN 2-225-66165-0. p.182
91. **Paris R, Moyse H. (1969).** Précis de matière médicale. Paris: Masson.
92. **Pelli K., Lyly M. (2003).** Les antioxydants dans l'alimentation. *Edition INRA*. ISBN 2-7380-1069-5
93. **Penfield MP., Campbell AM. (1990).** Fats and their lipids constituents. Chemical reactions of lipids. *Experimental food science*, 3^{eme} Edition. San Diego: Academic Press, 340-7.
94. **Penge O. (1992).** Rôle et importance de la conservation de la forêt tropicale pour la recherche pharmaceutique. *Revue Médecine & pharmacopée africaines*, 6 : 135-158.
95. **Pincemail J., Defraigne JO., Limet R. (1996).** Oxidative stress in clinical situations - fact or fancy. *European Journal of Anaesthesiol*, 13: 219-34.
96. **Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001).** Antioxidants in food, Practical applications. *Woodhead Publishing Limited*. ISBN 1 85573 463 X
97. **Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. Roura S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology (Elsevier)*, 36: 679-684.
98. **Quezel P. et Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome II *Edition. CNRS*. Paris.
99. **Rhodes M.J.C. (1994).** Physiological rôles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology, springerlink*, 24:1-20.
100. **Rizk A.M., (1982).** Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*, 52(2) : 35-42.
101. **Robinson S.E., Alex J.F. (1989).** Empoisonnement du bétail par les plantes. Agdex:130/643. Commande N°89-029. ISSN 1198-7138.
102. **Roeder E., Liu K., Bourauel T. (1991).** Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium pininana*. *Phytochemistry*, 30 (9): 3107-3110.
103. **Roginski V., Lissi E. (2005).** Review of methods to determine chain-breaking

- antioxydant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254
104. Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldini M. (2009). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L., *Food Chemistry*, 112: 885-888.
105. Sherwin E. R. (1976). Antioxidants for vegetable oils. *Journal of American Oil Chemical Society*, 53: 430-436.
106. Shiva S., Crawford J. H., Ramachandran A., Ceaser E. K., Hillson T., Brookes P. S., Patel R. P., Darley Usmar V. M. (2004). Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Journal of Biochemistry*, 379:359-366.
107. Stevnsner T., Thorslund T., de Souza-Pinto N. C., Bohr V. A. (2008). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Experimental of the Gerontology*, 37:1189-1196.
108. Su, M.S., Shyu, Y.T., Chien, P.J. (2008). Antioxidant activities of citrus herbal product extracts, *Food Chemistry*, 111:892-896.
109. Tian F., Li B., Yang J., Zhang G., Chen Y., Luo Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities, *Food Chemistry*, 113: 173-179.
110. Tomas-Barberan F.A., Tomas-Lorente F., Ferreres F., Garcia-Viguera C. (1986). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47: 337-340.
111. Traore B. (2001). Screening de l'activité biologique de deux espèces de *Tapinanthus* poussant sur *Butyrospermum paradoxum* (Gaertn F) Hepper (*Sapotaceae*) ; Thèse de Pharmacie ; Bamako ; N° 28 ; p83.
112. Trease E., Evans W.C. (1987). Pharmacognosie. Billiare Tindall. London 13th Edition. P, 61-62. In Karumi Y., Onyeyili P.A. et Ogugbuaja V.O., 2004. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pommé). *Journal of Medicine and Scientific*. 4(3), 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474.
113. Vermerris W., Nicholson R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).
114. Vinson J.A., (2006). Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology*, 13: 151-162.
115. Watson L., and Dallwitz M.J. (1991). The families of angiosperms: automated descriptions, with interactive identification and information retrieval. *Australian Systematic Botany*, 4: 681-95.

ملخص

دراسة علمية النبات الطبية العشبية (الحمراء) *E. pycnanthum* و هو

والموطن: *Boraginaceae*. هذا النبات ينمو في جبال جبال الأطلس المغربية.

تم إجراء التحليل الكيميائي النباتي لدراسة المكونات الكيميائية الموجودة في أوراق وجذور هذا النبات. أُوتيت عينات استرجاع المقطعات الخام، تحت الظروف الطبيعية. أظهرت التحليلات الكيميائية من الجذور باستعمال وسائل الاسترجاع بالبنيت، الحدة لكل عينة. المرودات أعلى في الجذور من الأوراق.

تم إجراء التحليل الكيميائي النباتي للمكونات الكيميائية الموجودة في جذور هذا النبات. الحدة لكل عينة. المرودات أعلى في الجذور من الأوراق.

المكونات الكيميائية: *Boraginaceae*.

تم إجراء التحليل الكيميائي النباتي للمكونات الكيميائية الموجودة في أوراق وجذور هذا النبات. الحدة لكل عينة. المرودات أعلى في الجذور من الأوراق.

تم إجراء التحليل الكيميائي النباتي للمكونات الكيميائية الموجودة في أوراق وجذور هذا النبات. الحدة لكل عينة. المرودات أعلى في الجذور من الأوراق.

تم إجراء التحليل الكيميائي النباتي للمكونات الكيميائية الموجودة في أوراق وجذور هذا النبات. الحدة لكل عينة. المرودات أعلى في الجذور من الأوراق.

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et des activités antioxydantes et antibactérienne d'une plante endémique *Echium pycnanthum* de la famille des Boraginacées, largement répandue dans la région de Sebtiou (Tlemcen). Elle fait partie de la panoplie des plantes médicinales de la région.

Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les feuilles et les racines de cette plante.

Les extractions des extraits bruts, flavonoïdes, tanins et saponosides à partir des deux parties de la plante et des quinones à partir des racines ont été effectuées par des méthodes d'extractions par des solvants spécifiques pour chaque extrait. Les rendements sont plus importants dans les feuilles par rapport aux racines.

L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits, montre qu'il y a une certaine conformité entre la méthode de réduction du fer FRAP et celle de piégeage du radical libre DPPH. L'extrait brut des feuilles et les extraits contenant les composés phénoliques possèdent un pouvoir antioxydant important comparé à ceux de l'acide ascorbique et de BHT. Les saponosides ont révélés une faible activité.

L'étude de l'activité de ces extraits sur des souches bactériennes montre que le pouvoir antibactérien de l'extrait brut des feuilles est plus important comparé à celui des autres extraits. La souche de *Pseudomonas aeruginosa* est révélée la plus sensible à tous les extraits.

Les quinones des racines, responsables de la couleur rouge, ont été identifiées par RMN ^1H et ^{13}C . Il s'agit d'un dérivé de shikonine, *Angelylshikonine*. Ce résultat confirme l'appartenance de notre espèce à la famille des Boraginacées.

Mots clés: *Echium pycnanthum*, Activité antioxydante, DPPH, FRAP, Activité antibactérienne, RMN ^1H , ^{13}C .

Summary

Our study aims at study of the phytochemistry, antimicrobial and antioxidant activities of an endemic plant, *Echium pycnanthum* from the family of Boraginacées, widespread in the region of Sebtiou (Tlemcen). It is in the range of medicinal plants in the region.

The phytochemical tests permitted to detect the different families of chemical compounds existing in the leaves and roots of this plant.

Extractions of crude extracts, flavonoids, tannins and saponins from the two parts of the plant and quinones from the roots were performed by extraction methods with solvents specific for each sample. Yields are higher in leaves relative to roots.

The study of the antioxidant activity of different extracts, shows that there is some discrepancy between the method of reducing iron FRAP and the trapping of free radical DPPH. The crude extract of leaves and extracts containing phenolic compounds possess important antioxidant compared to those of ascorbic acid and BHT. The saponins have revealed low activity.

The study of the activity of these extracts on bacterial strains showed that the antibacterial activity of the crude extract of the leaves is more important compared to other extracts. The strain of *Pseudomonas aeruginosa* was the most sensitive to all extracts.

Quinones roots, responsible for the color red, were identified by NMR ^1H and ^{13}C . It is a derivative of shikonin, *Angelylshikonine*. This result confirms the membership of our species to the family of Boraginacées.

Keywords: *Echium pycnanthum*, Antioxidant activity, DPPH, FRAP, Antibacterial Activity, NMR ^1H , ^{13}C .

ملخص

دراسة الكيمياء النباتية للنبات الأندلسي *Echium pycnanthum* (السنبلون) هو *Borraginaceae*. هذا النبات له جذور بيضاء في منطقة جبلية (السنبلون) و هو *Echium pycnanthum*.

تم إجراء التحليل الكيميائي للنبات الأندلسي *Echium pycnanthum* في أوراق وجذور هذا النبات. أُوتيت عينات استرجاع المقطعات الخام، تحت الظروف القاسية. أظهرت النتائج من كلا جانبي النبات كميته من العنبر. يشمل استرجاع العينات، الحد لكل عينة. الحدودات أعلى في الجذور من الأوراق.

تم إجراء التحليل الكيميائي للنبات الأندلسي *Echium pycnanthum* في أوراق وجذور هذا النبات. أُوتيت عينات استرجاع المقطعات الخام، تحت الظروف القاسية. أظهرت النتائج من كلا جانبي النبات كميته من العنبر. يشمل استرجاع العينات، الحد لكل عينة. الحدودات أعلى في الجذور من الأوراق.

تم إجراء التحليل الكيميائي للنبات الأندلسي *Echium pycnanthum* في أوراق وجذور هذا النبات. أُوتيت عينات استرجاع المقطعات الخام، تحت الظروف القاسية. أظهرت النتائج من كلا جانبي النبات كميته من العنبر. يشمل استرجاع العينات، الحد لكل عينة. الحدودات أعلى في الجذور من الأوراق.

تم إجراء التحليل الكيميائي للنبات الأندلسي *Echium pycnanthum* في أوراق وجذور هذا النبات. أُوتيت عينات استرجاع المقطعات الخام، تحت الظروف القاسية. أظهرت النتائج من كلا جانبي النبات كميته من العنبر. يشمل استرجاع العينات، الحد لكل عينة. الحدودات أعلى في الجذور من الأوراق.

تم إجراء التحليل الكيميائي للنبات الأندلسي *Echium pycnanthum* في أوراق وجذور هذا النبات. أُوتيت عينات استرجاع المقطعات الخام، تحت الظروف القاسية. أظهرت النتائج من كلا جانبي النبات كميته من العنبر. يشمل استرجاع العينات، الحد لكل عينة. الحدودات أعلى في الجذور من الأوراق.

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et des activités antioxydantes et antibactérienne d'une plante endémique *Echium pycnanthum* de la famille des Borraginacées, largement répandue dans la région de Séhâou (Tlemcen). Elle fait partie de la panoplie des plantes médicinales de la région.

Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les feuilles et les racines de cette plante.

Les extractions des extraits bruts, flavonoïdes, tanins et saponosides à partir des deux parties de la plante et des quinones à partir des racines ont été effectuées par des méthodes d'extractions par des solvants spécifiques pour chaque extrait. Les rendements sont plus importants dans les feuilles par rapport aux racines.

L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits, montre qu'il y a une certaine conformité entre la méthode de la réduction du fer FRAP et celle de piégeage du radical libre DPPH. L'extrait brut des feuilles et les extraits contenant les composés phénoliques possèdent un pouvoir antioxydant important comparé à ceux de l'acide ascorbique et de BHT. Les saponosides ont révélés une faible activité.

L'étude de l'activité de ces extraits sur des souches bactériennes montre que le pouvoir antibactérien de l'extrait brut des feuilles est plus important comparé à celui des autres extraits. La souche de *Pseudomonas aeruginosa* s'est révélée la plus sensible à tous les extraits.

Les quinones des racines, responsables de la couleur rouge, ont été identifiées par RMN ^1H et ^{13}C . Il s'agit d'un dérivé de shikonine, *Angelylshikonine*. Ce résultat confirme l'appartenance de notre espèce à la famille des Borraginacées.

Mots clés: *Echium pycnanthum*, Activité antioxydante, DPPH, FRAP, Activité antibactérienne, RMN ^1H , ^{13}C .

Summary

Our study aims at study of the phytochemistry, antimicrobial and antioxidant activities of an endemic plant, *Echium pycnanthum* from the family of Borraginacées, widespread in the region of Séhâou (Tlemcen). It is in the range of medicinal plants in the region.

The phytochemical tests permitted to detect the different families of chemical compounds existing in the leaves and roots of this plant.

Extractions of crude extracts, flavonoids, tannins and saponins from the two parts of the plant and quinones from the roots were performed by extraction methods with solvents specific for each sample. Yields are higher in leaves relative to roots.

The study of the antioxidant activity of different extracts, shows that there is some discrepancy between the method of reducing iron FRAP and the trapping of free radical DPPH. The crude extract of leaves and extracts containing phenolic compounds possess important antioxidant compared to those of ascorbic acid and BHT. The saponins have revealed low activity.

The study of the activity of these extracts on bacterial strains showed that the antibacterial activity of the crude extract of the leaves is more important compared to other extracts. The strain of *Pseudomonas aeruginosa* was the most sensitive to all extracts.

Quinones roots, responsible for the color red, were identified by NMR ^1H and ^{13}C . It is a derivative of shikonin, *Angelylshikonine*. This result confirms the membership of our species to the family of Borraginacées.

Keywords: *Echium pycnanthum*, Antioxidant activity, DPPH, FRAP, Antibacterial Activity, NMR ^1H , ^{13}C .

ملخص

هدفت الدراسة الحالية الى التعرف على المكونات الكيميائية والفيزيائية لنبات *E. pycnanthum* و هو

الاسم العلمي: *Borraginaceae*. هذا النبات ينمو في منطقة شمال ليبيا الشمالية الشرقية.

تمت دراسة المكونات الكيميائية الموجودة في اوراق و جذور هذا النبات. اُوتيت عينات استخرجت من الجذور،
الاوراق والسيقان من كل جزء النبات. كيميائياً من الجذور باستعمال وسائل الاستخراج بالمذيبات، لتحديد كل عينة. المرادفات اعطى في
الجزء من الجذور.

تمت دراسة المستخرج من الاوراق والقطعات التي تحتوي على مركبات الفينول تلك قروا هذه، حيثما اكتشفنا علاقة مع تلك لعناصر الاسكروبيك و BHT

التي هي من تلك المركبات.

تمت دراسة المكونات الكيميائية الموجودة في القطع الجذرية، القطع الجذرية من الاوراق هو كثر اصبه بالمقارنة مع القطع الجذرية
من تلك *Borraginaceae* التي هي من تلك المكونات.

تمت دراسة المكونات المستوحدة من الجذور والاوراق بطريقة ايزونو الخاضعة للجوي ^{13}C RMN. كما عيّن من شغل التباين
المركبات من تلك المكونات *Borraginaceae*.

تمت دراسة المكونات الكيميائية *E. pycnanthum*، باستخدام ^{13}C RMN، DPPH، FRAP، نشاطها الجذرية كيون ^{13}C RMN.

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et des activités antioxydantes et antibactériennes d'une plante endémique *Echium pycnanthum* de la famille des Borraginacées, largement répandue dans la région de Sebha (Tlemcen). Elle fait partie de la panoplie des plantes médicinales de la région.

Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les feuilles et les racines de cette plante.

Les extractions des extraits bruts, flavonoïdes, tanins et saponosides à partir des deux parties de la plante et des quinones à partir des racines ont été effectuées par des méthodes d'extractions par des solvants spécifiques pour chaque extrait. Les rendements sont plus importants dans les feuilles par rapport aux racines.

L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits, montre qu'il y a une certaine conformité entre la méthode de la réduction du fer FRAP et celle de piégeage du radical libre DPPH. L'extrait brut des feuilles et les extraits contenant les composés phénoliques possèdent un pouvoir antioxydant important comparé à ceux de l'acide ascorbique et de BHT. Les saponosides ont révélés une faible activité.

L'étude de l'activité de ces extraits sur des souches bactériennes montre que le pouvoir antibactérien de l'extrait brut des feuilles est plus important comparé à celui des autres extraits. La souche de *Pseudomonas aeruginosa* s'est révélée la plus sensible à tous les extraits.

Les quinones des racines, responsables de la couleur rouge, ont été identifiées par RMN ^{13}C et 1H . Il s'agit d'un dérivé de shikonine, *Angelylshikonine*. Ce résultat confirme l'appartenance de notre espèce à la famille des Borraginacées.

Mots clés: *Echium pycnanthum*, Activité antioxydante, DPPH, FRAP, Activité antibactérienne, RMN ^{13}C , 1H .

Summary

Our study aims at study of the phytochemistry, antimicrobial and antioxidant activities of an endemic plant, *Echium pycnanthum* from the family of Borraginacées, widespread in the region of Sebha (Tlemcen). It is in the range of medicinal plants in the region.

The phytochemical tests permitted to detect the different families of chemical compounds existing in the leaves and roots of this plant.

Extractions of crude extracts, flavonoids, tannins and saponins from the two parts of the plant and quinones from the roots were performed by extraction methods with solvents specific for each sample. Yields are higher in leaves relative to roots.

The study of the antioxidant activity of different extracts, shows that there is some discrepancy between the method of reducing iron FRAP and the trapping of free radical DPPH. The crude extract of leaves and extracts containing phenolic compounds possess important antioxidant compared to those of ascorbic acid and BHT. The saponins have revealed low activity.

The study of the activity of these extracts on bacterial strains showed that the antibacterial activity of the crude extract of the leaves is more important compared to other extracts. The strain of *Pseudomonas aeruginosa* was the most sensitive to all extracts.

Quinones roots, responsible for the color red, were identified by NMR ^{13}C and 1H . It is a derivative of shikonin, *Angelylshikonine*. This result confirms the membership of our species to the family of Borraginacées.

Keywords: *Echium pycnanthum*, Antioxidant activity, DPPH, FRAP, Antibacterial Activity, NMR ^{13}C , 1H .

ملخص

دراسة الكيمياء النباتية للنبات الأندلسي الكائنات الحية من عائلة Boraginaceae، و هو *E. pycnanthum*. هذا النبات ينمو في منطقة جبلية (السهل)، و هو

تمت دراسة الكيمياء النباتية لهذا النبات من حيث الكيمياء الموجودة في أوراق و جذور هذا النبات. أُوتت عينات استخراج المقطعات الخام، تحت الظروف القاسية. أظهرت النتائج من كلا جانبي النبات كميته من العنبر. يشمل استخراج السليكات، السحابة لكل عينة. المرودات أعلى في

مقطع الجذور من الأوراق المقطعة من العنبر. من مركبات الفينول تلك قرحة صلبة، حشنة الكافور صلبة مع تلك لعنصر الإسكويك و BHT

تمت دراسة المقطعات من السليكات القوية ظهور أن السليكات القوية المقطعة الجذور من الأوراق هو أكثر أهمية بالمقارنة مع المقطعات

مقطع الكيمياء النباتية من العنبر والسليكات من العنبر. طريقة لون العنبر القوي ^{13}C RMN. كإشارة عن شغل السليكات

تمت الكيمياء النباتية *E. pycnanthum*، السليكات الكافور DPPH, FRAP، السليكات القوية كيمياء ^{13}C RMN.

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et des activités antioxydantes et antibactérienne d'une plante endémique *Echium pycnanthum* de la famille des Boraginacées, largement répandue dans la région de Séhâou (Tiémouct). Elle fait partie de la panoplie des plantes médicinales de la région.

Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les feuilles et les racines de cette plante.

Les extractions des extraits bruts, flavonoïdes, tanins et saponosides à partir des deux parties de la plante et des quinones à partir des racines ont été effectuées par des méthodes d'extractions par des solvants spécifiques pour chaque extrait. Les rendements sont plus importants dans les feuilles par rapport aux racines.

L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits, montre qu'il y a une certaine conformité entre la méthode de la réduction du fer FRAP et celle de piégeage du radical libre DPPH. L'extrait brut des feuilles et les extraits contenant les composés phénoliques possèdent un pouvoir antioxydant important comparé à ceux de l'acide ascorbique et de BHT. Les saponosides ont révélés une faible activité.

L'étude de l'activité de ces extraits sur des souches bactériennes montre que le pouvoir antibactérien de l'extrait brut de feuilles est plus important comparé à celui des autres extraits. La souche de *Pseudomonas aeruginosa* est révélée la plus sensible à tous les extraits.

Les quinones des racines, responsables de la couleur rouge, ont été identifiées par RMN 1H et ^{13}C . Il s'agit d'un dérivé de shikonine, *Angelylshikonine*. Ce résultat confirme l'appartenance de notre espèce à la famille des Boraginacées.

Mots clés: *Echium pycnanthum*, Activité antioxydante, DPPH, FRAP, Activité antibactérienne, RMN 1H , ^{13}C .

Summary

Our study aims at study of the phytochemistry, antimicrobial and antioxidant activities of an endemic plant, *Echium pycnanthum* from the family of Boraginacées, widespread in the region of Séhâou (Tiémouct). It is in the range of medicinal plants in the region.

The phytochemical tests permitted to detect the different families of chemical compounds existing in the leaves and roots of this plant.

Extractions of crude extracts, flavonoids, tannins and saponins from the two parts of the plant and quinones from the roots were performed by extraction methods with solvents specific for each sample. Yields are higher in leaves relative to roots.

The study of the antioxidant activity of different extracts, shows that there is some discrepancy between the method of reducing iron FRAP and the trapping of free radical DPPH. The crude extract of leaves and extracts containing phenolic compounds possess important antioxidant compared to those of ascorbic acid and BHT. The saponins have revealed low activity.

The study of the activity of these extracts on bacterial strains showed that the antibacterial activity of the crude extract of the leaves is more important compared to other extracts. The strain of *Pseudomonas aeruginosa* was the most sensitive to all extracts.

Quinones roots, responsible for the color red, were identified by NMR 1H and ^{13}C . It is a derivative of shikonin, *Angelylshikonine*. This result confirms the membership of our species to the family of Boraginacées.

Keywords: *Echium pycnanthum*, Antioxidant activity, DPPH, FRAP, Antibacterial Activity, NMR 1H , ^{13}C .